



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102105164 A

(43) 申请公布日 2011. 06. 22

(21) 申请号 200980129525. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 06. 10

A61K 38/53 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/060, 747 2008. 06. 11 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 01. 27

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/046910 2009. 06. 10

(87) PCT申请的公布数据

W02009/152247 EN 2009. 12. 17

(71) 申请人 ATYR 医药公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 拉杰什·贝拉尼

杰弗里·迪安·沃特金斯 张伟

阿兰·菲利普·瓦瑟洛特

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

权利要求书 6 页 说明书 45 页

序列表 12 页 附图 29 页

(54) 发明名称

酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的血小板生成活性

(57) 摘要

本文提供了血小板生成组合物,其包含酪氨酰-tRNA 合成酶多肽,包括其截短体和/或变体。还提供了利用这种组合物治疗疾病状态的方法,所述疾病状态受益于增加的血小板生成,诸如血小板减少症。

1. 包含血小板生成有效浓度的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的药物,其用于治疗个体的血小板减少症或降低个体发展为血小板减少症的风险,或者用于增加或维持个体的血小板计数。

2. 增加个体的血小板计数的方法,包括给予所述个体包含血小板生成有效浓度的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的组合物,由此增加所述个体的血小板计数。

3. 治疗个体的血小板减少症或降低个体发展为血小板减少症的风险的方法,包括给予所述个体包含血小板生成有效浓度的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的组合物,由此治疗所述个体的血小板减少症或降低所述个体发展为血小板减少症的风险。

4. 刺激个体的血小板生成的方法,包括给予所述个体包含血小板生成有效浓度的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的组合物,由此刺激所述个体的血小板生成。

5. 维持个体的血小板计数的方法,包括给予所述个体血小板生成有效浓度的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽,由此维持所述个体的血小板计数。

6. 刺激个体的巨核细胞增殖、迁移和/或分化的方法,包括给予所述个体血小板生成有效浓度的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽,由此刺激所述个体的巨核细胞增殖和/或分化。

7. 刺激个体的嗜中性细胞增殖的方法,包括给予所述个体血小板生成有效浓度的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽,由此刺激所述个体的嗜中性细胞增殖。

8. 如权利要求 1-7 中任一项所述的药物或方法,其中所述个体患有与降低或减少的血小板计数有关的疾病或疾病状态,或处于患所述疾病或疾病状态的风险中。

9. 如权利要求 1-7 中任一项所述的药物或方法,其中所述个体具有约 150,000/mm³ 或更低血小板计数。

10. 如权利要求 8 所述的药物或方法,其中所述与降低或减少的血小板计数有关的疾病或疾病状态选自出血、鼻衄、脾功能亢进、低体温、Epstein-Barr 病毒感染、传染性单核细胞增多症、Wiskott-Aldrich 综合征、母源性噬嗑类药物摄入、先天性缺巨核细胞性血小板减少症、血小板减少-桡骨缺失综合征、范科尼贫血、巨大血小板综合征、May-Hegglin 畸形、灰白血小板综合征、奥尔波特综合征、新生儿风疹、再生障碍性贫血、骨髓增生异常综合征、白血病、淋巴瘤、骨髓的肿瘤、癌症、营养缺乏、放射接触、肝功能衰竭、细菌性脓毒症、麻疹、登革热、HIV 感染或 AIDS、早熟、胎儿成红细胞增多症、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、母源性 ITP、溶血尿毒症综合征、弥散性血管内凝血、血栓性血小板减少性紫癜 (TTP)、输血后紫癜、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、新生儿同种免疫血小板减少症、以及阵发性睡眠性血红蛋白尿症、丙型肝炎病毒感染 (HCV)、药剂诱发的血小板减少症、和化疗诱发的血小板增多症 (CIT)。

11. 如权利要求 8 所述的药物或方法,其中与降低或减少的血小板计数有关的疾病或疾病状态由药剂或药品诱发。

12. 如权利要求 11 所述的药物或方法,其中所述药剂或药品选自化疗剂、非甾体抗炎剂、磺胺类药物、万古霉素、氯吡格雷、糖蛋白 IIb/IIIa 抑制剂、干扰素、丙戊酸、阿昔单抗、利奈唑胺、法莫替丁、美贝维林、组胺阻断剂、烷化剂、肝素、乙醇和抗菌化疗剂。

13. 如权利要求 12 所述的药物或方法,其中所述化疗剂选自顺铂 (CDDP)、卡铂、甲基苄肼、氮介、环磷酰胺、喜树碱、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、白消安、亚硝基尿、更生霉素、道诺霉素、阿霉素、博来霉素、普卡霉素、丝裂霉素、依托泊苷 (VP 16)、他莫昔芬、雷洛昔

芬、雌激素受体结合剂、紫杉酚、吉西他滨、长春瑞宾、法尼基蛋白转移酶抑制剂、反铂、5- 氟尿嘧啶、长春新碱、长春花碱和甲氨蝶呤、temazolomide 以及其衍生物。

14. 如权利要求 1 至 7 中任一项所述的药物或方法,其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含在它的 C- 末端截短的哺乳动物酪氨酰-tRNA 合成酶。

15. 如权利要求 1 至 7 中任一项所述的药物或方法,其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO :1,2,3,6,8,10,12 或 14 的氨基酸序列,其中至少约 1-50 个氨基酸残基从它的 C- 末端截去。

16. 如权利要求 1 至 7 中任一项所述的药物或方法,其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO :1,2,3,6,8,10,12 或 14 的氨基酸序列,其中至少约 50-100 个氨基酸残基从它的 C- 末端截去。

17. 如权利要求 1 至 7 中任一项所述的药物或方法,其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO :1,2,3,6,8,10,12 或 14 的氨基酸序列,其中至少约 100-150 个氨基酸残基从它的 C- 末端截去。

18. 如权利要求 1 至 7 中任一项所述的药物或方法,其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO :1,2,3,6,8 或 10 的氨基酸序列,其中至少约 150-200 个残基从它的 C- 末端截去。

19. 如权利要求 1 至 7 中任一项所述的药物或方法,其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO :1,2,3,6,8 或 10 的氨基酸序列,其中至少约 200-250 个氨基酸残基从它的 C- 末端截去。

20. 如权利要求 1 至 7 中任一项所述的药物或方法,其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含在它的 N- 末端截短的哺乳动物酪氨酰-tRNA 合成酶。

21. 如权利要求 1 至 7 中任一项所述的药物或方法,其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO :1,2,3,6,8,10,12 或 14 的氨基酸序列,其中至少约 1-50 个氨基酸残基从它的 N- 末端截去。

22. 如权利要求 1 至 7 中任一项所述的药物或方法,其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO :1,2,3,6,8,10,12 或 14 的氨基酸序列,其中至少约 50-100 个氨基酸残基从它的 N- 末端截去。

23. 如权利要求 1 至 7 中任一项所述的药物或方法,其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO :1,2,3,6,8,10,12 或 14 的氨基酸序列,其中至少约 100-150 个氨基酸残基从它的 N- 末端截去。

24. 如权利要求 1 至 7 中任一项所述的药物或方法,其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO :1,2,3,6,8 或 10 的氨基酸序列,其中至少约 150-200 个残基从它的 N- 末端截去。

25. 如权利要求 1 至 7 中任一项所述的药物或方法,其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO :1,2,3,6,8 或 10 的氨基酸序列,其中至少约 200-250 个氨基酸残基从它的 N- 末端截去。

26. 如权利要求 1 至 7 中任一项所述的药物或方法,其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽选自:

(a) 包含与 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列至少 80% 一致的氨基酸序列的多肽,其中

341 位的丙氨酸不被酪氨酸取代；

(b) 包含与 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列至少 90% 一致的氨基酸序列的多肽, 其中 341 位的丙氨酸不被酪氨酸取代；

(c) 包含与 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列至少 95% 一致的氨基酸序列的多肽, 其中 341 位的丙氨酸不被酪氨酸取代；

(d) 包含与 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列至少 98% 一致的氨基酸序列的多肽, 其中 341 位的丙氨酸不被酪氨酸取代；以及

(e) 包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列的多肽。

27. 如权利要求 1 至 7 中任一项所述的药物或方法, 其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽选自：

(a) 包含与 SEQ ID NO:1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 或 14 所示的氨基酸序列至少 80% 一致的氨基酸序列的多肽；

(b) 包含与 SEQ ID NO:1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 或 14 所示的氨基酸序列至少 90% 一致的氨基酸序列的多肽；

(c) 包含与 SEQ ID NO:1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 或 14 所示的氨基酸序列至少 95% 一致的氨基酸序列的多肽；

(d) 包含与 SEQ ID NO:1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 或 14 所示的氨基酸序列至少 98% 一致的氨基酸序列的多肽；以及

(e) 包含 SEQ ID NO:1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 或 14 所示的氨基酸序列的多肽。

28. 适合用于给药的组合物, 包含生理学上可接受的赋形剂和 / 或载体以及血小板生成有效浓度的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽, 其中所述组合物能够刺激个体的血小板生成和 / 或增加个体的血小板计数。

29. 如权利要求 28 所述的组合物, 其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含在它的 C- 末端截短的哺乳动物酪氨酰-tRNA 合成酶。

30. 如权利要求 28 所述的组合物, 其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO:1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 或 14 的氨基酸序列, 其中至少约 1-50 个氨基酸残基从它的 C- 末端截去。

31. 如权利要求 28 所述的组合物, 其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO:1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 或 14 的氨基酸序列, 其中至少约 50-100 个氨基酸残基从它的 C- 末端截去。

32. 如权利要求 28 所述的组合物, 其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO:1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 或 14 的氨基酸序列, 其中至少约 100-150 个氨基酸残基从它的 C- 末端截去。

33. 如权利要求 28 所述的组合物, 其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO:1, 2, 3, 6, 8 或 10 的氨基酸序列, 其中至少约 150-200 个残基从它的 C- 末端截去。

34. 如权利要求 28 所述的组合物, 其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO:1, 2, 3, 6, 8 或 10 的氨基酸序列, 其中至少约 200-250 个氨基酸残基从它的 C- 末端截去。

35. 如权利要求 28 所述的组合物, 其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含在它的 N- 末端截短的哺乳动物酪氨酰-tRNA 合成酶。

36. 如权利要求 28 所述的组合物, 其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO:

1,2,3,6,8,10,12 或 14 的氨基酸序列,其中至少约 1-50 个氨基酸残基从它的 N-末端截去。

37. 如权利要求 28 所述的组合物,其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO: 1,2,3,6,8,10,12 或 14 的氨基酸序列,其中至少约 50-100 个氨基酸残基从它的 N-末端截去。

38. 如权利要求 28 所述的组合物,其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO: 1,2,3,6,8,10,12 或 14 的氨基酸序列,其中至少约 100-150 个氨基酸残基从它的 N-末端截去。

39. 如权利要求 28 所述的组合物,其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO: 1,2,3,6,8 或 10 的氨基酸序列,其中至少约 150-200 个残基从它的 N-末端截去。

40. 如权利要求 28 所述的组合物,其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO: 1,2,3,6,8 或 10 的氨基酸序列,其中至少约 200-250 个氨基酸残基从它的 N-末端截去。

41. 如权利要求 28 所述的组合物,其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽选自:

(a) 包含与 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列至少 80%一致的氨基酸序列的多肽,其中 341 位的丙氨酸不被酪氨酸取代;

(b) 包含与 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列至少 90%一致的氨基酸序列的多肽,其中 341 位的丙氨酸不被酪氨酸取代;

(c) 包含与 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列至少 95%一致的氨基酸序列的多肽,其中 341 位的丙氨酸不被酪氨酸取代;

(d) 包含与 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列至少 98%一致的氨基酸序列的多肽,其中 341 位的丙氨酸不被酪氨酸取代;以及

(e) 包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列的多肽。

42. 如权利要求 28 所述的组合物,其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽选自:

(a) 包含与 SEQ ID NO:1,2,3,6,8,10,12 或 14 所示的氨基酸序列至少 80%一致的氨基酸序列的多肽;

(b) 包含与 SEQ ID NO:1,2,3,6,8,10,12 或 14 所示的氨基酸序列至少 90%一致的氨基酸序列的多肽;

(c) 包含与 SEQ ID NO:1,2,3,6,8,10,12 或 14 所示的氨基酸序列至少 95%一致的氨基酸序列的多肽;

(d) 包含与 SEQ ID NO:1,2,3,6,8,10,12 或 14 所示的氨基酸序列至少 98%一致的氨基酸序列的多肽;以及

(e) 包含 SEQ ID NO:1,2,3,6,8,10,12 或 14 所示的氨基酸序列的多肽。

43. 如权利要求 28 所述的组合物,还包含第二酪氨酰-tRNA 合成酶多肽,其中两个酪氨酰-tRNA 合成酶多肽形成二聚体。

44. 如权利要求 43 所述的组合物,其中所述二聚体是同型二聚体。

45. 如权利要求 44 所述的组合物,其中所述二聚体是异质二聚体。

46. 如权利要求 45 所述的组合物,其中所述异质二聚体包含全长的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽和截短的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽。

47. 如权利要求 28 所述的组合物,还包含异源多肽,其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽和所述异源多肽形成异质二聚体。

48. 组合物,其包含生理学上可接受的赋形剂和 / 或载体以及血小板生成有效浓度的嵌合的酪氨酰 -tRNA 合成酶多肽,其中所述嵌合的多肽包含酪氨酰 -tRNA 合成酶多肽的两个或更多个生物活性片段,其中所述两个或更多个片段包含权利要求 28-42 中任一项所述的多肽的至少 10 个连续的氨基酸,其中所述两个或更多个片段相连接以形成嵌合的多肽,以及其中所述嵌合的酪氨酰 -tRNA 合成酶多肽能够刺激个体的血小板生成和 / 或增加个体的血小板计数。

49. 组合物,其包含生理学上可接受的赋形剂和 / 或载体以及血小板生成有效浓度的嵌合的酪氨酰 -tRNA 合成酶多肽,其中所述嵌合的多肽包含 (a) 酪氨酰 -tRNA 合成酶多肽的一个或多个生物活性片段,其中所述一个或多个片段包含权利要求 28-42 中任一项所述的多肽的至少 10 个连续氨基酸;和 (b) 一个或多个异源多肽,其中所述 (a) 的一个或多个片段以及所述 (b) 的一个或多个异源多肽相连接以形成嵌合的多肽,以及其中所述嵌合的多肽能够刺激个体的血小板生成和 / 或增加个体的血小板计数。

50. 抗体或抗原结合片段,其特异地结合权利要求 28-49 中任一项所述的酪氨酰 -tRNA 合成酶多肽。

51. 鉴定或表征样品中 YRS 多肽的方法,包括:

- (a) 获得生物样品;
- (b) 用权利要求 50 所述的抗体或抗原结合片段接触所述生物样品;以及
- (c) 检测所述抗体或抗原结合片段对所述生物样品的特异性结合的存在或缺乏,由此鉴定或表征所述样品中的 YRS 多肽。

52. 如权利要求 51 所述的方法,其中所述生物样品获自个体。

53. 组合物,其包含分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸选自:

- (a) 包含与 SEQ ID NO:4,7,9,11,13 或 15 所示的核苷酸序列至少 80%一致的核苷酸序列的多核苷酸;
- (b) 包含与 SEQ ID NO:4,7,9,11,13 或 15 所示的核苷酸序列至少 90%一致的核苷酸序列的多核苷酸;
- (c) 包含与 SEQ ID NO:4,7,9,11,13 或 15 所示的核苷酸序列至少 95%一致的核苷酸序列的多核苷酸;
- (d) 包含与 SEQ ID NO:4,7,9,11,13 或 15 所示的核苷酸序列至少 98%一致的核苷酸序列的多核苷酸;
- (e) 包含 SEQ ID NO:4,7,9,11,13 或 15 所示的核苷酸序列的多核苷酸,

其中所述多核苷酸编码能够刺激个体的血小板生成和 / 或增加个体的血小板计数的酪氨酰 -tRNA 合成酶多肽。

54. 载体,其包含权利要求 53 所述的多核苷酸。

55. 宿主细胞,其包含权利要求 54 所述的载体。

56. 刺激早期巨核细胞祖细胞增殖和 / 或分化的方法,包括用酪氨酰 -tRNA 合成酶多肽孵育造血干细胞培养物足够的时间以允许所述早期巨核细胞祖细胞增殖,由此刺激早期巨核细胞祖细胞增殖和 / 或分化。

57. 如权利要求 56 所述的方法,其中离体或体外实施所述方法。

58. 如权利要求 57 所述的方法,其中从骨髓获得所述培养物。

59. 如权利要求 57 所述的方法,其中从脐带血获得所述培养物。
60. 如权利要求 57 所述的方法,还包括将所述细胞给予有需要的个体。
61. 刺激表达 CXCR-2 的细胞迁移的方法,包括用酪氨酰-tRNA 合成酶多肽接触所述细胞,由此刺激所述表达 CXCR-2 的细胞迁移。
62. 如权利要求 61 所述的方法,其中接触所述细胞的步骤体外或离体发生。
63. 如权利要求 61 所述的方法,其中接触步骤包括给予有需要的个体包含有效浓度的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的组合物。
64. 减轻个体的肺部炎症和 / 或其症状的方法,包括给予所述个体有效浓度的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽,由此减轻所述个体的肺部炎症和 / 或其症状。
65. 如权利要求 64 所述的方法,其中所述个体患有慢性阻塞性肺部疾病 (COPD)。
66. 如权利要求 64 所述的方法,其中所述酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的给药对于实现循环中的嗜中性细胞对变应原的脱敏是有效的。

酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的血小板生成活性

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据 35 u. s. c. § 119(e), 要求于 2008 年 6 月 11 日提交的美国临时专利申请第 61/060, 747 号的权益, 该临时申请被通过引用的方式以其整体并入本文。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 与本申请相关的序列表以代替纸件的文本形式提供, 并据此通过引用的方式并入说明书。含有序列表的文本文件的名称是 120161_409PC_SEQUENCE_LISTING.txt。该文本文件为 37KB, 创建于 2009 年 6 月 10 日, 并通过 EFS-Web 电子提交。

技术领域

[0005] 本发明一般地涉及血小板生成组合物, 该组合物包含酪氨酰-tRNA 合成酶多肽, 包括其截短体和 / 或变体, 以及涉及利用这种组合物治疗疾病或疾病状态的方法, 所述疾病或疾病状态受益于增加的血小板生成, 诸如与血小板减少症有关的疾病或疾病状态。

[0006] 发明背景

[0007] 血小板减少症一般涉及其中个体的每单位体积外周血的血小板数目低于正常的疾病状态。例如, 正常血小板计数一般为约 $150,000/\text{mm}^3$ 至约 $450,000/\text{mm}^3$, 而血小板减少症的特征通常为血小板计数降低到约 $100,000/\text{mm}^3$ 或更少。

[0008] 血小板 (Platelets) 或凝血细胞 (thrombocytes) 是无色的血细胞, 其在血液凝集中通过聚集在一起和在血管洞形成栓塞而发挥重要作用。血小板生成指血小板从前体造血细胞诸如巨核细胞形成的过程。血小板生成主要受促血小板生成素的调节, 促血小板生成素进一步受多种机制调节, 诸如应答增加的血小板水平时受体介导的摄取和破坏等。

[0009] 血小板减少症与许多潜在的因素有关, 诸如增加的血小板的破坏、减少的血小板产生、血小板的消耗、血小板的诱捕, 以及药剂诱发的血小板减少症。考虑到血小板在血凝中的中心作用, 血小板减少症的最初症状通常包括多种形式的出血和紫癜。因为个体处于增加的出血风险中, 早期诊断和治疗是重要的, 特别是阻止进展为更为严重的症状, 诸如脑出血。

[0010] 降低的血小板计数的疾病状态的治疗通常受病因学和疾病严重度指导。目前可用的用于血细胞减少症以及相关疾病状态的治疗包括, 例如, 皮质类固醇类、IVIG、脾切除术和血小板输注, 这些方法是减轻性非特异的, 或者是强烈的但昂贵的。此外, 以前利用血小板生成的主要生物介质促血小板生成素的努力在临床上没有取得成功, 因为在患者观察到严重效应, 所述患者产生了对该药物的免疫反应, 以及随后产生对他们自己的内源性促血小板生成素的免疫反应。促血小板生成素模拟物和促血小板生成素受体的小分子激活剂在开发中, 但尚未得到食品和药物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 的批准。

[0011] 催化 tRNA 分子的氨酰化的氨酰-tRNA 合成酶在翻译过程中对于解码遗传信息是必不可少的。在高等真核生物中, 氨酰-tRNA 合成酶与其他多肽结合以形成超分子多酶复合物。每种真核生物的 tRNA 合成酶由核心酶和另外的结构域组成, 核心酶与对应的原核 tRNA 合成酶密切相关, 所述另外的结构域附加在核心酶的氨基末端或羧基端。例如, 人酪氨

酰-tRNA 合成酶 (YRS) 具有羧基末端结构域,其不是原核生物和低等真核生物的 YRS 分子的一部分。

[0012] 氨酰 tRNA 合成酶,诸如酪氨酰-tRNA 合成酶,目前与哺乳动物细胞内的扩展功能有关,包括信号转导通路中的活性等。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明源自以下意想不到的发现:包含酪氨酰-tRNA 合成酶 (YRS) 多肽的组合物,包括其截短的和/或变异的多肽,刺激体内血小板生成(即增加血小板形成)。因此,本发明的实施方案一般可以用于治疗和/或降低发展为与血小板减少症或降低的血小板水平有关的疾病或疾病状态。

[0015] 某些实施方案包括增加个体内血小板计数的方法,其包括给予个体包含血小板生成有效浓度的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的组合物,由此增加个体内的血小板计数。某些实施方案包括治疗个体血小板减少症或降低个体发展为血小板减少症的风险的方法,其包括给予个体包含血小板生成有效浓度的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的组合物,由此治疗个体的血小板减少症或降低个体发展为血小板减少症的风险。某些实施方案包括刺激个体的血小板生成的方法,包括给予个体包含血小板生成有效浓度的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的组合物,由此刺激个体的血小板生成。某些实施方案包括维持个体(例如,经历与降低的血小板计数有关的治疗的个体)的血小板计数的方法,其包括给予个体包含血小板生成有效浓度的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的组合物,由此维持个体的血小板计数。

[0016] 某些实施方案包括刺激个体的巨核细胞迁移、增殖和/或分化的方法,其包括给予个体血小板生成有效浓度的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽,由此刺激个体的巨核细胞增殖和/或分化。某些实施方案包括刺激个体的嗜中性细胞迁移或增殖的方法,其包括给予个体血小板生成有效浓度的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽,由此刺激个体的嗜中性细胞增殖。

[0017] 在某些方面,个体患与降低的或减少的血小板计数有关的疾病或疾病状态,或者处于患与降低的或减少的血小板计数有关的疾病或疾病状态的风险中。在某些方面,个体具有约 100,000/mm³ 或更低的、约 110,000/mm³ 或更低的、约 120,000/mm³ 或更低的、约 130,000/mm³ 或更低的、约 140,000/mm³ 或更低的、或者约 150,000/mm³ 或更低的血小板计数。在某些实施方案中,与降低的或减少的血小板计数有关的疾病或疾病状态包括,但不限于出血、瘀伤、鼻衄(鼻出血)、脾功能亢进、低体温、Epstein-Barr 病毒感染、传染性单核细胞增多症、Wiskott-Aldrich 综合征、母源性噻嗪类药物摄入、先天性缺巨核细胞性血小板减少症、血小板减少-桡骨缺失综合征、范科尼贫血 (Fanconi Anemia)、巨大血小板综合征 (Bernard-Soulier syndrome)、May-Hegglin 畸形 (May-Hegglin anomaly)、灰白血小板综合征 (Grey platelet syndrome)、奥尔波特综合征 (Alport syndrome)、新生儿风疹、再生障碍性贫血、骨髓增生异常综合征、白血病、淋巴瘤、骨髓的肿瘤、癌症、营养缺乏、放射接触、肝功能衰竭、细菌性脓毒症、麻疹、登革热、HIV 感染或 AIDS、早熟、胎儿成红细胞增多症 (erythroblastosis fetalis)、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、母源性 ITP、溶血尿毒症综合征、弥散性血管内凝血、血栓性血小板减少性紫癜 (TTP)、输血后紫癜、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、新生儿同种免疫血小板减少症、和阵发性睡眠性血红蛋白尿症、丙型肝炎病毒感染 (HCV)、药剂诱发的血小板减少症、和化疗诱发的血小板增多症 (CIT),以及本领域已知的其他疾病。在某些方面,个体是血小板供者。

[0018] 在某些实施方案中,与降低的或减少的血小板计数有关的疾病状态是由药剂或药品诱发的(例如,药剂诱发的血小板减少症、化疗诱发的血小板增多症)。降低血小板计数的药剂或药品可以选自化疗剂、非甾体抗炎剂、磺胺类药、万古霉素、氯吡格雷、糖蛋白 IIb/IIIa 抑制剂、干扰素、丙戊酸、阿昔单抗、利奈唑胺(linezolid)、法莫替丁、美贝维林(mebeverine)、组胺阻断剂、烷化剂、肝素、乙醇和抗生素。在某些实施方案中,化疗剂可以选自顺铂(CDDP)、卡铂(carboplatine)、甲基苄肼(procarbazine)、氮介、环磷酰胺、喜树碱、异环磷酰胺(ifosfamide)、美法仑(melphalan)、苯丁酸氮芥、白消安、亚硝基尿、更生霉素(dactinomycin)、道诺霉素、阿霉素(doxorubicin)、博来霉素、普卡霉素(plicomycin)、丝裂霉素、依托泊苷(VP 16)、他莫昔芬、雷洛昔芬、雌激素受体结合剂、紫杉酚、吉西他滨、长春瑞宾、法尼基蛋白转移酶抑制剂、反铂(transplatinum)、5-氟尿嘧啶、长春新碱、长春花碱和甲氨蝶呤、Temazolomide(DTIC 水性形式),或者前述的任一类似物或衍生物变体。

[0019] 在要求保护的方法的某些实施方案中,酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含哺乳动物酪氨酰-tRNA 合成酶,包括在它的C末端截短的哺乳动物酪氨酰-tRNA 合成酶。在本文提供的某些方法中,酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO:1,2,3,6,8,10,12 或 14 的氨基酸序列,其中约 1-50 个氨基酸残基从它的C末端截去。在本文提供的某些方法中,酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO:1,2,3,6,8,10,12 或 14 的氨基酸序列,其中约 50-100 个氨基酸残基从它的C末端截去。在某些实施方案中,酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO:1,2,3,6,8,10,12 或 14 的氨基酸序列,其中约 100-150 个氨基酸残基从它的C末端截去。在其他实施方案中,酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO:1,2,3,6,8 或 10 的氨基酸序列,其中约 150-200 个残基从它的C末端截去。在其他实施方案中,本文提供的方法包括其中酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO:1,2,3,6,8 或 10 的氨基酸序列,其中约 200-250 个氨基酸残基从它的C末端截去。C-末端截短的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的特定实例包括如下的多肽:其包含或由 SEQ ID NOS:1,2 或 3 所示的氨基酸序列的氨基酸 1-343、氨基酸 1-344、氨基酸 1-350、氨基酸 1-353 或氨基酸 1-364 组成。C-末端截短的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的另外实例包括 SEQ ID NOS:3 和 8 的多肽。

[0020] 在本发明方法的某些实施方案中,酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含在其N-末端截短的哺乳动物酪氨酰-tRNA 合成酶。在本文提供的某些方法中,酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO:1,2,3,6,8,10,12 或 14 的氨基酸序列,其中约 1-50 个氨基酸残基从它的N-末端截去。在本文提供的某些方法中,酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO:1,2,3,6,8,10,12 或 14 的氨基酸序列,其中约 50-100 个残基从它的N末端截去。在某些实施方案中,酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO:1,2,3,6,8,10,12 或 14 的氨基酸序列,其中约 100-150 个氨基酸残基从它的N-末端截去。在其他实施方案中,酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO:1,2,3,6,8 或 10 的氨基酸序列,其中约 150-200 个残基从它的N-末端截去。在其他实施方案中,本文提供的方法包括其中酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NO:1,2,3,6,8 或 10 的氨基酸序列,其中约 200-250 个氨基酸残基从它的N-末端截去。N-末端截短的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的特定实例包括 SEQ ID NOS:6,10,12 和 14 的多肽。

[0021] 在本文提供的某些方法中,酪氨酰-tRNA 合成酶多肽选自:(a) 包含与 SEQ ID NO:

2 中所示的氨基酸序列至少 80% 一致的氨基酸序列的多肽, 其中在 341 位的丙氨酸不被酪氨酸取代; (b) 包含与 SEQ ID NO: 2 中所示的氨基酸序列至少 90% 一致的氨基酸序列的多肽, 其中在 341 位的丙氨酸不被酪氨酸取代; (c) 包含与 SEQ ID NO: 2 中所示的氨基酸序列至少 95% 一致的氨基酸序列的多肽, 其中在 341 位的丙氨酸不被酪氨酸取代; (d) 包含与 SEQ ID NO: 2 中所示的氨基酸序列至少 98% 一致的氨基酸序列的多肽, 其中在 341 位的丙氨酸不被酪氨酸取代; 以及 (e) 包含 SEQ ID NO: 2 中所示的氨基酸序列的多肽。

[0022] 在本文提供的某些方法的实施方案中, 酪氨酰-tRNA 合成酶多肽选自 (a) 包含与 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 或 14 中所示的氨基酸序列至少 80% 一致的氨基酸序列的多肽; (b) 包含与 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 或 14 中所示的氨基酸序列至少 90% 一致的氨基酸序列的多肽; (c) 包含与 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 或 14 中所示的氨基酸序列至少 95% 一致的氨基酸序列的多肽; (d) 包含与 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 或 14 中所示的氨基酸序列至少 98% 一致的氨基酸序列的多肽; 以及 (e) 包含 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 或 14 中所示的氨基酸序列的多肽。

[0023] 除了本文所描述的方法外, 本发明的某些实施方案包括适合用于给药的组合物, 其包含本文所描述的生理学上可接受的赋形剂和 / 或载体, 以及血小板生成有效浓度的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽。其中, 该组合物能够刺激血小板生成 (例如, 增加或维持个体的血小板计数)、刺激巨核细胞增殖和 / 或分化、和 / 或刺激个体的嗜中性细胞增殖。在某些组合物中, 如上文和本文其他位置所描述的, 酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含在它的 C- 末端截短的哺乳动物酪氨酰-tRNA 合成酶。在某些组合物中, 如上文和本文其他位置所描述的, 酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含在它的 N- 末端截短的哺乳动物酪氨酰-tRNA 合成酶。

[0024] 在某些实施方案中, 本文所描述的血小板生成组合物包含酪氨酰-tRNA 合成酶多肽, 其选自: (a) 包含与 SEQ ID NO: 2 中所示的氨基酸序列至少 80% 一致的氨基酸序列的多肽, 其中在 341 位的丙氨酸不被酪氨酸取代; (b) 包含与 SEQ ID NO: 2 中所示的氨基酸序列至少 90% 一致的氨基酸序列的多肽, 其中在 341 位的丙氨酸不被酪氨酸取代; (c) 包含与 SEQ ID NO: 2 中所示的氨基酸序列至少 95% 一致的氨基酸序列的多肽, 其中在 341 位的丙氨酸不被酪氨酸取代; (d) 包含与 SEQ ID NO: 2 中所示的氨基酸序列至少 98% 一致的氨基酸序列的多肽, 其中在 341 位的丙氨酸不被酪氨酸取代; 以及 (e) 包含 SEQ ID NO: 2 中所示的氨基酸序列的多肽。

[0025] 在某些实施方案中, 本文所描述的血小板生成组合物包含酪氨酰-tRNA 合成酶多肽, 其选自: (a) 包含与 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 或 14 中所示的氨基酸序列至少 80% 一致的氨基酸序列的多肽; (b) 包含与 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 或 14 中所示的氨基酸序列至少 90% 一致的氨基酸序列的多肽; (c) 包含与 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 或 14 中所示的氨基酸序列至少 95% 一致的氨基酸序列的多肽; (d) 包含与 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 或 14 中所示的氨基酸序列至少 98% 一致的氨基酸序列的多肽; 以及 (e) 包含 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 或 14 中所示的氨基酸序列的多肽。

[0026] 在某些实施方案中, 本发明的组合物还包含第二酪氨酰-tRNA 合成酶多肽, 包括其中两个酪氨酰-tRNA 合成酶多肽形成二聚体。在某些方面, 该二聚体是同型二聚体。在其他方面, 该二聚体是异质二聚体, 例如全长酪氨酰-tRNA 合成酶多肽和截短的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽之间的异质二聚体。在某些实施方案中, 本发明的组合物还包含异源性多肽, 其

中酪氨酰-tRNA 合成酶多肽和异源性多肽形成异质二聚体,例如双功能异质二聚体。

[0027] 在某些实施方案中,本文所提供的血小板生成组合物包含生理学上可接受的赋形剂和/或载体,以及血小板生成有效浓度的嵌合的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽,其中嵌合的多肽包含酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的两个或更多个生物活性片段,其中所述两个或更多个片段包含 YRS 多肽的至少 10 个连续的氨基酸,其中所述两个或更多个片段相连接以形成嵌合的多肽,以及其中嵌合的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽能够刺激个体的血小板生成和/或增加个体的血小板计数。

[0028] 在某些实施方案中,本文所提供的血小板生成组合物包含生理学上可接受的赋形剂和/或载体,以及血小板生成有效浓度的嵌合的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽,其中嵌合的多肽包含 (a) 酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的一个或多个生物活性片段,其中所述一个或多个片段包含 YRS 多肽的至少 10 个连续的氨基酸;以及 (b) 一个或多个异源性多肽,其中 (a) 中的一个或多个片段和 (b) 中的一个或多个异源性多肽相连接以形成嵌合的多肽,以及其中嵌合的多肽能够刺激个体的血小板生成(即,增加或维持个体的血小板计数)、刺激巨核细胞增殖和/或分化、和/或刺激个体的嗜中性细胞增殖。

[0029] 某些实施方案涉及刺激早期巨核细胞祖细胞增殖和/或分化的方法,其包括用酪氨酰-tRNA 合成酶多肽孵育造血干细胞的培养物足够的时间以允许早期巨核细胞祖细胞的增殖,从而刺激早期巨核细胞祖细胞的增殖和/或分化。在某些实施方案中,离体或体外实施该方法。在某些实施方案中,培养物从骨髓获得。在某些实施方案中,培养物从脐带血获得。在某些实施方案中,这种方法还包括将所述细胞给予有需要的个体。

[0030] 某些实施方案涉及刺激表达 CXCR-2 的细胞迁移的方法,其包括,用酪氨酰-tRNA 合成酶多肽接触该细胞,从而刺激表达 CXCR-2 的细胞的迁移。在某些实施方案中,接触细胞的步骤在体外或离体发生。在某些实施方案中,接触的步骤包括给予有需要的个体组合物,该组合物包含有效浓度的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽。

[0031] 某些实施方案涉及减轻个体的肺部炎症和/或其症状的方法,其包括给予个体有效浓度的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽,从而减轻个体的肺部炎症和/或其症状。在某些实施方案中,个体有慢性阻塞性肺部疾病(COPD)。在某些实施方案中,酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的给药对实现循环中的嗜中性细胞对变应原的脱敏是有效的。

[0032] 附图简述

[0033] 图 1 显示了人酪氨酰-tRNA 合成酶的全长氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。

[0034] 图 2 显示了全长人酪氨酰-tRNA 合成酶的 Y341A 变体的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)。

[0035] 图 3 显示了具有血小板生成活性的 C-末端截短的(氨基酸 1-364)人酪氨酰-tRNA 合成酶的氨基酸序列(SEQ ID NO:3)。

[0036] 图 4 显示了编码人酪氨酰-tRNA 合成酶的全长氨基酸序列的多核苷酸序列(SEQ ID NO:4)。

[0037] 图 5(a) 和 5(b) 显示了截短的人酪氨酰-tRNA 合成酶给药后对血小板数的体内影响。对于图 5(a),给小鼠一天两次皮下注射 1、3 和 10 μ g/kg 的 C-末端截短的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽(SEQ ID NO:3),注射 7 天,所述多肽具有 8 氨基酸的 C-末端标签 L-E-H-H-H-H-H-H(SEQ ID NO:5),并在研究结束时确定血小板计数。对于图 5(b),给小鼠

一天两次皮下注射 $3 \mu\text{g/kg}$ 的与图 5(a) 相同的 C-末端截短的多肽,注射 7 天,并在研究结束时确定血小板计数。

[0038] 图 6 显示了具有 8 氨基酸 C-末端标签 L-E-H-H-H-H-H-H(SEQ ID NO:5) 的 C-末端截短的人酪氨酰-tRNA 合成酶多肽给药后对巨核细胞数目的体内影响。一天两次给动物皮下注射 3 和 $300 \mu\text{g/kg}$ 的 SEQ ID NO:3 的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽,注射 6 天并在研究结束时检测骨髓和脾的组织学,所述多肽具有 8 氨基酸 C-末端标签 (SEQ ID NO:5)。

[0039] 图 7 显示了 SP1 人酪氨酰-tRNA 合成酶剪接变体的氨基酸序列 (SEQ ID NO:6),其表示了全长野生型 YRS 多肽序列的 N-末端截短的变体。SP1 剪接变体具有与野生型序列没有序列相似性的 8 或 9 个 N-末端氨基酸。"X" 表示任意氨基酸。

[0040] 图 8 显示了编码 SEQ ID NO:6 的 SP1 人酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的核酸序列 (SEQ ID NO:7)。

[0041] 图 9 显示了 SP2 人酪氨酰-tRNA 合成酶剪接变体的氨基酸序列 (SEQ ID NO:8),其表示全长野生型 YRS 多肽序列的 C-末端截短的变体。SP2 变体具有与野生型序列没有序列相似性的 35 个 C 末端氨基酸。"X" 表示任意氨基酸。

[0042] 图 10 显示了编码 SEQ ID NO:8 的 SP2 人酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的核酸序列 (SEQ ID NO:9)。

[0043] 图 11 显示了 SP3 人酪氨酰-tRNA 合成酶剪接变体的氨基酸序列 (SEQ ID NO:10),其表示全长野生型 YRS 多肽序列的 N-末端截短的变体。

[0044] 图 12 显示了编码 SEQ ID NO:10 的 SP3 人酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的核酸序列 (SEQ ID NO:11)。

[0045] 图 13 显示了 SP4 人酪氨酰-tRNA 合成酶剪接变体的氨基酸序列 (SEQ ID NO:12),其表示全长野生型 YRS 多肽序列的 N-末端截短的变体。

[0046] 图 14 显示了编码 SEQ ID NO:12 的 SP4 人酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的核酸序列 (SEQ ID NO:13)。

[0047] 图 15 显示了 SP5 人酪氨酰-tRNA 合成酶剪接变体的氨基酸序列 (SEQ ID NO:14),其表示全长野生型 YRS 多肽序列的 N-末端截短的变体。SP5 变体具有与野生型序列没有相似性的约 8 个 N-末端氨基酸。"X" 表示任意氨基酸。

[0048] 图 16 显示了编码 SEQ ID NO:14 的 SP5 人酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的核酸序列 (SEQ ID NO:15)。

[0049] 图 17 举例说明了野生型 (WT) 人酪氨酰-tRNA 合成酶的可选择的基因剪接,如可选择的剪接变体 SP1 至 SP5 的 cDNA 序列所表示的。

[0050] 图 18 提供了人酪氨酰-tRNA 合成酶剪接变体 SP1 至 SP5 的 cDNA 序列的 NCBI 注释。

[0051] 图 19 描绘了与全长人 YRS 多肽相比,SP1 至 SP5 YRS 多肽的预期和报告的开放读码框架的蛋白序列比对。

[0052] 图 20 显示了 YRS 多肽在大鼠中的血小板生成活性 (参见实施例 4)。

[0053] 图 21 显示了 M07e 原巨核细胞应答 YRS 多肽刺激时的迁移 (参见实施例 5)。

[0054] 图 22 显示了酪氨酰-tRNA 合成酶多肽促进 THP-1 细胞到 HUVEC-2 细胞的内皮单层的细胞粘附 (参见实施例 6)。

[0055] 图 23 显示了酪氨酰 -tRNA 合成酶多肽增加了粘附分子 VCAM-1 在 HUVEC-2 细胞的内皮单层中的表达 (参见实施例 6)。

[0056] 图 24 显示了酪氨酰 -tRNA 合成酶多肽刺激转染了 CXCR-2 受体的 293 和 CHO 细胞系的迁移 (参见实施例 7)。图 24 的左图显示了 293/CXCR-2 细胞的结果 ;以及图 24 的右图显示了 CHO/CXCR-2 细胞的结果。

[0057] 图 25 显示了 YRS 多肽对多形核 (PMN) 细胞迁移的刺激作用 (参见实施例 8)。

[0058] 图 26 显示了酪氨酰 -tRNA 合成酶多肽对骨髓细胞培养物中的巨核细胞祖细胞的影响,如通过集落数目所测定的 (参见实施例 10)。图 26 (A) 显示了 YRS 多肽对原始谱系限制性祖细胞或早期祖细胞的集落形成的刺激作用,以及图 26 (B) 和 (C) 分别显示了 YRS 多肽对相对成熟的中间祖细胞 (B) 和晚期祖细胞 (C) 的抑制作用。

[0059] 发明详述

[0060] 本发明涉及以下意想不到的发现 :包括其截短体和变体在内的酪氨酰 -tRNA 合成酶 (YRS) 多肽能够模拟和刺激正常的血小板生成过程,并且因此具有治疗上有益的血小板生成活性。因此,本发明的某些实施方案涉及使用 YRS 多肽刺激天然的血小板生成过程,并且从而增加有需要的个体,诸如患有与血小板减少 (例如,减少的血小板计数) 有关的疾病的个体的血小板产生。与其他治疗方法相比,使用 YRS 多肽的优势包括 :例如,不同于传统治疗的作用机制,与促血小板生成素信号的协同作用,更高的效能,以及与使用去免疫性分子有关的益处 (例如,不受潜在的针对促血小板生成素不利的免疫应答的影响)。其他的优势对本领域的技术人员是显而易见的。

[0061] 除非特别相反地指明,本发明的实施可以利用本技术领域内的分子生物学和重组 DNA 技术的常规方法,其中的许多方法出于示例的目的描述于下文。这些技术在文献中被充分地解释。参见,例如 Sambrook, et al., *Molecular Cloning :A Laboratory Manual* (第 2 版,1989) ;Maniatis et al, *Molecular Cloning :A Laboratory Manual* (1982) ; *DNA Cloning :A Practical Approach*, vol. I & II (D. Glover, ed.) ; *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984) ; *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985) ; *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984) ; *Animal Cell Culture* (R. Freshney, ed., 1986) ; *A Practical Guide to Molecular Cloning* (B. Perbal, ed., 1984)。

[0062] 本文引用的所有的出版物、专利和专利申请都通过引用的方式以其整体并入。

[0063] 定义

[0064] 除非另外指明,本文所用的所有技术和科学术语都具有与本领域所属技术人员所通常理解的含义相同的含义。尽管在实施或检验本发明时可以使用与本文所述的相似或等同的任何方法和材料,本文描述了优选的方法和材料。出于本发明的目的,如下定义以下术语。

[0065] 本文使用的冠词“a”和“an”指该冠词的一个或多个 (即至少一个) 语法对象。例如,“an element”指一个元件或多个元件。

[0066] 所用“约”指与参考的量、水平、值、数、频率、百分比、尺度、尺寸、数额、重量或长度多达 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 或 1% 不同的量、水平、值、数、频率、百分比、尺度、尺寸、数额、重量或长度。

[0067] 适用于参照多核苷酸或多肽序列的术语“生物活性片段”是指具有至少约 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 % 或更多的参照序列活性的片段。下述的生物活性片段包含在本发明的范围内:长度至少约 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400 或更多(包括两者之间的所有整数)个连续的核苷酸或氨基酸残基的生物活性片段,其包含或编码参照多核苷酸或多肽的血小板生成活性,例如参照多肽序列 SEQ ID NOS:1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 和 14, 或参照核苷酸序列 SEQ ID NOS:4, 7, 9, 11, 13 和 15。生物活性片段的特定实例包括但不限于 C-末端截短的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽,该酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含以下氨基酸或由以下氨基酸组成:SEQ ID NO:1 中所示的氨基酸序列中的氨基酸 1-343, 氨基酸 1-344, 氨基酸 1-350, 氨基酸 1-353 或氨基酸 1-364, 以及 SEQ ID NOS:3 和 6 的多肽。生物活性片段的其他实例包括但不限于 N-末端截短的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽,该酪氨酰-tRNA 合成酶多肽包含 SEQ ID NOS:6, 10, 12 和 14 中所示的氨基酸序列或由 SEQ ID NOS:6, 10, 12 和 14 中所示的氨基酸序列组成。代表性的生物活性片段通常参与相互作用,例如分子内的或分子间的相互作用。分子间的相互作用可以是特异性结合相互作用或酶性相互作用。分子间的相互作用可以在 YRS 多肽和靶分子之间,该靶分子诸如与调节血小板生成过程有关的靶分子。YRS 多肽的生物活性片段包括多肽片段,该多肽片段包含与 SEQ ID NOS:1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 或 14 中的任一个的氨基酸序列充分相似或一致的氨基酸序列,或衍生自 SEQ ID NOS:1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 或 14 中的任一个的氨基酸序列,包括其血小板生成有效的部分;或由 SEQ ID NOS:4, 7, 9, 11, 13 和 15 的核苷酸序列编码。

[0068] 所用的“编码序列”是指有助于编码基因的多肽产物的任一核酸序列。与之相反,术语“非编码序列”是指无助于编码基因的多肽产物的任一核酸序列。

[0069] 整个说明书中,除非上下文另外要求,词语“包含(comprise)”、“包含(comprises)”、“包含(comprising)”被理解为意指包括陈述的步骤或元素或者步骤或元素的组,但不排除任何其他的步骤或元素或者步骤或元素的组。

[0070] 所用“由...组成(consisting of)”指包括且限于跟随在词组“由...组成”后的任何内容。因此,词组“由...组成”表明所列出的元素是必需的或强制的,以及可以不存在其他元素。所用“基本上由...组成(consisting essentially of)”指包括列在该词组后的任何元素,并限于不妨碍或不促进在所列元素的公开内容中指明的活性或作用的其他元素。因此,词组“基本上由...组成”表明所列元素是必需的或强制的,但其他元素是任选的,可以存在或可以不存在,这取决于它们是否影响所列元素的活性或作用。

[0071] 术语“互补的”和“互补性”是指碱基配对法则相关的多核苷酸(即,核苷酸序列)。例如,序列“A-G-T”和序列“T-C-A”是互补的。互补性可以是“部分的”,其中依照碱基配对法则只有部分核酸的碱基是匹配的。或者,核酸之间可以有“完全的”或“全部的”互补性。核酸链间的互补性程度对核酸链间的杂交的效率和强度具有重要的影响。

[0072] 所用的“对应(corresponds to)”或“对应(corresponding to)”是指(a)具有与参照多核苷酸序列的全部或部分基本上一致或互补的核苷酸序列的多核苷酸,或者编码与肽或蛋白中的氨基酸序列一致的氨基酸序列的多核苷酸;或者(b)具有与参照肽或蛋白

中的氨基酸序列基本上一致的氨基酸序列的肽或多肽。

[0073] 所用“衍生物”指通过修饰衍生自基本序列的多肽，例如通过与另外的化学部分的结合或络合（例如，聚乙二醇化）或者通过本领域所理解的翻译后修饰技术。术语“衍生物”在其范围内还包括对母体序列作出的改变，包括提供功能上等同分子的添加或删除。

[0074] 如本文所使用的，“功能”和“功能的”等术语是指生物学上的、酶的或临床上的功能。

[0075] 所用的“基因”是指遗传单元，其位于染色体上的特定基因座，以及由转录的和/或翻译的调节序列、和/或编码区、和/或非翻译序列（即，内含子、5' 和 3' 非翻译序列）组成。

[0076] “同源性”是指一致的或组成性保守取代的氨基酸的百分数。同源性可以利用诸如 GAP (Deveraux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12, 387-395) 的序列比对程序来确定，其通过引用的方式并入本文。通过这种方式，可以通过在比对中插入空位来比较具有与本文中所引用的序列相似或基本上不同的长度的序列，这种空位可以通过例如利用 GAP 的比较算法来确定。

[0077] 术语“宿主细胞”包括个体细胞或细胞培养基，其可以是或已经是本发明的任一重组载体或分离的多核苷酸的受体。宿主细胞包括单一宿主细胞的子代，且由于天然的、偶然的或有意的突变和/或改变，该子代可以不必与原始的母代细胞完全一致（在形态学上或在总 DNA 互补物中）。宿主细胞包括用本发明的重组载体或多核苷酸在体内或体外转染或感染的细胞。包含本发明的重组载体的宿主细胞是重组体宿主细胞。

[0078] 所用“分离的”指基本上或实质上没有在其天然状态下通常伴随它的组分的物质。例如，本文使用的“分离的多核苷酸”指其已经从天然存在状态中位于其侧面的序列中纯化的多核苷酸，例如，从序列中离开的 DNA 片段，该序列通常邻近所述片段。可选地，本文所用的“分离的肽”或“分离的多肽”等指肽或多肽分子从它天然的细胞环境中以及从与细胞的其他组分的结合中体外分离和/或纯化，即，它不与体内物质结合。

[0079] 术语“从……获得”是指诸如例如，多核苷酸提取物或多肽提取物的样品从个体的特定来源分离，或来自个体的特定来源。例如，提取物可以从直接分离自个体的组织或生物流体获得。

[0080] 本文所用的术语“寡核苷酸”是指由经磷酸二酯键（或与其相关的结构变体或合成的类似物）连接的多个核苷酸残基（脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸，或与其相关的结构变体或合成的类似物）组成的多聚体。因此，虽然术语“寡核苷酸”通常是指其中的核苷酸残基及核苷酸残基间的键是天然形成的核苷酸多聚体，但也应该了解，各种类似物也包含在该术语范围内，包括但不限于肽核酸 (PNAs)、氨基磷酸酯、硫代磷酸酯、甲基磷酸酯、2-O-甲基核糖核酸等。分子的确切尺寸可以根据特定的应用改变。寡核苷酸在长度上通常相当短，一般约为 10 ~ 30 个核苷酸残基。尽管术语“多核苷酸”或“核酸”通常用于大的寡核苷酸，但术语“寡核苷酸”可以指任何长度的分子。

[0081] 本文中使用的术语“可操作地连接”指将结构基因置于启动子的调控下，然后该启动子调控所述基因的转录和任选地翻译。在构建异源启动子/结构基因组合中，通常优选地是将遗传序列或启动子置于距基因转录起始位点一定距离处，该距离近似等同于该遗传序列或启动子与它在天然条件（即遗传序列或启动子起源的基因）中调控的基因之间的距

离。如本领域已知的,可以允许该距离的一些变化,而没有功能的损失。类似地,调节序列元件相对于置于其控制下的异源基因的优选定位由该元件在它天然条件(即它来源的基因)中的定位限定。

[0082] 本文使用的叙述“多核苷酸”或“核酸”指代 mRNA, RNA, cRNA, cDNA 或 DNA。该术语通常指至少 10 个碱基长度的多聚形式的核苷酸,核糖核苷酸或脱氧核苷酸或任一类型的核苷酸的修饰形式。该术语包括单链和双链形式的 DNA。

[0083] 术语“多核苷酸变体”和“变体”等指下述多核苷酸:展示了与参照多核苷酸序列或在下文定义的严紧条件下与参照序列杂交的多核苷酸基本的序列一致性。这些术语还包括通过至少一个核苷酸的添加、删除或取代区别于参照多核苷酸的多核苷酸。因此,术语“多核苷酸变体”和“变体”包括其中一个或多个核苷酸被添加或删除,或者被另外的核苷酸取代的多核苷酸。在这方面,本领域已知,可以对参照多核苷酸作出包括突变、添加、删除和取代在内的某些改变,由此改变的多核苷酸保留参照多核苷酸的生物功能或活性。多核苷酸变体包括,例如,与 SEQ ID NO:4 所示的序列或其编码血小板生成性酪氨酸-tRNA 合成酶多肽的生物活性片段的部分具有至少 50% (以及至少 51% 至至少 99% 和两者之间的所有整数百分比) 序列一致性的多核苷酸。术语“多核苷酸变体”和“变体”还包括天然存在的等位变体。

[0084] “多肽”、“多肽片段”、“肽”和“蛋白”在本文交替使用,指氨基酸残基的聚合体以及其变体和合成的类似物。因此,这些术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是合成的非天然存在的氨基酸(诸如相应天然存在氨基酸的化学类似物)的氨基酸聚合体,以及适用于天然存在的氨基酸聚合体。

[0085] 术语“酪氨酸 RNA 合成酶”和“酪氨酸-tRNA 合成酶”在本文交替使用,指本发明的“YRS”多肽。

[0086] 叙述的“YRS 多肽”、“YRS 多肽片段”、“截短的 YRS 多肽”或“其变体”包括,但不限于具有与 SEQ ID NOS:1,2,3,6,8,10,12 或 14 的任一个所示的参照序列(包括其生物活性片段,诸如具有参照序列至少 10,20,30,40,50,60,70,80,90,100,120,140,160,180,200 或更多个(包括两者之间的所有整数)的连续氨基酸)共享至少 50% (和至少 51% - 至少 99% 以及两者之间的所有整数百分比) 序列一致性的氨基酸序列的多肽。这些叙述还包括 YRS 多肽的天然等位变体,其可以存在和发生在一个种或属到另一个种或属。

[0087] 包括其截短体和/或变体在内的 YRS 多肽包括如下多肽:其展示了参照 YRS 多肽的至少约 10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,100%,110%,120%,130%,140%,150%,200%,300%,400%,500%,600%,700%,800%,900%,1000% 或更大的特异性生物活性(即,诸如具有个体内或体外的血小板生成活性)。出于本申请的目的,可以通过测量 YRS 多肽增加个体的血小板计数或增加个体的巨核细胞数目(参见,例如实施例 1) 的能力来定量 YRS- 相关的生物活性。此外,用于测量人血小板产生的合适的动物模型在 Suzuki et al, European Journal of Haematology 78:123-130,2007 中被描述,其通过引用的方式并入本文。用于测量血小板生成活性的合适的体外模型被描述于实施例 2 中,并且还包括测定巨核细胞集落形成,如 Dessypris et al, Exp Hematol. 18:754-7,1990 中所示的。包括其截短体和/或变体的 YRS 多肽是显示了低于野生型 YRS 的特异活性的约 25%,10%,5% 或 1% 的那些,其与野生型参照 YRS 多肽相比,具有明显降低的生物活性。

[0088] 叙述的多肽“变体”指通过至少一个氨基酸残基的添加、删除或取代区别于参照多肽的多肽。在某些实施方案中，多肽变体通过可以是保守的或非保守的一个或多个取代与参照多肽区分。在某些实施方案中，多肽变体包含保守性取代，在这方面，本领域熟知一些氨基酸可以改变为具有广泛相似特性的另一些，而不改变多肽活性的性质。多肽变体还包括其中一个或多个氨基酸被添加或删除、或者被另外氨基酸残基取代的多肽。

[0089] 本发明包括全长 YRS 多肽（例如，具有 Y341A 取代的全长多肽）的变体、全长 YRS 多肽的截短的片段、截短的片段的变体以及它们相关的生物活性片段在本文所述方法中的用途。典型地，YRS 多肽的生物活性片段可以参与相互作用，例如，分子内或分子间的相互作用。分子间相互作用可以是特异性结合相互作用或者酶性相互作用（例如，相互作用可以是暂时的，形成或打断共价键）。YRS 多肽的生物活性片段包括包含氨基酸序列的多肽，所述序列与（假定的）全长 YRS 多肽序列的氨基酸序列充分相似，或源自（假定的）全长 YRS 多肽序列的氨基酸序列，诸如 SEQ ID NO:1，或其部分，诸如 SEQ ID NOS:3,6,8,10,12 和 14 的多肽。一般地，生物活性片段包含具有 YRS 多肽的至少一种活性的结构域或基序，并且可以包括一个或多个（在一些情况下，是全部的）不同活性结构域，以及包括具有血小板生成活性的片段。在一些情况下，YRS 多肽的生物活性片段具有对于特定的截短的片段独特的生物活性（例如，血小板生成活性），这样使得全长 YRS 多肽可能没有该活性。在一些情况下，生物活性可以通过将生物活性 YRS 多肽片段与其他的全长 YRS 多肽序列分离，或者通过改变全长 YRS 野生型多肽序列的某些残基（例如，Y341A）以暴露血小板生成活性结构域而被揭示。截短的 YRS 多肽的生物活性片段可以是多肽片段，其是，例如，SEQ ID NOS:1,2,3,6,8,10,12 或 14 的任一个所示的氨基酸序列的 10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,40,50,60,70,80,90,100,110,120,130,140,150,160,170,180,190,200,220,240,260,280,300,320,340,360,380,400 或更多（包括两者之间的所有整数）个连续的氨基酸。在某些实施方案中，生物活性片段包含血小板生成刺激序列、结构域或基序。适宜地，该生物活性片段具有不低于其衍生的野生型多肽的活性的约 1%，10%，25%，50%。

[0090] 本文所用的叙述“序列一致性”或者例如包含“与...50%一致的序列”指序列在比较窗中基于一个一个核苷酸或基于一个一个氨基酸一致的程度。因此，“序列一致性百分比”可以通过以下来计算：比较两个在比较窗中最优比对的序列，确定相同的核酸碱基（例如 A, T, C, G, I）或相同的氨基酸残基（例如，Ala, Pro, Ser, Thr, Glu, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys 和 Met）在两条序列中出现的位置的数目以得到匹配的位置数，将匹配的位置数除以比较窗中总位置数（即，窗大小），并将得到的结果乘以 100 以得到序列一致性百分比。

[0091] 用于描述两个或更多个多核苷酸或多肽间的序列关系的术语包括“参照序列”、“比较窗”、“序列一致性”、“序列一致性百分比”和“基本一致性”。“参照序列”是长度为至少 12 个但通常是 15 至 18 个，经常是至少 25 个单体单位（包括核苷酸和氨基酸残基）。因为两个多核苷酸各自可以包含（1）在两个多核苷酸间相似的序列（即，完整多核苷酸序列的仅一部分）和（2）在两个多核苷酸间不同的序列，两个（或更多个）多核苷酸间的序列比较通常通过比较“比较窗”中的两个多核苷酸的序列来进行以鉴定和比较序列相似性的局部区域。“比较窗”指至少 6 个连续位置、通常为约 50 至约 100 个、更通常约 100 至 150 个

的连续位置的概念节段,其中在一序列与具有相同连续位置数的参照序列最优比对后,将该序列与参照序列比较。比较窗可以包含与参照序列(其不包含添加或删除)相比约 20% 或更少的添加或删除(即空位)用于两个序列的最优比对。用于比对比较窗的序列的最优比对可以通过算法的计算机运行(Wisconsin遗传学软件包发行版 7.0(Genetics Software Package Release 7.0)中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA)或通过目测以及选择的各种方法的任一种产生的最佳比对(即,产生整个比较窗的最高同源性百分比)来实施。例如 Altschul et al, 1997, Nucl. Acids Res. 25 :3389 公开的 BLAST 程序家族也可以作为参考。可以在 Ausubel et al, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, 第 15 章的 19.3 单元中找到序列分析的详细讨论。

[0092] 本文所用的“个体”包括呈现能够用本发明的血小板生成性 YRS 多肽治疗的症状或处于呈现该症状风险中的任何动物。合适的个体(患者)包括实验室动物(诸如小鼠、大鼠、兔或豚鼠)、农场动物、和家养动物或宠物(诸如猫或狗)。非人灵长类,以及优选的人患者包括在内。典型的个体包括呈现异常量的一种或多种生理活性、或者处于呈现异常量的一种或多种生理活性的风险中的动物,所述异常量的生理活性能够通过血小板生成多肽来调节,诸如降低的或减少的血小板计数(即,血小板减少症)。典型地,患有血小板减少症或者如本文所用的“减少的”的血小板计数的个体指与正常的血小板计数相比,血小板计数降低至约 100,000/mm³ 或更低、约 110,000/mm³ 或更低、约 120,000/mm³ 或更低、约 130,000/mm³ 或更低、约 140,000/mm³ 或更低、约 150,000/mm³ 或更低的个体。如本文所用的,个体“正常”的血小板计数通常为约 150,000/mm³ 至 450,000/mm³。作为一个实例,“个体”还可以将经历、正在经历或已经经历移植过程,诸如干细胞或骨髓移植。个体还可以具有肺部病症或疾病,诸如慢性阻塞性肺疾病(COPD),和/或正患肺部炎症。

[0093] 如本文所用的“血小板生成”指血小板或凝血细胞的形成。

[0094] 如本文所描述的,酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的“血小板生成有效浓度”指能够“治疗”个体的量,诸如“有效”刺激或增强血小板生成,如一般通过增加的血小板水平、维持的血小板水平、增加的巨核细胞数和/或增加的嗜中性细胞产生所测量的。

[0095] “巨核细胞”一般指负责对正常的凝血必需的血液凝血细胞(即血小板)产生的骨髓细胞。巨核细胞通常占 1/10000 个骨髓细胞。巨核细胞衍生自骨髓中的多能造血干细胞前体细胞。促血小板生成素(TPO)是巨核细胞产生的主要信号,即 TPO 足以但并非绝对必需用于诱导骨髓中的祖细胞向终末巨核细胞表型分化。用于巨核细胞分化的其他分子信号包括 GM-CSF, IL-3, IL-6, IL-1, 趋化因子(SDF-1; FGF-4)和促红细胞生成素。

[0096] 巨核细胞被认为通过以下谱系发育:CFU-Me(多能造血干细胞或原始血细胞)→原巨核细胞→前巨核细胞→巨核细胞。在原巨核细胞阶段,细胞失去了分裂的能力,但仍能够复制其 DNA 和继续发育,成为多倍体。成熟时,巨核细胞开始产生血小板的过程。促血小板生成素在诱导巨核细胞形成小的原血小板过程或者形成用于在释放前储存血小板的胞质内膜中发挥作用。释放时,这些原血小板过程中的每个能够产生 2000-5000 个新血小板。总之,约 2/3 的新释放的血小板会留在循环中,以及约 1/3 会被脾扣押。释放血小板后,剩下的细胞核通常跨过骨髓屏障到达血液,在肺中被肺泡巨噬细胞消耗。

[0097] “嗜中性细胞”或嗜中性粒细胞一般指人中数量大的一类白细胞,其与嗜碱性细胞

和嗜酸性细胞一起形成了多形核细胞家族 (PMNs) 的部分。嗜中性细胞可以根据它们在苏木精和伊红 (H&E) 组织学或细胞学制备中的独特染色特征容易地鉴定。嗜中性细胞正常存在于血流中,但在炎症 (主要是感染或癌症的结果) 的开始 (即,急性) 阶段是迁移到炎症部位的第一组炎症细胞之一。通常,嗜中性细胞首先通过血管、然后通过间质组织迁移,追随在炎症部位起源的化学信号 (例如,白介素-8 (IL-8)、干扰素- γ (IFN- γ) 和 C5a)。“嗜中性细胞减少症”指存在低嗜中性细胞计数,其能够由先天 (遗传性) 病症导致,它能够因为其他疾病状态发生,如在再生障碍性贫血或某些类型的白血病的情况下。某些药剂,诸如化疗剂也可以导致嗜中性细胞减少症。嗜中性细胞减少症有明显的感染倾向。嗜中性细胞减少症还可以由细胞内嗜中性寄生物的定殖导致。

[0098] 所用“增强 (enhance)”或“增强 (enhancing)”,或者“增加 (increase)”或“增加 (increasing)”,或者“刺激 (stimulate)”或“刺激 (stimulating)”一般指与无 YRS 多肽导致的反应或对照分子 / 组合物导致的反应相比,一种或多种药剂或组合物在细胞内产生或导致更大的生理反应的能力。可测量的生理反应可以包括更强的细胞生长、扩增或迁移等,这从本领域的理解和本文的描述是显而易见的。在本领域已知的方法中,体外集落形成测定代表本文提供的测量对药剂的细胞反应的一种方式。“增加的”或“增强的”量通常是“统计学上显著的”量,并可以包括为没有 YRS 多肽 (缺乏试剂) 时或对照组合物产生的量的 1.1, 1.2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 或更大倍数 (例如, 500, 1000 倍) (包括两者之间并大于 1 的所有整数和小数点,例如 1.5, 1.6, 1.7, 1.8 等) 的增加。

[0099] 一般地,术语“减少”涉及本发明的一种或多种 YRS 多肽“降低”相关生理或细胞反应的能力,诸如疾病或疾病状态的症状 (例如,肺部炎症等),如根据诊断领域的常规技术所测量的。相关反应的一个具体实例包括免疫细胞 (例如,嗜中性细胞) 向某些组织诸如肺的迁移。其他相关的生理或细胞反应 (体内或体外的) 对本领域技术人员是显而易见的。与无 YRS 多肽或对照组合物产生的反应相比,反应的“降低”可以是统计学上显著的。

[0100] “迁移”指细胞迁移,这是可以根据常规体外测定测量的过程,如本文所述的以及本领域已知的 (参见,例如,实施例 8)。迁移还指体内迁移,诸如细胞从一组织迁移到另一组织 (例如,从骨髓迁移到外周血,或者从外周血迁移到肺组织),或者从一个组织的部位迁移到同一组织的另一部位。体内迁移 (例如趋化作用) 通常发生在应答感染或损伤的 / 刺激的组织时。

[0101] “分化”指较不特化的细胞 (例如,多能、全能、专能等) 变为更特化的细胞类型的过程。

[0102] “脱敏”一般指减少或消除了生物体对物质或刺激物如变应原或刺激剂 (包括外来抗原以及“自身抗原”) 的不利 (病理学的) 免疫反应。例如,某些肺部疾病或疾病状态与对外源刺激剂诸如烟的不利反应有关,这样使嗜中性细胞对这些刺激剂脱敏可以预防 (即,减少发生的风险) 或减少这些疾病或疾病状态,和 / 或它们的症状。

[0103] 如本文所用的,“治疗 (Treatment)”或“治疗 (treating)”包括对与血小板减少症 (即,减少的血小板水平) 或发展为血小板减少症的风险相关的疾病或疾病状态的症状或病理产生的任何所需的效应,并且可以包括被治疗的疾病或疾病状态的一个或多个可测量的标志物的即便最小的变化或改善。“治疗 (Treatment)”或“治疗 (treating)”并不必然表示疾病或疾病状态或其相关症状的彻底根除。接受该治疗的个体是有需要的任何动

物,包括灵长类,特别是人,以及诸如马、牛、猪和羊的其他动物,以及通常的家禽和宠物。如本文所述的,临床改善的示例性标志物包括血小板生成的 YRS 多肽给药后增加的血小板计数、维持正常血小板计数、和 / 或增加的巨核细胞数。

[0104] 所用“载体”指在其中可以插入或克隆多核苷酸的多核苷酸分子,优选 DNA 分子,例如来自质粒、噬菌体、酵母或病毒的 DNA 分子。载体优选包含一个或多个独特的限制性位点,并能够在包括靶细胞或组织或者其祖细胞或组织在内的限定的宿主细胞中自主复制,或者与限定的宿主的基因组整合以使克隆的序列可复制。因此,载体可以是自主复制的载体,即作为染色体外实体存在的载体,其复制独立于染色体的复制,例如,线性或闭环质粒、染色体外元件、小型染色体或人工染色体。载体可以包含用于确保自我复制的任何元件。可选择地,载体可以是当导入宿主细胞时,被整合进基因组并与它被整合进的染色体一起复制的载体。载体系统可以包含单一载体或质粒,两个或更多个载体或质粒,其一起包含待被导入宿主细胞基因组的总 DNA,或者转位子。载体的选择通常会依赖于载体与它被导入的宿主细胞的相容性。在本例中,载体优选是在细菌细胞中具有可操作功能的载体。载体还可以包括选择性标志物,诸如能够用于选择合适的转化子的抗生素抗性基因。

[0105] 术语“野生型”和“天然存在的”交替使用,指具有从天然存在的来源分离的基因或基因产物的特征的基因或基因产物。野生型基因或基因产物(例如,多肽)是在群体中最常见的,并因此任意地指定为基因的“正常”或“野生型”形式。

[0106] 血小板生成性酪氨酰-tRNA 多肽以及其变体

[0107] 本发明部分涉及意外的发现:某些酪氨酰-tRNA 合成酶多肽,包括其截短体和 / 或变体,模拟并刺激体内的天然血小板生成过程。因此,本发明的血小板生成性多肽包括全长酪氨酰-tRNA 合成酶多肽,以及酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的任何生物活性片段,或者其变体或修饰体,其中所述多肽能够刺激个体内或体外血小板生成(即血小板形成)、巨核细胞增殖和 / 或分化、和 / 或嗜中性细胞增殖。

[0108] 氨酰-tRNA 合成酶,诸如酪氨酰-tRNA 合成酶,通常通过它们的关联氨基酸催化 tRNA 的氨酰化。因为它们在连接氨基酸与 tRNAs 内包含的核苷酸三联子中的中心作用,氨酰-tRNA 合成酶被认为是进化中首先出现的蛋白之一。酪氨酰-tRNA 合成酶特别属于 I 类 tRNA 合成酶家族,其在活性部位具有两个高度保守的序列基序, HIGH 和 KMSKS。I 类 tRNA 合成酶在腺核苷酸的 2'-OH 进行氨酰化,并且通常是单聚或双聚的(分别是一个或两个亚单位)。

[0109] 人酪氨酰-tRNA 合成酶由三个结构域组成:1) 氨基末端 Rossmann 折叠结构域,其负责形成活化的 E. Tyr-AMP 中间物,并在细菌、古菌(archeae)和真核生物中是保守的;2) tRNA 反密码子识别结构域,其在细菌和真核生物间不是保守的;以及 3) 人酪氨酰-tRNA 合成酶独特的羧基末端结构域,其主要结构与假定的人细胞因子内皮单核细胞激活蛋白 II 49%一致,与来自秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的甲硫氨酰-tRNA 合成酶的羧基末端结构域 50%一致,以及与来自酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的 Arclp 羧基末端结构域 43%一致。

[0110] 人酪氨酰-tRNA 合成酶的前两个结构域与来自酿酒酵母、詹氏甲烷球菌(*Methanococcus jannaschii*)和脂肪嗜热芽孢杆菌(*Bacillus. stearothermophilus*)分别有 52, 36 和 16%一致性。已知参与脂肪嗜热芽孢杆菌中的酪氨酰-腺苷酸复合物形成

的 15 个氨基酸中的 9 个在所有生物体中是保守的,而参与 tRNA^{Tyr} 识别的氨基酸不是保守的。大肠杆菌中表达的重组人和脂肪嗜热芽孢杆菌酪氨酰-tRNA 合成酶的动力学分析表示人酪氨酰-tRNA 合成酶氨酰化人但不是脂肪嗜热芽孢杆菌的 tRNA^{Tyr},或者相反。据认为人酪氨酰-tRNA 合成酶的羧基末端结构域从甲硫氨酰基-tRNA 合成酶的羧基末端结构域的基因复制发展而来,并且可以指引 tRNA 到酶的活性部位。

[0111] 真核生物的酪氨酰-tRNA 合成酶的生物片段将蛋白合成与细胞信号传导通路关连,诸如血小板生成。这些片段可以通过可选的剪接或蛋白水解天然产生。例如,如本发明所提供的,前血小板生成 N-末端片段小型-YRS 能够刺激体内血小板生成。此外,全长 YRS 多肽序列的某些突变赋予野生型参照序列增加的血小板生成活性(例如,Y341A)。全长 YRS 多肽序列的截短的剪接变体的实例包括图 17-19 中所述的 SP1-SP5 多肽。

[0112] 包含催化的结构域和反密码子识别结构域的人小型 YRS 的结构(即,SEQ ID NO:3;或者小型-Tyr)已经被报道为1.18 Å的分辨率。然而人和细菌的酶的催化结构域重叠,相对于催化结构域的反密码子识别结构域的空间布置在关于细菌直向同源物(orthologs)的小型 YRS 中是独特的。不希望受任一理论约束,反密码子识别结构域的独特位置可以解释为什么片段小型 YRS 在不同细胞信号传导通路中更有活性。

[0113] 因此,本发明的实施方案包括组合物用于刺激个体的血小板生成的用途,所述组合物包含血小板生成性 YRS 多肽,包括其截短的、变体和/或修饰的多肽。本发明包括的变体蛋白是有生物活性的,即它们继续具有参照 YRS 多肽序列的血小板生成活性(例如,SEQ ID NOS:1,2,3,6,8,10,12 和 14)。这种变体可以由例如基因多态性或由人工操纵而产生。参照 YRS 多肽片段的生物活性变体会具有与参照蛋白的氨基酸序列至少 40%,50%,60%,70%,一般至少 75%,80%,85%,通常约 90%至 95%或者更大,以及典型地约 98%或更大的序列相似性或一致性,如本文其他地方描述的利用缺省参数的序列比对程序所确定的。一般地,参照 YRS 多肽的生物活性变体可以与该蛋白的区别多达 200,100,50 或 20 个氨基酸残基或适宜地少至 1-15 个氨基酸残基、少至 1-10 个,诸如 6-10 个、少至 5 个、少至 4、3、2 或甚至 1 个氨基酸残基。在一些实施方案中,YRS 多肽与 SEQ ID NOS:1,2,3,6,8,10,12 和 14 中的参照序列的不同达至少一个但少于 15,10 或 5 个氨基酸残基。在另外的实施方案中,它与 SEQ ID NOS:1,2,3,6,8,10,12 和 14 中的参照序列的不同达至少一个残基但少于残基的 20%,15%,10%或 5%。

[0114] YRS 多肽可以以不同方式改变,包括氨基酸取代、删除、截短和插入。用于这种操纵的方法通常是本领域已知的。例如,截短的和/或变异的 YRS 多肽的氨基酸序列变体可以通过 DNA 中的突变制备。用于诱变和核苷酸序列改变的方法是本领域已知的。例如,参见 Kunkel (1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:488-492), Kunkel et al. (1987, Methods in Enzymol, 154:367-382), U. S. Pat. No. 4,873,192, Watson, J. D. et al. ("Molecular Biology of the Gene", 第四版, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif, 1987) 以及其中引用的参考文献。关于不影响感兴趣蛋白的生物活性的合适氨基酸取代的指导可以见于 Dayhoff et al., (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D. C) 的模型中。本领域已知用于筛选组合文库基因产物的方法以及用于筛选 cDNA 文库具有选定特性的基因产物的方法,所述组合文库通过点突变或截短制备。这些方法适用于通过 YRS 多肽的组合诱变产生的基因文库的快速筛选。增强文库中的

功能突变体频数的技术,递归集合诱变 (Recursive ensemble mutagenesis) (REM) 可以用于与筛选测定组合以鉴定 YRS 多肽变体 (Arkin and Yourvan(1992)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 :7811-7815 ;Delgrave et al. , (1993)Protein Engineering,6 :327-331)。保守性取代,诸如将一个氨基酸与具有相似特性的另一个氨基酸交换,可以是理想的,如下文更详细地讨论的。

[0115] 血小板生成活性截短的和 / 或变体 YRS 多肽可以在沿它们序列不同位置包含保守性氨基酸取代,如与参照 YRS 氨基酸序列所比较的 (例如,SEQ ID NOS :1,2,3,6,8,10,12 或 14)。“保守性氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基替代的取代。具有类似侧链的氨基酸残基家族已在本领域中被定义,其通常可以如下进行亚分类:

[0116] 酸性的:残基由于丢失了 H 离子在生理 pH 下带负电荷,以及该残基被水性溶液吸引以使它在包含它的肽在生理 pH 的水性介质中时寻找该肽构象的表面位置。具有酸性侧链的氨基酸包括谷氨酸和天冬氨酸。

[0117] 碱性的:残基由于结合 H 离子在生理 pH 下或其一个或两个 pH 单位内带正电荷 (例如,组氨酸),以及该残基被水性溶液吸引以使它在包含它的肽在生理 pH 的水性介质中时寻求该肽构象的表面位置。具有碱性侧链的氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。

[0118] 带电荷的:残基在生理 pH 下带电荷,并且因此包括具有酸性或碱性侧链的氨基酸 (即,谷氨酸、天冬氨酸、精氨酸、赖氨酸和组氨酸)。

[0119] 疏水的:残基在生理 pH 下不带电荷,并且该残基在水性溶液中被排斥以使它在包含它的肽在水性介质中时寻求该肽构象的内部位置。具有疏水侧链的氨基酸包括酪氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸和色氨酸。

[0120] 中性 / 极性的:残基在生理 pH 下不带电荷,但该残基不足以被水性溶液排斥以使它会在包含它的肽在水性介质中时寻求该肽构象的内部位置。具有中性 / 极性侧链的氨基酸包括天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、组氨酸、丝氨酸和苏氨酸。

[0121] 该说明还将某些氨基酸表征为“小的”,因为它们的侧链不足够大到提供疏水性,即便缺乏极性基团。除脯氨酸外,“小”氨基酸是具有 4 个或更少的碳的那些,其时至少一个极性基团在侧链上,另三个碳或更少不在侧链上。具有小侧链的氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸和苏氨酸。基因编码的次级氨基酸脯氨酸是特例,由于它已知的对肽链的次级构象的影响。脯氨酸的结构与所有其他天然存在的氨基酸的不同在于它的侧链结合到 α -氨基基团的氮,以及 α -碳。然而,几个氨基酸相似矩阵 (例如,PAM120 矩阵和 PAM250 矩阵,如例如 Dayhoff et al. , (1978), A model of evolutionary change in proteins. Matrices for determining distance relationships In M. O. Dayhoff, (ed.), Atlas of protein sequence and structure, Vol. 5, pp. 345-358, National Biomedical Research Foundation, Washington DC ;以及 Gonnet et al. , (Science, 256 :14430-1445, 1992 所公开的) 将脯氨酸与甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸和苏氨酸包括在同一组中。因此,出于本发明的目的,脯氨酸被分类为“小”氨基酸。

[0122] 用于极性或非极性分类所需的吸引或排斥程度是主观的,因此,本发明特别包括的氨基酸已经被分类为一种或另一种。没有具体命名的大多数氨基酸可以基于已知的行为进行分类。

[0123] 氨基酸残基可以进一步亚分类为环状的或非环状的,芳香族的或非芳香族的,与

残基侧链取代基因有关的自明的分类,以及分类为小的或大的。如果残基包括羧基碳在内总共含 4 个碳原子或更少,被视为小的,前提是存在额外的极性取代基,三个或更少的不存在。当然,小残基一直不是芳香族的。取决于它们的结构特性,氨基酸残基可以分为两类或更多类。对于天然存在的蛋白氨基酸,根据该方案的亚分类呈现在表 A 中。

[0124] 表 A

[0125] 氨基酸亚分类

[0126]

亚分类	氨基酸
酸性的	天冬氨酸、谷氨酸
碱性的	非环状的: 精氨酸、赖氨酸; 环状的: 组氨酸
带电荷的	天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、赖氨酸、组氨酸
小的	甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸、苏氨酸、脯氨酸
极性的/中性的	天冬酰胺、组氨酸、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸
极性的/大的	天冬酰胺、谷氨酰胺
疏水的	酪氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸
芳香族的	色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸
影响链定向的残基	甘氨酸和脯氨酸

[0127] 保守性氨基酸取代还包括基于侧链的分组。例如,具有脂肪族侧链的氨基酸组是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;具有脂肪族-羟基侧链的氨基酸组是丝氨酸和苏氨酸;具有含酰胺侧链的氨基酸组是天冬酰胺和谷氨酰胺;具有芳香侧链的氨基酸组是苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;具有碱性侧链的氨基酸组是赖氨酸、精氨酸和组氨酸;以及具有含硫侧链的氨基酸组是半胱氨酸和甲硫氨酸。例如,预期异亮氨酸或缬氨酸取代亮氨酸、谷氨酰胺取代天冬酰胺、丝氨酸取代苏氨酸、或者用结构相关的氨基酸取代氨基酸的类似取代不会对产生的变异多肽的特性产生大的影响是合理的。是否氨基酸变化会产生功能的截短的和/或变异 YRS 多肽可以通过检测它的活性容易地确定,如本文所描述的(参见,例如实施例 1 和 2)。保守性取代显示在标题为“示例性取代”的表 B 中。落入本发明范围的氨基酸取代一般通过选择在它们以下效应中不会显著不同的取代来实现:维持 (a) 取代区域内的肽骨架的结构、(b) 分子在靶部位的电荷或疏水性、或 (c) 侧链的体积。引入取代后,筛选变体的生物活性。

[0128] 表 B

[0129] 示例性氨基酸取代

[0130]

原始的残基	示例性取代	优选的取代
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

[0131]

[0132] 可选择地,用于产生保守性取代的类似氨基酸可以基于侧链的鉴定分为三类。第一组包括谷氨酸、天冬氨酸、精氨酸、赖氨酸、组氨酸,其都具有带电荷的侧链;第二组包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺;以及第三组包括亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、甲硫氨酸,如 Zubay, G., Biochemistry, 第三版, Wm. C. Brown Publishers (1993) 所描述的。

[0133] 因此,在截短的和/或变异 YRS 多肽中的预测的非必需氨基酸残基通常被来自同一侧链家族的另一氨基酸残基取代。可选择地,突变可以沿着 YRS 编码序列的全部或部分

随机引入,诸如通过饱和诱变,以及可以筛选产生的突变体的母体多肽的活性以鉴定保留该活性的突变体。编码序列诱变后,可以重组表达编码的肽,以及确定肽的活性。“非必需”氨基酸残基是能够从实施方案多肽的野生型序列改变的残基,而没有消除或基本上改变其一种或多种活性。适宜地,改变基本上不会消除这些活性的一种,例如,活性至少为野生型的 20%,40%,60%,70% or 80% 100%,500%,1000%或更多。“必需的”氨基酸残基是当从参照截短的 YRS 多肽的野生型序列改变后,导致母体分子的活性消除的残基,致使存在的野生型活性不到 20%。例如,这类必需氨基酸残基包括在不同种类间的 YRS 多肽中保守的那些,包括在来自不同来源的 YRS 多肽的血小板生成刺激结合部位或基序中保守的那些序列。

[0134] 因此,本发明还包括天然存在的 YRS 多肽序列的变体或它们的生物活性片段,其中所述变体通过一个或多个氨基酸残基的添加、删除或取代区别于天然存在的序列。一般地,变体会显示与参照 YRS 多肽序列(例如,SEQ ID NOS:1,2,3,6,8,10,12 和 14 中所示的序列)至少约 30,40,50,55,60,65,70,75,80,85,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99%的相似性或序列一致性。而且,包括以下序列,其通过 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 或更多个氨基酸的添加、删除或取代不同于天然或母体序列,但保留母体或参照 YRS 多肽序列的特性。在某些实施方案中,SEQ ID NOS:1,2,3,6,8,10,12 或 14 中的任一个的 C-末端或 N-末端区可以被截短 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,15,20,25,30,35,40,45,50,60,70,80,90,100,150,200,250 或更多个氨基酸,包括两者之间的所有整数(例如,101,102,103,104,105),只要截短的 YRS 多肽能够刺激个体内或体外的血小板生成(即,血小板形成)、巨核细胞增殖和/或分化,和/或嗜中性细胞增殖。

[0135] 在某些实施方案中,变异的多肽与参照 YRS 序列的不同在于至少一个但少于 50,40,30,20,15,10,8,6,5,4,3 或 2 个氨基酸残基。在另外的实施方案中,变异的多肽与 SEQ ID NOS:1,2,3,6,8,10,12 或 14 的对应序列的不同在于至少 1%但少于 20%,15%,10%或 5%的残基。(如果这种比较需要比对,序列应该进行最大相似性的比对。从删除或插入或错配“环”出的序列被认为是不同的)。适宜地,不同是非必需残基或保守取代的不同或变化。

[0136] 在某些实施方案中,变异的多肽包括具有与例如 SEQ ID NOS:1,2,3,6,8,10,12 或 14 所示的 YRS 多肽的对应序列至少约 50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,91%,92%,93%,94% 95%,96%,97%,98%或更大序列一致性或相似性的氨基酸序列,其具有刺激个体的血小板生成、刺激个体的巨核细胞的增殖和/或分化、和/或刺激个体的嗜中性细胞增殖的能力。YRS 多肽变体的实例包括,但不限于,具有选自 R93Q 取代、I14L 取代、N17G 取代、L27I 取代、A85S 取代和 V156L 取代的一个或多个氨基酸取代的全长 YRS 多肽,或其截短体或剪接变体,以及其组合。YRS 多肽变体的特定实例包括,但不限于,带有 R93Q 取代的具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-364 的 YRS 多肽、带有 I14L 取代的具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-353 的 YRS 多肽、带有 N17G 取代的具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-353 的 YRS 多肽、带有 L27I 取代的具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-353 的 YRS 多肽、带有 A85S 取代的具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-353 的 YRS 多肽、以及带有 V156L 取代的具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-353 的 YRS 多肽。

[0137] 两序列间的序列相似性或序列一致性(术语在本文可互换使用)的计算如下实

施。为了确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的一致性百分比,出于最优比较的目的,将序列比对(例如,可以在第一和第二氨基酸或核酸序列中的一个或两者中引入空位以用于最优比对,出于比较目的,可以不管非同源性序列)。在某些实施方案中,出于比较目的比对的参照序列的长度是参照序列的长度的至少 30%,优选至少 40%,更优选至少 50%,60%,以及甚或更优选至少 70%,80%,90%,100%。然后比较在对应氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸。当在第一序列的一个位置被与在第二序列的对应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,则所述分子在该位置是一致的。

[0138] 两序列间的一致性百分比是被所述序列共享的相同位置数的函数,将空位数、每一空位的长度考虑在内,其需要被引入用于两序列的最优比对。

[0139] 两序列间的序列比较和一致性百分比的确定可以利用数学运算法则来实现。在优选的实施方案中,两氨基酸序列间的一致性百分比利用已并入 GCG 软件包 (<http://www.gcg.com> 可以得到) 的 GAP 程序的 Needleman 和 Wunsch 算法 (1970, J. Mol. Biol. 48 : 444-453) 来确定,利用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵,空位权重为 16,14,12,10,8,6 或 4,以及长度权重为 1,2,3,4,5 或 6。在另一优选的实施方案中,两核苷酸序列间的一致性百分比利用 GCG 软件包 (<http://www.gcg.com> 中得到) 的 GAP 程序来确定,利用 NWSgapdna. CMP 矩阵和 40,50,60,70 或 80 的空位权重以及 1,2,3,4,5 或 6 的长度权重。特别优选组的参数(除非特别指明,应该利用的一组)是 Blossum 62 得分矩阵,空位罚分为 12,空位延伸罚分为 4,以及移码空位罚分为 5。

[0140] 两氨基酸和核苷酸序列间的一致性百分比可以利用 E. Meyers 和 W. Miller (1989, Cabios, 4 : 11-17) 的算法来确定,该算法并入 ALIGN 程序 (2.0 版) 中,利用 PAM120 权重残基表,空位长度罚分为 12,空位罚分为 4。

[0141] 本文描述的核酸和蛋白序列可以用作“查询序列”以进行对公开数据库的检索,例如,以鉴定其他家族成员或相关序列。可以利用 Altschul, et al, (1990, J. Mol. Biol, 215 : 403-10) 的 NBLAST 和 XBLAST 程序 (2.0 版) 进行这类检索。可以利用 NBLAST 程序、得分 = 100, 字长 = 12 来进行 BLAST 核苷酸检索以获得与本发明的核酸分子同源的核苷酸序列。可以利用 XBLAST 程序、得分 = 50、字长 = 3 来进行 BLAST 蛋白检索以获得与本发明的蛋白分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的带空位的比对,可以利用 Altschul et al., (1997, Nucleic Acids Res, 25 : 3389-3402) 中描述的带空位的 BLAST。当利用 BLAST 和带空位的 BLAST 程序时,可以利用各自程序(例如, XBLAST 和 NBLAST) 中的缺省参数。

[0142] 能够通过筛选 YRS 多肽突变体的组合文库来鉴定 YRS 多肽的变体。YRS 蛋白编码序列的文库或例如 N 末端、C 末端或内部片段的片段可以用于产生片段的杂群用于 YRS 多肽的变体的筛选和随后选择。

[0143] 用于筛选点突变或截短产生的组合文库基因产物的方法,以及用于筛选具有选定特性的基因产物的 cDNA 文库的方法是本领域已知的。这类方法适用于快速筛选 YRS 多肽的组合诱变产生的基因文库。

[0144] 本发明还包括 YRS 嵌合的或融合蛋白用于刺激血小板生成的用途。如本文所用的, YRS “嵌合的蛋白”或“融合蛋白”包括与另一 YRS 多肽相连(例如,以产生多重片段)、与非 YRS 多肽相连、或与这两者相连的 YRS 多肽或多肽片段。“非 YRS 多肽”指具有与不同于 YRS 蛋白的蛋白对应的氨基酸序列的“异源多肽”,其来自相同或不同的生物体。融合蛋

白的 YRS 多肽能够对应于全部或部分的生物活性 YRS 氨基酸序列。在某些实施方案中, YRS 融合蛋白包括 YRS 蛋白的至少一种(或两种)生物活性部分。形成融合蛋白的多肽通常是连接的 C-末端到 N-末端, 尽管它们还可以是连接的 C-末端到 C-末端、N-末端到 N-末端或者 N-末端到 C-末端。融合蛋白的多肽可以为任何顺序。

[0145] 可以设计和包括融合伴侣以用于实质上任何所需的目的, 只要它们不对多肽的血小板生成活性产生不利影响。例如, 在一个实施方案中, 融合伴侣可以包含辅助蛋白以高于天然重组蛋白的产量表达的序列。可以选择另外的融合伴侣以增加蛋白的溶解性或使蛋白被靶向所需的细胞内区室。

[0146] 融合蛋白可以包括对配体具有高亲和力的部分。例如, 融合蛋白可以是 GST-YRS 融合蛋白, 其中 YRS 序列可以融合到 GST 序列的 C-末端。作为另一实施例, YRS 多肽可以融合到 C-末端的 8 氨基酸标签, 诸如 L-E-H-H-H-H-H-H(SEQ ID NO:5) 标签。在某些实施方案中, YRS 多肽的氨基酸 1-364 被融合到 C-末端的 365-L-E-H-H-H-H-H-H-372(SEQ ID NO:5) 标签。这种融合蛋白能够有助于 YRS 多肽的纯化和 / 或鉴定。可选择地, 融合蛋白能够是在其 N-末端包含异源性信号序列的 YRS 蛋白。在某些宿主细胞中, 可以通过使用异源信号序列增加 YRS 蛋白的表达和 / 或分泌。

[0147] 更一般地, 可以利用与诸如 Fc 片段的异源序列的融合来去除血小板生成性 YRS 多肽的不需要的特性或改善所需的特性(例如, 药物动力学特性)。例如, 与异源序列的融合可以增加血小板生成性 YRS 多肽的化学稳定性、降低免疫原性、改善体内靶向和 / 或增加循环半衰期。

[0148] 与异源序列的融合还可以用于产生双功能融合蛋白, 例如不仅能够通过 YRS 多肽刺激血小板生成、巨核细胞增殖和 / 或分化、和 / 或嗜中性增殖, 而且还能够通过异源多肽修饰(即, 刺激或抑制)其他通路的双功能蛋白。这些通路的实例包括, 但不限于, 多种免疫系统相关的通路, 诸如先天或获得性免疫活化通路, 或者细胞生长调节通路, 诸如造血作用和血管生成作用。在某些方面, 异源多肽可以与 YRS 多肽协同作用以刺激个体的血小板生成相关和 / 或造血相关通路。可以用于生成双功能融合蛋白的异源多肽的实例包括, 但不限于, 促血小板生成素、细胞因子(例如, IL-11)、趋化因子和多种造血生长因子, 以及其生物活性片段和 / 或变体。

[0149] 一般地, 融合蛋白可以利用标准的技术来制备。例如, 编码所需融合体的多肽组分的 DNA 序列可以被分别组装, 以及被连接入合适的表达载体。编码一个多肽组分的 DNA 序列的 3' 端被连接(有或没有肽连接子)到编码第二多肽组分的 DNA 序列的 5' 端, 以便这些序列的读码框架同相。这允许翻译成保留两个组分多肽的生物活性的单一融合蛋白。

[0150] 可以利用肽连接子序列将第一和第二多肽组分间隔开一段足以确保每一多肽折叠成它的二级和三级结构的距离, 如果需要的话。利用本领域熟知的标准技术将这种肽连接子序列整合进融合蛋白。可以基于下述因素选择某些肽连接子序列:(1) 它们采用柔韧的伸展的构象的能力;(2) 它们不能采用二级结构, 其能够与第一和第二多肽的功能表位相互作用; 以及(3) 可能与多肽功能表位起作用的疏水性或带电荷残基的缺乏。优选的肽连接子序列包含 Gly, Asn 和 Ser 残基。其他接近中性的氨基酸, 诸如 Thr 和 Ala 也可以用于连接子序列。可以作为连接子有效地使用的氨基酸序列包括 Maratea et al, Gene 40: 39-46(1985); Murphy et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262(1986); U. S. Pat.

No. 4, 935, 233 和 U. S. Pat. No. 4, 751, 180 中公开的那些。一般地,连接子序列可以为 1 至约 50 个氨基酸长度。当第一和第二多肽具有可以用于将功能结构域分开并阻止位阻影响的非必需 N- 末端氨基酸区时,连接子序列不是必需的。

[0151] 连接的 DNA 序列可以可操作地连接到合适的转录或翻译调节元件。负责 DNA 表达的调节元件位于编码第一多肽的 DNA 序列的 5'。类似地,需要结束翻译和转录终止信号的终止密码子存在于编码第二多肽的 DNA 序列的 3'。

[0152] 总之,分离多肽和融合多肽(以及它们的编码核苷酸)。“分离的”多肽或多核苷酸是从其原始环境中移开的那些。例如,天然存在的蛋白被分离,如果它与天然系统中的共存在物质的一些或全部分开的话。优选地,这种多肽是至少约 90% 纯的,更优选地,至少约 95% 纯的,以及最优选地,至少约 99% 纯的。例如,如果多核苷酸被克隆到不是天然环境的一部分的载体中,它被认为是分离的。

[0153] 某些实施方案还包括 YRS 多肽的二聚体。二聚体可以包括,例如两个相同的 YRS 多肽间的同型二聚体、两个不同 YRS 多肽的异质二聚体(例如,全长的 YRS 多肽和截短的 YRS 多肽),和/或 YRS 多肽以及异源多肽间的异质二聚体。某些异质二聚体,诸如 YRS 多肽和异源多肽间的那些,可以是双功能的,如本文所述的。

[0154] 本发明的某些实施方案还包括使用修饰的 YRS 多肽,包括如本文所述的改善 YRS 多肽的所需特征的修饰。本发明的 YRS 多肽的修饰包括在一个或多个组成性氨基酸处的化学的和/或酶性衍生化,包括侧链修饰、骨架修饰以及包括乙酰化、羟基化、甲基化、酰胺化以及连接碳水化合物或脂质部分、辅因子等的 N- 和 C- 末端修饰。示例性修饰还包括 YRS- 多肽的聚乙二醇化(参见,例如,Veronese and Harris, *Advanced Drug Delivery Reviews* 54 :453-456, 2002, 其通过引用的方式并入本文)。

[0155] 在某些方面,可以利用化学选择性连接技术来修饰本发明截短的 YRS 多肽,诸如通过以位点特异性和调控方式连接聚合体。这种技术通常依赖于通过化学的或重组方式将化学选择性锚定物整合进蛋白骨架,以及用携带互补连接子的聚合体进行的随后修饰。作为结果,可以调控产生的蛋白-聚合体结合物的组装过程和共价结构,使得药物特性进行合理的最优化,诸如功效和药物动力学特性(参见,例如 Kochendoerfer, *Current Opinion in Chemical Biology* 9 :555-560, 2005)。

[0156] 本发明的截短的和/或变异的 YRS 多肽可以通过本领域技术人员已知的适合的方法来制备,诸如通过重组技术。例如, YRS 多肽可以通过包括下述步骤的方法来制备:(a) 制备包含多核苷酸序列的构建体,该序列编码截短的 YRS 多肽并被可操作地连接到调节元件;(b) 将构建体导入宿主细胞;(c) 培养宿主细胞以表达截短的 YRS 多肽;以及(d) 从宿主细胞分离截短的和/或变异的 YRS 多肽。在示例性实施方案中,核苷酸序列编码 SEQ ID NOS :1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 或 14 所示的或衍生的多肽序列的至少生物活性部分或者其生物活性变体或片段。利用例如 Sambrook, et al., (1989, 同上),特别是 16 和 17 节;Ausubel et al., (1994, 同上),特别是 10 和 16 章;以及 Coligan et al., *Current Protocols in Protein Science* (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1997),特别是第 1、5 和 6 章中所述的标准方案方便地制备重组 YRS 多肽。

[0157] 除了重组制备方法外,本发明的多肽和其片段可以通过利用固相技术的直接肽合成(Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 55 :2149-2154(1963))来制备。可以利用人工

技术或通过自动化来实施蛋白质合成。例如,利用 Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer(Perkin Elmer) 可以实现自动化合成。可选择地,不同的片段可以分别地通过化学方式合成并利用化学方法进行组合以制备所需的分子。

[0158] 多核苷酸组合物

[0159] 本发明还提供了编码本发明的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的分离的多核苷酸,包括其截短体和/或变体,以及包含所述多核苷酸的组合物。

[0160] 如本文所用的,术语“DNA”和“多核苷酸”和“核酸”指已经被分离独立于特定物种的总基因组 DNA 的 DNA 分子。因此,编码多肽的 DNA 片段指包含一种或多种编码序列的 DNA 片段,其基本上从获得该 DNA 片段的物种的总基因组 DNA 分离或纯化分离。术语“DNA 片段”和“多核苷酸”包括 DNA 片段和所述片段的较小的片段,还包括重组载体,包括,例如质粒、粘粒、噬菌粒、噬菌体、病毒等。

[0161] 如本领域技术人员所理解的,本发明的多核苷酸序列可以包括基因组序列、基因组外和质粒编码的序列和较小的工程化基因片段,其表达或可以被改变为表达蛋白、多肽、肽等。这种片段可以被天然地分离或通过人工修饰性合成。

[0162] 如本领域技术人员所认识的,多核苷酸可以是单链(编码的或反义的)或双链的,以及可以是 DNA(基因组的、cDNA 或合成的)或 RNA 分子。额外的编码或非编码序列可以,但不必须存在于本发明的多核苷酸内,以及多核苷酸可以,但不必须被连接到其他分子和/或支持材料。

[0163] 多核苷酸可以包含天然序列(即,编码酪氨酰-tRNA 合成酶或其部分的内源性序列)或者可以包含所述序列的变体或生物功能性等同体。如下文进一步描述的,多核苷酸变体可以包含一个或多个取代、添加、删除和/或插入,优选地使得编码的多肽的血小板生成活性相对于未修饰的多肽基本上没有被消除。一般地,编码的多肽对血小板生成活性的影响可以如本文所述的进行评价。

[0164] 在额外的实施方案中,本发明提供了分离的多核苷酸,其包含与酪氨酰-tRNA 合成酶相同或互补的不同长度的连续伸展的序列,其中所述分离的多核苷酸编码本文所述的截短的酪氨酰-tRNA 合成酶。

[0165] 编码本申请的 YRS 多肽的示例性核苷酸序列包括全长 YRS 基因,诸如 SEQ ID NOS: 4, 7, 9, 11, 13 和 15 的多核苷酸序列,以及 YRS 基因或其转录子或这些转录子的 DNA 拷贝的全长或基本上全长的核苷酸序列的部分。YRS 核苷酸序列的部分可以编码保留参照多肽的生物活性的多肽部分或片段。编码 YRS 多肽的生物活性片段的 YRS 核苷酸序列的部分可以编码至少约 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 300 或 400 个连续氨基酸残基,或几乎多达存在于全长 YRS 多肽的所有数目的氨基酸。可以容易地理解,本语境下的以及本文的所有其他语境下使用到的“中间长度”指所提到的值之间的任意长度,诸如 101, 102, 103 等;151, 152, 153 等;201, 202, 203 等。

[0166] 本发明的多核苷酸,不管其编码序列的长度,可以与其他 DNA 序列诸如启动子、聚腺苷化信号、额外的限制性酶切位点、多克隆位点、其他编码片段等组合,以使它们总长度可以显著不同。因此可以考虑,可以利用几乎任意长度的多核苷酸片段,其总长度优选受制备的简便和在目的重组 DNA 方法中的用途限制。

[0167] 本发明还包括 YRS 核苷酸序列的变体。核酸变体可以是天然存在的,诸如等位变

体（相同基因座）、同源体（不同基因座）和直系同源体（orthologs）（不同生物体），或者可以是非天然存在的。诸如这些的天然存在的变体可以利用熟知的分子生物学技术来鉴定，例如利用本领域已知的多聚酶链反应（PCR）和杂交技术。非天然存在的变体可以通过诱变技术来制备，包括适用于多核苷酸、细胞或生物体的那些。变体能够包含核苷酸取代、删除、倒置和插入。变异可以发生在编码和非编码区的任一个或两者。变异可以产生保守的和非保守的氨基酸取代（如在编码的产物比较的）。对于核苷酸序列，保守性变体包括编码参照 YRS 多肽的氨基酸序列的那些序列（由于遗传密码子的兼并性），诸如 SEQ ID NOS：1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 和 14 所示的序列。变体核苷酸序列还包括合成衍生的核苷酸序列，诸如那些例如通过利用位点诱变产生的那些，但其仍编码 YRS 多肽。一般地，特定 YRS 核苷酸序列的变体会与该特定的核苷酸序列具有至少约 30%，40% 50%，55%，60%，65%，70%，一般至少约 75%，80%，85%，理想地约 90% to 95% 或更大，以及更适宜地约 98% 或更大的序列一致性，如本文其他地方描述的利用缺省参数的序列比对程序所确定的。

[0168] YRS 核苷酸序列可以用于将对应序列和等位体从其他生物体，特别是其他生物体或微生物体分离。用于核酸序列杂交的方法是本领域容易得到的。按照熟知的技术，来自其他生物体的编码序列可以基于它们与本文所示的编码序列的序列一致性被分离。在这些技术中，已知编码序列的全部或部分被用作探针，其选择性地与其他 YRS 编码序列杂交，所述其他 YRS 编码序列存在于来自选定生物体的克隆的基因组 DNA 片段或 cDNA 片段（即，基因组或 cDNA 文库）群体中。

[0169] 因此，本发明还包括在下述严紧条件下与参照 YRS 核苷酸序列杂交或者与它们的互补物杂交的多核苷酸。如本文使用的，术语“低严紧、中等严紧、高严紧或极高严紧条件下的杂交”描述了用于杂交和洗涤的条件。用于进行杂交反应的指南可以在 Ausubel et al, (1998, 同上)，第 6.3.1-6.3.6 节中找到。在那篇参考文献中描述了水性和非水性方法，可以使用任一种。本文低严紧条件的参考包括以及涵盖用于 42°C 的杂交的至少约 1% v/v 到至少约 15% v/v 的甲酰胺，以及至少约 1M 到至少约 2M 盐；以及至少约 1M 到至少约 2M 盐用于 42°C 的洗涤。低严紧条件还可以包括 1% 牛血清白蛋白 (BSA)、1mM EDTA, 0.5M NaHPO₄ (pH 7.2), 7% SDS 用于 65°C 的杂交，以及用于室温洗涤的 (i) 2x SSC, 0.1% SDS, 或 (ii) 0.5% BSA, 1mM EDTA, 40mM NaHPO₄ (pH 7.2), 5% SDS。低严紧条件的一个实施方案包括在约 45°C 下在 6x 氯化钠 / 柠檬酸钠 (SSC) 中杂交，随后在 0.2x SSC, 0.1% SDS 中洗涤两次，至少在 50°C（对于低严紧条件，洗涤的温度可以增加至 55°C）。中等严紧条件包括和涵盖至少约 16% v/v 到至少约 30% v/v 的甲酰胺和至少约 0.5M 到至少约 0.9M 盐用于 42°C 的杂交，以及至少约 0.1M 到至少约 0.2M 盐用于 55°C 的洗涤。中等严紧条件还可以包括 1% 牛血清白蛋白 (BSA), 1mM EDTA, 0.5M NaHPO₄ (pH 7.2), 7% SDS 用于 65°C 的杂交，以及用于 60-65°C 洗涤的 (i) 2x SSC, 0.1% SDS；或 (ii) 0.5% BSA, 1mM EDTA, 40mM NaHPO₄ (pH 7.2), 5% SDS。中等严紧条件的一个实施方案包括在 6x SSC 中于约 45°C 下杂交，随后是在 0.2x SSC, 0.1% SDS 中于 60°C 下洗涤一次或多次。高严紧条件包括和涵盖至少约 31% v/v 到至少约 50% v/v 的甲酰胺和至少约 0.01M 到至少约 0.15M 盐用于在 42°C 的杂交，以及约 0.01M 到约 0.02M 的盐用于 55°C 的洗涤。高严紧条件还可以包括用于在 65°C 的杂交的 1% BSA, 1mM EDTA, 0.5M NaHPO₄ (pH 7.2), 7% SDS，以及用于在超过 65°C 的温度下洗涤的 (i) 0.2x SSC, 0.1% SDS；或 (ii) 0.5% BSA, 1mM EDTA, 40mM NaHPO₄ (pH 7.2), 1% SDS。高严紧条件的一个实施

方案包括在约 45℃下在 6x SSC 中杂交,随后在 0.2x SSC,0.1% SDS 中于 65℃下洗涤一次或多次。

[0170] 在某些实施方案中,YRS 多肽是由在极高严谨条件下与公开的核苷酸序列杂交的多核苷酸编码。极高严谨条件的一个实施方案包括在 65℃下于 0.5M 磷酸钠,7% SDS 中杂交,随后在 0.2x SSC,1% SDS 中于 65℃下洗涤一次或多次。

[0171] 本领域熟知其他严谨条件,本领域技术人员会认识到能够操纵多种因素来最优化杂交的特异性。最后洗涤的严谨性最优化可以确保高度的杂交。对于具体的实例,参见 Ausubel et al.,同上,在第 2.10.1 至 2.10.16 页以及 Sambrook et al. (1989,同上) 的第 1.101 至 1.104 节。

[0172] 尽管严谨洗涤通常在约 42℃至 68℃的温度下进行,本领域技术人员会认识到,其他温度可以适用于严谨条件。最大杂交率通常发生在低于 T_m 约 20℃至 25℃下以形成 DNA-DNA 杂交体。本领域技术人员熟知 T_m 是熔融温度,或两条互补的多核苷酸序列分离的温度。用于估算 T_m 的方法是本领域熟知的(参见 Ausubel et al.,同上在第 2.10.8 页)。

[0173] 总之,优选匹配的双股 DNA 的 T_m 可以预测为下式的近似值: $T_m = 81.5 + 16.6(\log_{10}M) + 0.41(\% G+C) - 0.63(\% \text{甲酰胺}) - (600/\text{长度})$,其中:M 是 Na^+ 的浓度,优选为 0.01 摩尔至 0.4 摩尔;% G+C 是鸟嘌呤和胞嘧啶碱基之和占碱基总数的百分比,在 30%至 75% G+C 的范围内;%甲酰胺是甲酰胺浓度的体积百分比;长度是 DNA 双股中碱基对的数目。随机错配的碱基对的数目每增加 1%,双股 DNA 的 T_m 降低约 1℃。对于高严谨条件,一般在 $T_m-15^\circ\text{C}$ 下进行洗涤,或对于中等严谨条件,在 $T_m-30^\circ\text{C}$ 下进行洗涤。

[0174] 在杂交方案的一个实例中,包含固定的 DNA 的膜(例如,硝酸纤维素膜或尼龙膜)在含有标记的探针的杂交缓冲液(50%去离子甲酰胺,5x SSC,5x Denhardt's 溶液(0.1%聚蔗糖,0.1%聚乙烯吡咯烷酮和 0.1%牛血清白蛋白),0.1% SDS 和 200mg/mL 变性的鲑鱼精子 DNA)中于 42℃下过夜杂交。然后将膜进行两次相继的中等严谨洗涤(即,2xSSC,0.1% SDS,45℃下进行 15 分钟;随后是在 2x SSC,0.1% SDS50℃下进行 15 分钟),随后是两次相继的更高严谨的洗涤(即,0.2xSSC,0.1% SDS,在 55℃下进行 12 分钟;随后是 0.2x SSC 和 0.1% SDS 溶液,在 65-68℃下进行 12 分钟)。

[0175] 可以利用多种本领域已知和可利用的已确立的技术来制备、操纵和/或表达多核苷酸和其融合物。例如,编码本发明的多肽的多核苷酸序列或其融合蛋白或功能等同物可以用于重组 DNA 分子中以指导截短的和/或变异的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽在适当的宿主细胞中表达。由于遗传密码子固有的简并性,可以产生编码基本上相同或在功能上等同的氨基酸序列的其他 DNA 序列,这些序列可以用于克隆和表达给定的多肽。

[0176] 如本领域技术人员会理解的,在某些实例中制备具有非天然存在密码子的编码多肽的核苷酸序列是有利的。例如,可以选择特定原核或真核宿主优选的密码子以增加蛋白表达速率或以产生具有所需特性的重组 RNA 转录子,诸如半衰期长于从天然存在序列产生的转录子的半衰期。

[0177] 而且,可以利用本领域通常已知的方法设计本发明的多核苷酸序列以便出于不同原因改变多肽编码的序列,包括但不限于修饰基因产物的克隆、加工、表达和/或活性的改变。

[0178] 为了表达目的多肽,编码多肽或功能等同物的核苷酸序列可以被插入适当的表达

载体,即含有用于插入的编码序列转录和翻译所需的元件的载体。本领域技术人员熟知的方法可以用于构建表达载体,所述表达载体含有编码目的多肽的序列和适当的转录和翻译调控元件。这些方法包括体外重组 DNA 技术、合成技术、以及体内遗传重组。这类技术描述于 Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (1989), 和 Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (1989) 中。

[0179] 多种表达载体 / 宿主系统是已知的,并可以被用于包含和表达多核苷酸序列。这些包括但不限于重组噬菌体、质粒或粘粒 DNA 表达载体转化的诸如细菌的微生物;用酵母表达载体转化的酵母;用病毒表达载体(例如,杆状病毒)转染的昆虫细胞系统;用病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒, CaMV;烟草花叶病毒, TMV)转化的或用细菌表达载体(例如, Ti 或 pBR322 质粒)转化的植物细胞系统;或者动物细胞系统。

[0180] 存在于表达载体中的“调控元件”或“调节序列”是载体的那些非翻译区-增强子、启动子、5' 和 3' 非翻译区-其与宿主细胞蛋白相互作用以执行转录和翻译。这类元件在它们的强度和特异性方面可以不同。取决于利用的载体系统和宿主,多种合适的转录和翻译元件包括组成性和诱导性启动子可以使用。例如,当在细菌系统克隆时,可以使用诸如 PBLUESCRIPT 噬菌粒 (Stratagene, La Jolla, Calif.) 或 SPORT1 质粒 (Gibco BRL, Gaithersburg, Md.) 的杂种 lacZ 启动子等的诱导型启动子。在哺乳动物细胞系统中,一般优选来自哺乳动物基因或来自哺乳动物病毒的启动子。如果生成包含编码多肽的序列的多个拷贝的细胞系是必需的,基于 SV40 或 EBV 的载体可以有利地与适当的可选择的标志物一起使用。

[0181] 在细菌系统中,可以选择多种表达载体,这取决于表达的多肽期望的用途。例如,当大量需要时,可以使用指导容易纯化的融合蛋白高水平表达的载体。这种载体包括,但不限于,多功能大肠杆菌克隆和表达载体诸如 BLUESCRIPT (Stratagene), 其中编码目的多肽的序列可以连接到载体中,与编码氨基末端 Met 和随后的 β -半乳糖苷酶的 7 个残基的序列形成框架以产生杂种蛋白;pIN 载体 (Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 264: 5503-5509 (1989)) 等。pGEX 载体 (Promega, Madison, Wis.) 也可以用于将外源多肽表达为带有谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 的融合蛋白。总之,这种融合蛋白是可溶的,并且能够从裂解的细胞中通过吸附到谷胱甘肽-琼脂糖珠以及随后在游离谷胱甘肽存在下的洗脱容易地纯化。在这种系统中制备的蛋白可以被设计为包括肝素、凝血酶或因子 XA 蛋白酶切割位点以使克隆的目的多肽能够任意地从 GST 部分释放出。

[0182] 在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中,可以使用含有组成型或诱导型启动子诸如 α 因子、醇氧化酶和 PGH 的多种载体。关于综述,参见 Ausubel et al. (同上) 和 Grant et al., *Methods Enzymol.* 755:516-544 (1987)。

[0183] 在使用植物表达载体的情况下,可以通过多种启动子的任一种来驱动编码多肽的序列的表达。例如,诸如 CaMV 的 35S 和 19S 启动子的病毒启动子可以单独使用,或者可以与来自 TMV (Takamatsu, *EMBO J.* 5:307-311 (1987)) 的 ω 前导序列组合使用。可选择地,可以使用诸如 RUBISCO 小亚单位或热休克启动子的植物启动子 (Coruzzi et al., *EMBO J.* 5:1671-1680 (1984); Brouge et al., *Science* 224:838-843 (1984); 和 Winter et al., *Results Probl. Cell Differ.* 77:85-105 (1991))。能够通过直接的 DNA 转化或病原体介导的转染将这些构建体导入植物细胞中。这种技术描述于多种通常可以得到的

综述中（参见，例如，Hobbs in McGraw Hill, Yearbook of Science and Technology, pp. 191-196(1992)）。

[0184] 还可以使用昆虫系统来表达目的多肽。例如，在一个这样的系统中，将苜蓿尺蠖核型多角体病毒 (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*, AcMNPV) 用作载体以在草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞或在 *Trichoplusia* 幼虫中表达外源基因。可以将编码多肽的序列克隆入病毒的非必需区，诸如多角体蛋白基因，并置于多角体蛋白启动子的调控下。多肽编码序列的成功插入会使多角体蛋白基因失活并产生缺乏包被蛋白的重组病毒。然后可以将重组病毒用于感染，例如其中目的多肽可以被表达的草地夜蛾细胞或 *Trichoplusia* 幼虫 (Engelhard et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 71: 3224-3227(1994))。

[0185] 在哺乳动物宿主细胞中，通常可以利用多个基于病毒的表达系统。例如，在腺病毒用作表达载体的情况下，编码目的多肽的序列可以连接入腺病毒转录 / 翻译复合体，其由晚期启动子和三联前导子序列组成。在病毒基因组的非必需 E1 或 E3 区的插入可以用于获得能够在感染的宿主细胞中表达多肽的活病毒 (Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 57: 3655-3659(1984))。此外，转录增强子，诸如劳氏肉瘤病毒 (RSV) 增强子或立早 / 早期巨细胞病毒 (CMV) 增强子 / 启动子区可以用于增加在哺乳动物宿主细胞中的表达。

[0186] 还可以使用特异的起始信号以实现编码目的多肽的序列的更有效的翻译。这种信号包括 ATG 起始密码子和邻近序列。在编码多肽的序列、它的起始密码子和上游序列插入适当的表达载体的情况下，可以不需要额外的转录或翻译调控信号。然而，在仅编码序列或其部分插入的情况下，应该提供包括 ATG 起始密码子的外源翻译调控信号。此外，起始密码子应该在正确的读码框架内以确保整个插入物的翻译。外源翻译元件和起始密码子可以是多种来源的，既可以是天然的也可以是合成的。可以通过并入适合于使用的特定细胞系统的增强子来增强表达效率，所述增强子诸如在文献中描述的那些 (Scharf. et al, Results Probl. Cell Differ. 20: 125-162(1994))。

[0187] 此外，可以基于调节插入的序列表达的能力或以所需方式处理表达的蛋白的能力选择宿主细胞株。多肽的这种修饰包括，但不限于，乙酰化、羧基化、糖基化、磷酸化、脂质化和酰化。切割蛋白的 "prepro" 形式的翻译后加工还可以用于促进正确的插入、折叠和 / 或功能。可以选择诸如 CHO, HeLa, MDCK, HEK293 和 WI 38 的不同的宿主细胞以确保外源蛋白正确的修饰和加工，所述宿主细胞具有特异性的细胞机构和特征机制。

[0188] 对于重组蛋白的长期、高产产生，稳定的表达一般是优选的。例如，稳定表达目的多核苷酸的细胞系可以利用表达载体来转化，所述载体可以含有病毒复制起点和 / 或内源表达元件以及相同或分开的载体上的可选择标志物基因。导入载体后，可以允许细胞在富集培养基中生长 1-2 天，然后转换到选择性培养基。可选择的标志物的目的是提供用于选择的抗性，它的存在允许成功地表达导入的序列的细胞的生长和回收。利用适于细胞类型的组织培养技术可以繁殖稳定转化的细胞的抗性克隆。

[0189] 可以利用多种选择系统来回收转化的细胞系。这些包括，但不限于，可以分别用于 tk- 或 aprt- 细胞中的单纯疱疹病毒胸苷激酶 (Wigler et al., Cell 77: 223-232(1977)) 和腺嘌呤磷酸核糖转移酶 (Lowy et al., Cell 22: 817-823(1990)) 基因。另外，抗代谢物、抗生素或除草剂抗性可以作为选择的基础；例如，提供甲氨蝶呤抗性的 dhfr (Wigler et

al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 77 :3567-70(1980)) ;npt, 其提供对氨基糖苷类、新霉素和 G-418 抗性 (Colbere-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150 :1-14(1981)) ;以及 als 或 pat, 其分别提供对氯磺隆和草丁膦 (phosphinotricin) 乙酰转移酶的抗性 (Murry, 同上)。已经描述了额外的可选择的基因, 例如 trpB, 其允许细胞利用吡啶代替色氨酸, 或者 hisD, 其允许细胞利用 histinol 代替组氨酸 (Hartman & Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 55 :8047-51(1988))。可视标志物已得到普遍利用, 这种标志物如花青素、 β -葡萄糖苷酸酶和它的底物 GUS、以及荧光素酶和它的底物荧光素被不仅被广泛用于鉴定转化子, 还用于定量由特定载体系统引起的瞬时或稳定蛋白表达的量 (Rhodes et al., Methods Mol. Biol. 55 :121-131(1995))。

[0190] 用于检测和测量多核苷酸编码的产物的表达的多种方法是本领域已知的, 所述方法利用本领域已知的对所述产物特异的多克隆或单克隆抗体。实例包括酶联免疫吸附测定 (ELISA)、放射免疫测定 (RIA) 和荧光活化的细胞分选 (FACS)。在 Hampton et al., Serological Methods, a Laboratory Manual(1990) 和 Maddox et al., J. Exp. Med. 158 :1211-1216(1983) 中以及其他地方描述了这些和其他测定。

[0191] 本领域技术人员已知的多种标记和结合技术可以用于多种核酸和氨基酸测定。制备用于检测多核苷酸相关序列的标记的杂交或 PCR 探针的方法包括寡核苷酸标记、缺口平移、末端标记或利用标记的核苷酸的 PCR 扩增。可选择地, 序列或其任何部分可以克隆入用于产生 mRNA 探针的载体。这种载体在本领域是已知的, 并且可以商购, 以及可以用于通过添加合适 RNA 聚合酶诸如 T7, T3 或 SP6 和标记的核苷酸体外合成 RNA 探针。这些方法可以利用多种可商购的试剂盒来实施。可以利用的合适的报道分子或标记包括放射性核素、酶、荧光、化学发光或生色剂以及底物、辅因子、抑制剂、磁性颗粒等。

[0192] 用感兴趣的多核苷酸序列转化的宿主细胞可以在适于蛋白从细胞培养物中表达和回收的条件下培养。通过重组细胞产生的蛋白可以取决于使用的序列和 / 或载体被分泌或包含在细胞内。如本领域技术人员所理解的, 包含本发明的多核苷酸的表达载体可以设计为包含信号序列, 其指导编码的多肽通过原核或真核细胞膜分泌。其他重组的构建体可以用于将编码感兴趣多肽的序列连接到编码会促进可溶蛋白纯化的多肽结构域的核苷酸序列。

[0193] 抗体组合物、其片段和其他结合剂

[0194] 按照另一方面, 本发明还提供了诸如抗体和其抗原结合片段的结合剂, 其展示了与本文所公开的多肽, 或与其部分、变体或衍生物的免疫学结合, 以及使用结合剂的方法。优选地, 这种结合剂有效地调节由本发明的 YRS 多肽介导的一种或多种非标准活性, 或有效地检测选定的 YRS 多肽 (即, 截短体、可选择的剪接变体、突变体) 在样品中的存在或缺乏, 所述样品诸如从个体获得的生物样品。

[0195] 例如, 某些实施方案考虑鉴定或表征个体内 YRS 多肽的方法, 包括: 从个体获得生物样品; 用抗体或其抗原结合片段接触生物样品, 其中抗体或抗原结合片段特异性地结合到本发明的 YRS 多肽; 以及检测结合的抗体或其抗原结合片段的存在或缺乏, 从而鉴定或表征个体内的 YRS 多肽。在某些方面, 抗体或其抗原结合片段特异性地结合到某一变异的或截短的 YRS 多肽, 诸如选定的 YRS 突变体或可选择的剪接变体, 但不与其他 YRS 多肽, 诸如全长、野生型 YRS 多肽特异性结合。

[0196] 如果抗体或其抗原结合片段在可检测的水平与本发明的多肽反应,但在相同条件下不与非相关多肽发生可检测的反应,则该抗体或其抗原结合片段被描述为与本发明的多肽“特异性结合”、“免疫学上结合”和\或是“免疫学反应的”。

[0197] 上下文中使用的免疫学结合一般是指发生在免疫球蛋白分子和该免疫球蛋白特异的抗原之间的非共价相互作用的类型。免疫学结合相互作用的强度或亲和力可以用相互作用的解离常数 (K_d) 来表示,其中较小的解离常数代表较强的亲和力。所选定多肽的免疫学结合特性可以用本领域所熟知的方法定量。一种这样的方法能够测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速率,其中这些速率依赖于复合物伴侣的浓度、相互作用的亲和力以及依赖于等同地影响两个方向的速率的几何参数。因此,“结合速率常数”(K_{on}) 和“解离速率常数”(K_{off}) 都可以通过计算浓度以及结合和解离的实际速率来确定。 K_{off}/K_{on} 的比值能够相消与亲和力无关的所有参数,因此等于解离常数 K_d 。一般参见, Davies et al. (1990) Annual Rev. Biochem. 59 :439-473。

[0198] 抗体的“抗原-结合位点”或“结合部分”是指免疫球蛋白分子参与抗原结合的部分。抗原结合位点由重 (“H”) 和轻 (“L”) 链 N-末端可变区 (“V”) 的氨基酸残基形成。重链和轻链 V 区中的三个高度不同的伸展区被称作“高变区”,其插入被称为“框架区”或“FRs”的更保守的旁侧伸展区。因此,术语“框架区”是指在免疫球蛋白中天然发现的,介于高变区之间和临近高变区的氨基酸序列。在抗体分子中,轻链的三个高变区和重链的三个高变区在三维空间彼此相对排列,形成抗原结合表面。该抗原结合表面与被结合的抗原的三维表面互补,因此每个重和轻链的三个高变区被称作“互补决定区”或“CDRs”。

[0199] 结合剂可以是例如带有或不带有肽组分的核糖体、RNA 分子或多肽。在优选的实施方案中,结合剂是抗体或其抗原结合片段。抗体可以利用本领域普通技术人员所知的多种技术来制备。参见例如 Harlow and Lane, Antibodies :A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988。一般而言,抗体可以通过细胞培养技术来制备,包括本文所描述的单克隆抗体的产生,或通过将抗体基因转染到适合的细菌或哺乳动物细胞宿主,以允许重组抗体的制备。在一方法中,包含多肽的免疫原被初次注射到广泛多样的哺乳动物(例如,小鼠、大鼠、兔、绵羊或山羊)的任一种的体内。在这一步骤中,本发明的多肽可以作为未经修饰的免疫原。可选择地,特别是对于较短的多肽,如果多肽被连接到诸如牛血清白蛋白或匙孔咸血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin) 的载体蛋白,就可以产生更好的免疫应答。免疫原被注射到动物宿主体内,优选地按照预定的方案结合一次或多次强化免疫,并且对动物定期取血。然后,可以通过例如使用偶联到合适的固体载体的多肽的亲亲和层析方法,从这种抗血清中纯化对多肽特异的多克隆抗体。

[0200] 对感兴趣的多肽特异的单克隆抗体可以使用例如 Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol. 6 :511-519, 1976 的技术以及对其改进的技术来制备。简短来说,这些方法涉及能够生产具有所需的特异性(即,与感兴趣的多肽的反应性)的抗体的永生细胞系的制备。这种细胞系可以从例如脾细胞产生,该脾细胞来自如上文所述免疫的动物。然后通过例如与骨髓瘤细胞融合伴侣的融合使脾细胞永生化,所述伴侣优选是与被免疫的动物同系的。可以利用多种融合技术。例如,脾细胞和骨髓瘤细胞可以用非离子去垢剂合并几分钟,然后以低密度铺于支持杂交细胞而非骨髓瘤细胞生长的选择性培养基中。优选的选择技术利用 HAT(次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸苷)选择。足够时间后,通常约 1-2 周,观察到杂交体的集落。

选择单个集落,检测它们的培养物上清对多肽的结合活性。具有高反应性和特异性的杂交瘤是优选的。

[0201] 单克隆抗体可以从生长杂交瘤的柱的上清液中分离。另外,可以应用多种技术来提高效率,例如将杂交瘤细胞系注射到诸如小鼠的适合的脊椎动物宿主的腹腔。然后,可以从腹水或血液中收集单克隆抗体。可以通过诸如色谱法、凝胶过滤、沉积和提取的常规技术从抗体中去除污染物。本发明的多肽可以用于例如亲和层析步骤中的纯化过程。

[0202] 为本领域所知的许多治疗有用的分子包含能够展示抗体分子的免疫学结合特性的抗原结合位点。木瓜蛋白酶这种蛋白水解酶优先地裂解 IgG 分子以产生几个片段,其中的两个(“F(ab)”片段)的每一个都包含共价异源二聚体,该共价异源二聚体包含完整的抗原结合位点。胃蛋白酶能够裂解 IgG 分子以提供几个片段,包括包含两个抗原结合位点的“F(ab')₂”片段。可以通过优先的 IgM 的蛋白水解裂解、以及极少情况下的 IgG 或 IgA 免疫球蛋白分子的蛋白水解裂解来生产“Fv”片段。然而,Fv 片段更通常地是利用为本领域所知的重组技术来获得。Fv 片段包括包含抗原结合位点的非共价 VH:VL 异源二聚体,其几乎保留了天然抗体分子的抗原识别和结合能力。Inbar et al. (1972)Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69:2659-2662;Hochman et al. (1976)Biochem 15:2706-2710;和 Ehrlich et al. (1980)Biochem 19:4091-4096。

[0203] 单链抗体(“sFv”)多肽是共价连接的 VH:VL 异源二聚体,该 VH:VL 异源二聚体从包含由肽编码连接子连接的 VH- 和 VL- 编码基因的基因融合物表达。Huston et al. (1988)Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85(16):5879-5883。用于将来自抗体 V 区的天然聚集的 - 但用化学方法分离的 - 轻和重多肽链转化成 sFv 分子的化学结构的许多辨别方法已经被描述,该 sFv 分子将折叠为与抗原结合位点结构基本上近似的三维结构。参见例如 Huston 等人拥有的美国第 5,091,513 和 5,132,405 号专利;以及 Ladner 等人拥有的美国第 4,946,778 号专利。

[0204] 上述分子的每一个都包含重链和轻链 CDR 组,分别插入重链和轻链 FR 组之间,该 FR 组为 CDRs 提供支持,并限定 CDRs 相对彼此间的空间关系。如本文所使用的,术语“CDR 组”是指重链或轻链 V 区的三个高变区。从重链或轻链的 N- 末端开始,这些区被分别命名为“CDR1”、“CDR”和“CDR3”。因此,抗原结合位点包括六个 CDRs,包含来自每个重链和轻链 V 区的 CDR 组。本文中包含单 CDR(例如 CDR1, CDR2 或 CDR3)的多肽被称作“分子识别单位”。对许多抗原 - 抗体复合体的晶体学分析已经证明,CDRs 的氨基酸残基与被结合的抗原形成了广泛接触,其中最广泛的抗原接触是与重链 CDR3。因此,分子识别单位主要负责抗原结合位点的特异性。

[0205] 如本文所使用的,术语“FR 组”是指四个旁侧氨基酸序列,该氨基酸序列架出重链或轻链 V 区的 CDR 组的 CDRs。一些 FR 残基可以接触被结合的抗原;然而,FRs 主要负责将 V 区折叠成抗原结合位点,特别是直接临近 CDRs 的 FR 残基。在 FRs 中,某些氨基酸残基和某些结构特征是高度保守的。在这方面,所有的 V 区序列包含大约 90 个氨基酸残基的内部二硫环。当 V 区折叠成结合位点时,CDRs 展示为形成抗原结合表面的突出的环基序。不管精确的 CDR 氨基酸序列,已经公认存在 FRs 的保守结构区,其影响 CDR 环折叠成某些“标准的”结构的形状。另外,已知某些 FR 残基参与非共价的结构域间接触,其稳定抗体重链和轻链间的相互作用。

[0206] 已经描述了许多包含来自非人免疫球蛋白的抗原结合位点的“人源化的”抗体分子,包括具有融合到人恒定结构域的啮齿类动物 V 区和与它们相关的 CDRs(Winter et al. (1991)Nature 349 :293-299;Lobuglio et al. (1989)Proc. Nat. Acad. Sci USA 86 :4220-4224;Shaw et al. (1987)J Immunol. 138 :4534-4538;和 Brown et al. (1987)Cancer Res. 47 :3577-3583);具有在与适当的人抗体恒定结构域融合前移植到人支持性 FR 的啮齿类动物 CDRs(Riechmann et al. (1988)Nature 332 :323-327;Verhoeyen et al. (1988)Science 239 :1534-1536;和 Jones et al. (1986)Nature 321 :522-525);以及具有由重组镶饰的啮齿类动物 FRs 支持的啮齿类动物 CDRs(欧洲专利公布 No. 519,596,1992 年 12 月 23 日公开)。这些“人源化的”分子被设计为使针对啮齿类动物抗人抗体分子的不良免疫反应最小化,该不良免疫反应限制人受体中那些部分在临床应用上的持久性和功效。

[0207] 如本文所使用的,术语“镶饰的 FRs”和“重组镶饰的 FRs”是指用人 FR 残基有选择地替代来自例如啮齿类动物重或轻链 V 区的 FR 残基,以提供包含抗原结合位点的异基因分子,该抗原结合位点基本上保留所有的天然 FR 多肽折叠结构。镶饰技术基于下述理解:抗体结合位点的配体结合特性主要通过抗原结合表面内重链和轻链 CDR 组的结构和相对分布来确定。Davies et al. (1990)Ann. Rev. Biochem. 59 :439-473。因此,只有小心地维持人源化抗体中的 CDR 结构、它们之间的相互作用,以及它们和 V 区结构域的其余部分之间的相互作用,才能在人源化抗体中保持抗原结合特异性。通过使用镶饰技术,用人的残基选择地替代容易遭受免疫系统攻击的外部的(例如,可以接触溶剂的)FR 残基,以提供包含弱免疫原性的或基本上无免疫原性的镶饰表面的杂种分子。

[0208] 在本发明的另一个实施方案中,本发明的单克隆抗体可以偶联到一个或多个感兴趣的药剂。例如,可以将临床药剂直接或间接地(例如,通过连接子基团)偶联(例如,共价结合)到适合的单克隆抗体。当每者都具有能与另一者起反应的取代基时,药剂和抗体间的直接反应是可能的。例如,在一个上面的诸如氨基或巯基基团的亲核基团,能够与在另一个上面的诸如酸酐或酰基卤(acid halide)的包含羰基的基团,或包含好的离去基团(例如,卤素)的烷基基团反应。

[0209] 可选择地,通过连接子基团偶联临床药剂和抗体是理想的。连接子基团能够发挥隔离子的作用将抗体与药剂隔开以便避免对结合能力的干扰。连接子基团还能够用于增加药剂或抗体上的取代基的化学反应性,以及因此提高偶联效率。化学反应性的提高还可以促进药剂或药剂上功能基团的作用,否则是不可能的。

[0210] 下述内容对本领域的技术人员是显而易见的:多种双功能或多功能的试剂,包括相同-和不同-功能的(诸如在 Pierce Chemical Co., Rockford, IL 目录中描述的那些),可以用作连接子基团。可以通过例如氨基、羧基、巯基或氧化的碳水化合物残基进行偶联。描述这种方法的参考资料有很多,例如 Rodwell 等人拥有的美国第 4,671,958 号专利。

[0211] 如果治疗药剂在离开本发明的免疫结合物的抗体部分时更有效。使用在内化入细胞期间或内化入细胞时可裂解的连接子基团是理想的。许多不同的可裂解的连接子基团已经被描述。来自这些连接子基团的药剂的细胞内释放机制包括通过下列方式的裂解:通过二硫键的还原(例如,Spitler 拥有的美国第 4,489,710 号专利);通过光敏键的照射(例如,Sender 等人用于的美国第 4,625,014 号专利);通过衍生的氨基酸侧链的水解作用(例如,Kohn 等人拥有的美国第 4,638,045 号专利);通过血清补体-介导的水解作用(例如,

Rodwell 等人拥有的美国第 4,671,958 号专利),以及酸-催化的水解作用(例如,Blattler 等人拥有的美国第 4,569,789 号专利)。

[0212] 将超过一个的药剂偶联到抗体是理想的。在一个实施方案中,多个药剂分子偶联到一个抗体分子上。在另一个实施方案中,多种药剂可以偶联到一个抗体上。不管特定的实施方案,具有超过一个的药剂的免疫结合物可以以多种方法制备。例如,超过一个的药剂可以直接偶联到抗体分子,或者可以利用提供多个连接位点的连接子。

[0213] 血小板减少症和有用的方法

[0214] 如上文所述的,本发明一般地涉及治疗血小板减少症或与减少的血小板计数有关的其他疾病状态和/或降低发展为血小板减少症或与减少的血小板计数有关的其他疾病状态的风险的方法。血小板减少症一般的特征在于与典型个体正常范围的血小板计数相比,降低的血小板计数。例如,血小板减少症一般指与正常的血小板计数相比,血小板计数降低到约 $100,000/\text{mm}^3$ 或更低。个体的正常血小板计数通常的范围为约 $150,000/\text{mm}^3$ 至约 $450,000/\text{mm}^3$ 。

[0215] 血小板减少症经常没有体征或症状,但可以通过常规的血液检测来鉴定。如果存在的话,血小板减少症的可能体征和症状包括易出现瘀伤和/或过量出血。例如,皮肤出血可能是低血小板技术的第一个体征。许多小红点(瘀点)经常出现在小腿上的皮肤上,并且轻微伤害可以导致小的分散的瘀伤。此外,牙龈可能出血,以及血可能出现在大便或尿液中。月经周期可能异常长。出血可以难以制止。

[0216] 出血通常随着血小板数目减少恶化。具有极低血小板的人可以丢失大量的血液到消化道或在脑中发展为危险生命的出血,即便它们没有受伤害。症状发展的速度可以取决于血小板减少症的病因而变化。

[0217] 血小板减少症可以是先天性的、获得性的和/或医源性的,并且可以起源于多种潜在的生理因素或条件。例如,血小板减少症通常可以源自降低的血小板产生,增加的血小板破坏、血小板的消耗、由于脾功能亢进(即,增大的脾)导致的血小板的诱捕/扣押,或低体温,和/或源自某些药剂的副作用(即药剂诱发的血小板减少症)。此外,血小板减少症的特发型特别发生在儿童,短暂型可以发生在病毒感染(例如,Epstein-Barr 病毒或传染性单核细胞增多症)后,以及孕妇可以发生缓和的血小板减少症,经常是在接近分娩的时候。

[0218] 与降低的血小板产生(即减少的或缺乏的产生)有关的先天性疾病状态的实例包括 Wiskott-Aldrich 综合征、母源性噻嗪类药物摄入、先天性缺巨核细胞性血小板减少症、血小板减少-桡骨缺失综合征、范科尼贫血、巨大血小板综合征(Bernard-Soulier syndrome)、May-Hegglin 畸形、灰白血小板综合征、奥尔波特综合征和新生儿风疹。与降低的血小板产生有关的获得性疾病状态的实例包括再生障碍性贫血、骨髓增生异常综合征、骨髓浸润(例如,急性和慢性白血病、骨髓肿瘤、癌症)、淋巴瘤、营养缺乏(例如, B_{12} , 叶酸)、骨髓抑制剂的使用、直接影响血小板产生的药品的使用(例如,噻嗪类、乙醇、激素)、放射接触(例如,放射治疗)、有毒化学物质的接触(例如,杀虫剂、砷、苯)、肝功能衰竭中肝降低的促血小板生成素产生、细菌性脓毒症和某些病毒感染(例如,水痘、腮腺炎、细小病毒、麻疹、登革热、HIV, HCV)。

[0219] 与增加的外周血小板破坏有关的先天性疾病状态的实例包括非免疫性疾病状态,

诸如早熟、胎儿成红细胞增多症、感染；以及免疫性疾病状态，诸如药物过敏、特发性血小板减少性紫癜（ITP）、以及母源性 ITP。与增加的外周血小板破坏有关的获得性疾病状态的实例包括非免疫性疾病状态，诸如溶血尿毒症综合征、弥散性血管内凝血、血栓性血小板减少性紫癜（TTP）；免疫性疾病状态，诸如药品诱发的血小板减少症（例如，特别是用奎宁和奎纳定诱发的血小板减少症）、输血后紫癜、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、新生儿同种免疫血小板减少症、阵发性睡眠血红蛋白尿、急性和慢性 ITP、脓毒症和乙醇；以及侵入性衬套和装置的使用（例如，动脉或中央静脉导管）、主动脉内球囊泵、假体心脏瓣膜，以及肝素相关疗法的应用。

[0220] 药剂诱发的血小板减少症可以特别源自某些药品，诸如化疗剂、非甾体抗炎药、磺胺类药、万古霉素、氯吡格雷、糖蛋白 IIb/IIIa 抑制剂、干扰素、丙戊酸、阿昔单抗、利奈唑胺、法莫替丁、美贝维林、组胺阻断剂、烷化剂、肝素、乙醇、抗菌化疗剂、碳青霉烯类、脲基-青霉素、头孢唑林等本领域已知的药品。化疗剂的特定实例包括，但不限于，顺铂（CDDP）、卡铂、甲基苄肼、氮介、环磷酰胺、喜树碱、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、白消安、亚硝基尿、更生霉素、道诺霉素、阿霉素、博来霉素、普卡霉素、丝裂霉素、依托泊苷（VP 16）、他莫昔芬、雷洛昔芬、雌激素受体结合剂、紫杉酚、吉西他滨、长春瑞滨、法尼基蛋白转移酶抑制剂、反铂、5-氟尿嘧啶、长春新碱、长春花碱和甲氨蝶呤、Temazolomide（DTIC 的水性形式），或者前述的任一类似物或衍生物变体。

[0221] 本发明一般地涉及通过给予个体包含血小板生成有效浓度的截短的和/或变异的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽或其修饰的多肽治疗个体血小板减少症（即降低的血小板计数）的方法，或降低个体发展为血小板减少症的风险的方法，所述个体诸如患有本文提供的示例性疾病或疾病状态的一种或多种的个体以及本领域已知的其他个体。本发明的实施方案包括治疗方法，其目的不仅是增加或改善患有减少的、降低的、异常的或低血小板计数的个体的血小板计数，而且维持处于发展为低血小板计数风险中的个体的正常血小板计数。某些实施方案还包括利用 YRS 多肽增加血小板供者（包括另外的健康供者（即，具有正常血小板计数的供者））的血小板计数，诸如在血小板捐赠或单采术过程之前、期间和/或之后给予供者 YRS 多肽。

[0222] 因此，某些实施方案包括增加个体的血小板计数的方法，包括给予个体包含血小板生成有效浓度的截短的和/或酪氨酰-tRNA 合成酶多肽或者其修饰的多肽的组合物，由此增加个体的血小板计数。其他实施方案包括维持个体正常血小板计数的方法，包括给予个体包含血小板生成有效浓度的截短的和/或变异的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的组合物，诸如其中个体处于发展为低血小板计数的风险中。某些实施方案可以包括刺激个体的血小板生成的方法，诸如通过给予所述个体包含血小板生成有效浓度的截短的和/或变异的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的组合物。在某些方面，个体具有减少的、减低的或异常的血小板技术，诸如约 100,000/mm³ 或更少的血小板计数。在某些方面，可以利用本文提供的 YRS 多肽刺激个体的巨核细胞和/或嗜中性细胞的增殖和/或分化。

[0223] 具有降低的血小板计数的个体还可以处于发展为与血小板减少症有关的其他问题的风险中，诸如出血或瘀伤、大出血、胃肠出血、鼻衄（即，鼻出血）或颅内出血（即，脑出血）。作为一个特定实例，患血小板减少症的脓毒血症患者具有增加的出血。因此，本发明的某些方面可以利用本文提供的血小板生成性组合物以降低发展为这些类型的血小板减

少症相关问题等的风险。在其他方面,个体可以处于发展为减少的、减低的或另外的异常的血小板计数的风险中,诸如来自与减低的血小板水平有关的获得性疾病状态(例如,某些医学疗法、白血病等)。

[0224] 在某些方面,本文描述的治疗方法可以独立于其他治疗方案应用,以及可以是被依赖的唯一的或主要的治疗方案以管理血小板减少疾病状态和/或另外地不仅降低发展为血小板减少症风险,还降低发展为与其相关的其他医学问题,诸如出血的风险。例如,患有已知潜在的病因(例如,特发性血小板减少性紫癜)的血小板减少症的个体可以受益于本文提供的治疗方法以增加和/或管理血小板水平。

[0225] 在某些方面,可以应用本发明的方法和组合物作为组合疗法的一部分,诸如通过与可以刺激个体血小板生成和/或造血途径的其他药剂的给药。可以用作组合疗法的一部分的其他药剂的实例包括促血小板生成素、细胞因子(例如,IL-11)、趋化因子、和/或与血小板生成或造血作用有关的生长因子,包括其生物活性片段或变体。

[0226] 在某些方面,本发明的方法可以与其他治疗方案联用,诸如参与治疗导致血小板减少症有关的疾病状态的潜在疾病状态的那些治疗方案。例如,患先天性缺巨核细胞性血小板减少症(CAMT)的个体可以最终经历骨髓移植手术,但还可以受益于本文提供的分开的治疗以增加血小板水平和/或维持血小板水平在正常范围内。可以在这方面和相似的方面应用本发明的血小板生成多肽。

[0227] 在某些方面,本文提供的方法可以与个体经历的其他医学治疗联用,诸如导致血小板减少症或增加发展为血小板减少症风险的治疗。例如,本文提供的方法可以用于以下个体:正在经历、将要经历或已经经历了放疗、化疗、或如本文描述的或本领域已知的其他类型的治疗(包括多种类型的药物治疗)的个体,因为已知这些治疗降低个体的血小板计数。因此,可以在其他医学治疗之前、期间和/或之后利用本文提供的方法以降低发展为由这些治疗导致的血小板减少症的风险,和/或管理或改善由这些治疗导致的血小板减少症。

[0228] 在某些实施方案中,本文提供的方法可以用来预防性地治疗或管理与本文描述的和本领域已知的这些特定疾病状态有关的血小板减少性症状。

[0229] 巨核细胞祖细胞的刺激以及有用的方法

[0230] 本发明的 YRS 多肽还可以用于刺激巨核细胞祖细胞的生长,包括早期祖细胞,即巨核细胞谱系最原始的谱系限制性祖细胞。包括刺激早期巨核细胞祖细胞增殖的方法,包括用酪氨酰-tRNA 合成酶多肽孵育造血干细胞培养物足够长的时间以允许早期巨核细胞祖细胞增殖,由此刺激早期巨核细胞祖细胞的增殖。在这些以及相关的实施方案中,本发明的 YRS 多肽可以与纯化的 HSCs、部分纯化的 HSCs、全骨髓培养物(例如用于骨髓移植)、脐带血或用于造血移植疗法的其他类型的培养物孵育。这种方法可以产生富集早期巨核细胞祖细胞的培养物。本发明的 YRS 多肽还可以直接给予个体(体内)以刺激个体的早期巨核细胞祖细胞的增殖。

[0231] “造血干细胞(HSCs)”一般指产生血细胞类型的多能或专能“干细胞”,所述血细胞类型包括髓系(例如,单核细胞和巨噬细胞,嗜中性细胞、嗜碱性细胞、嗜酸性细胞、红细胞、巨核细胞/血小板、树突细胞)和淋巴系(例如,T细胞、B细胞、NK细胞)和本领域已知的其他类型。典型地,“干细胞”通过它们形成多种细胞类型(即多潜能)以及它们自我

更新的能力来定义。然而,在某些实施方案中,可以包括寡能和单能祖细胞。“造血作用”一般指特定的、特化的血细胞从 HSC 的细胞分化或形成的过程。

[0232] HSCs 可以通过本领域已知的技术来获得。例如, HSCs 可以存在于成体的骨髓中,包括股骨、髌骨、肋骨、胸骨和其他骨。HSCs 可以通过利用针或注射器从髌骨移除直接获得,或者从血液中获得,通常是在用诱导细胞从骨髓部位释放的诸如 G-CSF (粒细胞集落刺激因子) 的细胞因子预处理后从血液中获得。用于临床和科学用途的其他来源包括脐带血、胎盘和动员的外周血。对于实验目的,胎儿肝脏、胎儿脾脏和动物的 AGM (主动脉-性腺-中肾) 也是 HSCs 的有用来源。

[0233] HSCs 可以根据某些表型或基因型标志物来鉴定。例如,可以通过 HSCs 的小体积、缺乏谱系 (lin) 标志物、用诸如罗丹明 123 (罗丹明^{DULL}, 也称为 rho10) 或 Hoechst 33342 活体染料的低染 (边缘细胞群 (side population))、以及多种抗原标志物 (其中许多属于分化群系列 (例如, CD34, CD38, CD90, CD133, CD105, CD45, 和 c-kit, 干细胞因子的受体)) 在它们表面上的存在来鉴定 HSCs。HSCs 对于通常用于检测谱系定型 (lineage commitment) 的标志物大都是阴性的, 并因此经常被称为 lin(-) 细胞。大多数 HSCs 可以被表征为 CD34⁺, CD59⁺, Thy1/CD90⁺, CD38^{10/-}, C-kit/CD117⁺ 和 lin(-)。然而, 不是所有干细胞被这些组合包括, 因为某些 HSCs 是 CD34⁺/CD38⁻。一些研究也表明, 最早期的干细胞可能在细胞表面上缺乏 C-kit。对于人 HSCs, CD133 可以代表早期标志物, 因为 CD34⁺ 和 CD34⁻ HSCs 都显示为 CD133⁺ 的。

[0234] 对于通过流式细胞术或 FACS 对 lin(-) HSCs 的纯化, 成熟血液谱系标志物抗体的阵列可以用于耗竭 lin(+) 细胞或晚期专能祖细胞 (MPP), 包括例如, 针对以下抗原的抗体: 髓系细胞的 CD 13 和 CD33、人红系细胞的 CD71、人 B 细胞的 CD 19、人巨核细胞的 CD61、单核细胞的 Mac-1 (CD11b/CD18)、粒细胞的 Gr-1、T 细胞的 IL17Ra, CD3, CD4, CD5 和 CD8 以及本领域已知的其他抗原。其他的纯化方法是本领域已知的, 诸如利用细胞表面分子的“信号传导淋巴细胞活化分子” (SLAM) 家族的特定标签的那些方法。

[0235] 无论获自或存在于脐带血、骨髓、外周血或其他来源的 HSCs 均可以在任何合适的、商购的或定制的培养基中生长或扩增, 根据需要, 可以添加或不添加血清 (参见, 例如, Hartshorn et al, Cell Technology for Cell Products, 第 221-224 页, R. Smith, Editor; Springer Netherlands, 2007, 通过引用的方式将其整体并入本文)。例如, 在某些实施方案中, 无血清培养基可以利用白蛋白和 / 或转铁蛋白, 其已经被表明对于 CD34⁺ 细胞在无血清培养基中的生长和扩增是有用的。此外, 可以包括细胞因子, 诸如 Flt-3 配体、干细胞因子 (SCF) 和促血小板生成素等。HSCs 还可以生长于诸如生物反应器的容器中 (参加, 例如, Liu et al., Journal of Biotechnology 124 :592-601, 2006, 通过引用的方式将其整体并入本文)。用于离体扩增 HSCs 的合适的培养基还可以包括 HSC 支持细胞, 诸如基质细胞 (例如, 淋巴网状基质细胞), 其可以源自, 例如, 淋巴组织的分离, 并且已经被显示支持 HSCs 以及它们的子代的体外、离体、和体内维持、生长和分化。

[0236] 能够按照本领域已知的常规技术在体外或体内测量 HSC 的生长或扩增。例如, 对于这些方法, 通过引用的方式并入本文的 WO 2008/073748 描述了测量 HSCs 体内和体外扩增的方法, 以及区分 HSCs 生长 / 扩增与潜在的异源群 (例如, 骨髓) 中的其他细胞诸如中间祖细胞生长 / 扩增的方法。尽管在某些实施方案中, 给药或孵育发生在 HSCs 的离体处理

中,但导致生长或扩增的该给药或孵育步骤可以体内、离体或体外发生。

[0237] 巨核细胞祖细胞(例如早期、中间、晚期等)的生长或增殖还可以根据本领域已知的和本文描述的(例如,参见实施例 10)的常规技术来测定。例如,在这些特征中,早期巨核细胞祖细胞可以通过免疫染色为 $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{CD41}^+$ 来鉴定,以及晚期巨核细胞祖细胞可以鉴定为 $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^- \text{CD41}^+$ (参见,例如, Perez et al, PLoS ONE. 3 :e3565, 2008 ;和 Lefebvre et al., Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research. 9 :913-921, 2000, 其每一篇通过引用的方式以其整体并入)。

[0238] “脐带血 (Cord blood)”或“脐带血 (umbilical cord blood)”一般指来自新生儿的较少量的血(多达约 180mL),如果脐带不被过早夹住的话,其返回至新生儿循环中。脐带血富集 HSCs,并且可以按照本领域已知的技术进行收集和储存备用(对于这类方法学,参见,例如, U. S. Patent Nos. 7, 147, 626 和 7, 131, 958, 其通过引用的方式并入本文)。另外,如果脐带最终没有被夹住,在与冷空气相互作用时发生生理学上的夹合,其中称为华顿氏胶质 (Wharton' s jelly) 的内部胶状物质在脐带动脉和静脉周围膨胀。然而,华顿氏胶质仍然能够作为 HSCs 的来源。

[0239] 如上所述,“离体 (ex vivo)”一般指发生在生物体外的活性,诸如在生物体外的人工环境中的活体组织中或上进行的实验或测量,所述人工环境优选具有天然条件的最小的改变。最通常地,“离体”方法涉及从生物体获取的活体细胞或组织,其在实验室设备中培养,通常是在无菌条件下,典型地培养几小时或多达约 24 小时,但也包括多达 48 或 72 小时,这取决于环境。在某些实施方案中,这种组织或细胞可以收集和冷冻,并在以后解冻用于离体处理。利用活体细胞或组织的持续超过几天的组织培养实验或方案通常被视为是“体外 (in vitro)”的,尽管在某些实施方案中,该术语能够与离体互换使用。

[0240] 术语“离体给药”、“离体处理”或“离体治疗用途”一般指医疗操作,其中一种或多种器官、细胞或组织从有生命的或最近死亡的个体获得,任选地纯化的 / 富集的,暴露于处理或操作以扩增干细胞(例如,离体给药步骤,其包括用本发明的组合物孵育细胞以增强所需细胞的扩增,诸如 HSCs 或巨核细胞祖细胞),然后在任选的处理或操作后对相同或不同的有生命的个体给药。作为一个实例,通过输注巨核细胞祖细胞可以减轻血小板减少症(参见,例如, De Bruyn et al., Stem Cells Dev. 14 :415-24, 2005, 通过引用的方法将其并入)。

[0241] 这种离体治疗应用还可以包括任选的体内处理或操作步骤,诸如通过在器官、细胞或组织给药之前、期间或之后给予有生命的个体本发明的 YRS 多肽一次或多次。按照本领域已知的技术,对于这些实施方案包括局部和系统的给药。给予个体的 YRS 多肽的量取决于该个体的特征,诸如一般健康状况、年龄、性别、体重和药物的耐受,以及对多肽和 / 或细胞移植反应的程度、严重性和类型。

[0242] 表达 CXCR-2 的细胞的刺激

[0243] 某些实施方案涉及以下发现:YRS 多肽能够刺激表达 CXCR-2 细胞的迁移。CXCR-2 细胞是 CXC 趋化因子受体家族的成员,表达在多种细胞类型中,包括嗜中性细胞和其他免疫细胞。CXC 趋化因子受体是整合的膜蛋白,其特异性结合并对 CXC 趋化因子家族的细胞因子反应。这些基于 CXC 的受体代表趋化因子受体的一个亚家族,趋化因子受体是 G 蛋白偶联受体(也被称为七次跨膜受体)的一个大家族。目前在哺乳动物中已知有七种 CXC

趋化因子受体,命名为 CXCR1 至 CXCR7。CXCR-2(以及高度相关的 CXCR-1)是公知的识别 C-X-C 趋化因子的受体,C-X-C 趋化因子具有紧邻它们的 C-X-C 基序的 E-L-R 氨基酸基序。CXCL8(即,白介素 8)和 CXCL6 都能够结合人的 CXCR1,而所有其他 ELR 基序阳性的趋化因子,诸如 CXCL1 至 CXCL7,仅结合 CXCR2(参见,例如,Tsai et al.,Cell 110:373-383,2002;和 Pelus et al.,Exp Hematol. 34:1010-20,2006,其每一篇通过引用的方式以其整体并入)。如上所述,CXCR-2 表达在嗜中性细胞的表面,并能够在嗜中性细胞迁移中发挥作用(参见,例如,Rios-Santos et al.,American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 175:490-497,2007,其通过引用的方式以其整体并入)。

[0244] 因此,考虑到 CXCR-2 在细胞信号传导和细胞迁移(例如,嗜中性细胞信号传导/迁移)以及其他生物相关途径中的作用,某些实施方案包括刺激表达 CXCR-2 的细胞迁移的方法,包括用酪氨酰-tRNA 合成酶多肽接触细胞,由此刺激表达 CXCR-2 细胞迁移。

[0245] 肺部疾病和有用的方法

[0246] 本发明的实施方案还涉及以下意料不到的发现:YRS 多肽可以提供治疗肺部疾病的益处,诸如慢性阻塞性肺部疾病(COPD)。在这方面,嗜中性细胞从循环系统迁移到肺参与慢性阻塞性肺部疾病(COPD)(参见,例如,R. A. Stockley, Chest 121:151S-155S,2002,通过引用的方式将其整体并入)。如上所述,CXCR-2 表达在嗜中性细胞表面,并能够在嗜中性细胞迁移中发挥作用(参见,例如,Rios-Santos et al., American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 175:490-497,2007,通过引用的方式将其整体并入)。因为嗜中性细胞的 CXCR-2 信号传导参与嗜中性细胞到某些组织诸如肺的迁移,特别是应答诸如刺激物、细菌、脂多糖(LPS)等的外源物质时,所以它可能参与多种病理状态,诸如 COPD。

[0247] 鉴于观察到本发明的 YRS 多肽影响 CXCR-2 信号传导和多形核(PMN)细胞迁移(参见,例如实施例 7 和 8),认为这些多肽可以用于治疗或管理肺部疾病,诸如 COPD。例如,不希望受任何理论约束,YRS 多肽可以用于使循环嗜中性细胞对多种刺激物或变应原脱敏,由此减少这些细胞到肺部的迁移(参见,例如实施例 9)。因此,某些实施方案涉及治疗或管理(例如,降低其并发症)肺部炎症和/或肺部疾病诸如 COPD 的方法,包括给予具有肺部炎症或 COPD 的个体有效浓度的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽,由此减轻个体的 COPD 和/或其症状。通常,在使免疫细胞脱敏中,需要多次给药(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 等),通常以确定的频率(每天、每周、每月等的给药数)。

[0248] COPD 一般指阻碍气流并使患病个体正常呼吸渐进性困难的一组肺部疾病。肺气肿和慢性支气管炎是该组 COPD 疾病中的两种主要疾病状态,但 COPD 还指由慢性哮喘性支气管炎以及本领域已知的其他疾病状态导致的损害。在所有病例中,气道的损害最终影响肺中氧气和二氧化碳的交换。治疗主要集中在控制症状并使进一步的损害最小化。

[0249] 肺气肿代表 COPD 的一方面。肺气肿导致肺泡脆弱壁内的炎症,其可以破坏一些壁和弹性纤维,在呼气时使小气道塌陷,以及减弱出肺的气流。肺气肿的体征和症状包括,例如,呼吸短促,特别是在身体活动期间、哮鸣和胸闷。

[0250] 慢性支气管炎代表 COPD 的另一方面。慢性支气管炎的特征在于进行性咳嗽,并导致支气管道的炎症和狭窄。这一疾病状态还导致增加的粘液产生,其能够进一步阻塞变窄的管道。慢性支气管主要发生在吸烟者,通常被定义为连续两年中每年持续至少三个月的

咳嗽。慢性支气管炎的体征和症状包括,例如,清晨的第一件事是必须清喉(特别是对于吸烟者)、产生微黄色痰的慢性咳嗽、后期的呼吸短促和频繁的呼吸道感染。

[0251] 如上所述,COPD 主要指由上述两种慢性肺部疾病状态导致的肺部的阻塞。然而,许多患 COPD 的个体患有这两种疾病状态。

[0252] 慢性哮喘性支气管炎代表 COPD 的另一方面。慢性哮喘性支气管炎通常被表征为慢性支气管炎合并哮喘(支气管痉挛)。当发炎的或受感染的分泌物刺激气道内的平滑肌时,可以发生哮喘。症状与慢性支气管炎相似,但还包括间歇性的、甚或每日的哮喘发作。

[0253] 主要地,COPD 最终由香烟烟雾和其他刺激物导致。在大多数情况下,导致 COPD 的肺部损害由长期的吸烟导致。然而,其他刺激可以导致 COPD,包括雪茄烟雾、二手烟雾、烟囱烟雾、空气污染和一些职业性烟气。胃食管反流病(GERD)在胃酸洗液返回到你的食管中时发生,其不仅恶化 COPD,还可以在某些个体中导致 COPD。在少见的情况下,COPD 源自导致低水平的称为 α -1-抗胰蛋白酶蛋白的遗传病症。因此,COPD 的危险因素包括暴露于烟草烟雾、灰尘和化学物的职业暴露(长期暴露于化学烟气、水汽和灰尘刺激物并使肺脏发炎)、胃食管反流病(酸反流的严重形式-酸和其他胃内容物返流到食管中)、衰老(COPD 随着年数缓慢进展,因此当症状出现时,大多数人为至少 40 岁)以及遗传(称为 α -1-抗胰蛋白酶缺陷的罕见遗传病症是一些 COPD 的来源)。

[0254] COPD 的并发症可以包括呼吸道感染、高血压、心脏问题(例如心脏病发作)、肺癌(患有慢性支气管炎的吸烟者比没有慢性支气管炎的吸烟者发生肺癌的风险要大)、消沉以及本领域已知的其他并发症。

[0255] 患 COPD 的个体可以根据本领域已知的常规诊断技术来鉴定。例如,诸如肺活量测定的肺功能检测测量肺脏能够容纳多少空气以及个体能够多快将他们肺脏的空气呼出。肺活量测定能够在出现症状前检测出 COPD,并且能够用于跟踪疾病进展和监测治疗。此外,胸部 X 射线显示肺气肿(COPD 的一个主要因素),并且还可以排除其他肺部问题或心衰。此外,动脉血气分析测量肺脏将氧气带入血液以及将二氧化碳移除的有效性,这提供了 COPD 的指标。痰液检查,即痰中细胞的分析,能够鉴定某些肺部问题的病因,有助于排除某些肺部癌症。此外,计算机断层(CT)扫描产生内部器官的高精细图像,这有助于检测肺气肿以及由此的 COPD。

[0256] 如本文的其他地方,给予患 COPD(或处于患 COPD 的风险)的个体的 YRS 多肽的量会取决于该个体的特征,诸如一般健康状况、年龄、性别、体重和药物耐受性以及多肽反应的程度、严重性和类型。

[0257] 制剂和药物组合物

[0258] 本发明的组合物包含酪氨酰-tRNA 合成酶多肽,包括其截短体和/或变体,其单独地配制在用于给予细胞或动物的药学上可接受的或生理学可接受的溶液中,或者与一种或多种其他治疗方法联用。还应当理解,如果需要的话,本发明的组合物还可以与其他药剂联用,诸如,例如,其他蛋白或多肽或多种药学活性剂。对于还可以包括在组合物中的其他组分几乎没有限制,只要这些额外的药剂没有不利地影响要实现的血小板生成或其他效应。

[0259] 在本发明的药物组合物中,药学上可接受的赋形剂和载体溶液的制剂是本领域技术人员公知的,如同开发合适的剂量和治疗方案,以在多种治疗方案中利用本文描述的特定组合物,包括例如,口服、胃肠外、静脉内、鼻内、肌肉内给药和制剂。

[0260] 在某些实施方案中,本文公开的药物组合物可以经由口服递送到个体。这样,这些组合物可以与惰性稀释剂或与可同化的食用载体一起配制,或者它们可以封装在硬-或软-壳胶囊中,或者它们可以被压缩成片剂,或者它们可以直接掺入饮食中的食物。

[0261] 在某些实施方案中,将本文公开的药物组合物经胃肠外、静脉内、肌肉内甚或腹腔内递送是理想的,如例如在 U. S. Pat. No. 5, 543, 158 ;U. S. Pat. No. 5, 641, 515 和 U. S. Pat. No. 5, 399, 363(其每一篇通过引用的方式以其整体并入本文)中所描述的。游离碱或药学上可接受的盐的活性化合物溶液可以在水中制备,适宜地与表面活性剂混合,诸如羟基丙基纤维素。分散体系还可以在甘油、液体聚乙二醇或其混合物中以及在油中配制。在正常储存和使用的条件下,这些制剂包含防止微生物生长的防腐剂。

[0262] 适于注射用途的药物形式包括灭菌水溶液或分散体系,以及用于临时配制灭菌注射溶液或分散体系的灭菌粉末(U. S. Pat. No. 5, 466, 468,通过引用的方式以其整体特别并入)。在所有情况下,剂型应该是灭菌的,并应该使流动的程度为存在容易的可注射性。它在制备和储存条件下应该是稳定的,并应该是防腐的以抵抗诸如细菌和真菌的微生物的污染作用。载体可以是溶剂或分散介质,包含例如,水、乙醇、多羟基化合物(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其适合的混合物,和/或植物油。可以维持适当的流动性,例如,通过使用包被,诸如卵磷脂,通过在分散的情形下维持所需的颗粒大小以及通过利用表面活性剂。通过多种抗细菌和抗真菌剂,例如,苯甲酸酯类(parabens)、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞(thimerosal)等有助于微生物的作用的预防。在许多情况下,包括等张剂,例如,糖或氯化钠是优选的。通过在组合物中使用延迟吸收的药剂,例如,单硬酯酸铝和凝胶能够引起可注射组合物的延迟吸收。

[0263] 对于水性溶液的胃肠外给药,例如,溶液应该是适当地缓冲的(如果需要的话),液体稀释剂首先用足够的盐或糖提供等张性。这些特定的水性溶液对于静脉内、肌肉内、皮下和腹腔内给药是特别合适的。因此,能够利用的灭菌水性介质是本领域技术人员结合本公开内容已知的。例如,一次给药剂量可以溶解于1ml等张力的NaCl溶液中,添加至1000ml的皮下灌注液或在输注的建议部位注射(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,第15版,第1035-1038和1570-1580页)。取决于被治疗个体的条件,给药剂量的一些变化会必然存在。在任何情况下,负责给药的人确定用于单独个体的适当剂量。而且,对于人给药,制剂应该满足FDA生物制剂办公室标准所要求的无菌、致热原性、以及一般的安全和纯度标准。

[0264] 灭菌的注射溶液可以通过将活性化合物以所需量(根据需要与上述的多种其他成分一起)掺入适当的溶剂中,随后进行过滤除菌来制备。一般地,通过将多种灭菌的活性成分掺入无菌载体中来制备分散体系,所述载体含有基础分散介质和所需的来自上述的那些的其他成分。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,其产生了来自其先前无菌过滤溶液的活性成分加上任何额外所需的成分的粉末。

[0265] 本文公开的组合物可以配制为中性形式或盐的形式。药学上可接受的盐,包括酸加成盐(与蛋白的游离氨基形成的),其可以用无机酸,诸如例如盐酸或磷酸,或者诸如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等有机酸来形成。与游离羧基基团形成的盐还可以衍生自无机碱诸如例如氢氧化钠、钾、铵、钙、铁的无机碱,以及诸如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等

的有机碱。配制时,以与剂型相容的方式施用溶液,以及以治疗有效量施用。制剂以诸如注射溶液、药物释放胶囊等多种剂型容易地施用。

[0266] 如本文所用的,“载体”包括任一和所有的溶剂、分散介质、载体、包被、稀释剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗的吸收延迟剂、缓冲液、载体溶液、悬浮液、胶体等。这些介质和药剂用于药学上活性物质的用途是本领域公知的。除任一常规介质或药剂与活性成分不相容的例外情况外,包括它在治疗组合物中的用途。补充性活性成分也可以掺入组合物中。

[0267] 词组“药学上可接受的”指当给予人时,不产生变应性反应或类似不良反应的分子实体和组合物。包含作为活性成分的蛋白的水性组合物的制备是本领域公知的。典型地,这种组合物制备为作为液体溶液或悬浮液的注射剂;还可以制备为适于注射前溶于或悬浮于液体中的固体形式。还可以乳化制剂。

[0268] 在某些实施方案中,药物组合物可以通过鼻内喷雾、吸入和/或其他气雾剂递送载体来递送。用于将基因、多核苷酸和肽组合物经由鼻气雾剂直接递送到肺脏的方法已经被描述,例如在 U. S. Pat. No. 5, 756, 353 和 U. S. Pat. No. 5, 804, 212 中(其每一篇通过引用以其整体特别并入本文)。类似地,利用鼻内微粒树脂(Takenaga et al., 1998)和溶血磷脂酰甘油化合物(U. S. Pat. No. 5, 725, 871, 通过引用以其整体特别并入本文)的递送也是药物领域公知的。同样地,以聚四氟乙烯支持基质形式的跨粘膜药物递送描述于 U. S. Pat. No. 5, 780, 045(通过引用以其整体特别并入本文)。

[0269] 在某些实施方案中,递送可以利用脂质体、纳米胶囊、微颗粒、微球体、脂质颗粒、囊泡等发生,用于将本发明的组合物导入合适的宿主细胞中。特别地,本发明的组合物可以配制为封装在脂质颗粒、脂质体、囊泡、纳米球体、纳米颗粒等中用于递送。这种递送载体的配制和用途可以利用已知的和常规的技术来实现。

[0270] 本说明书引用的所有出版物、专利申请和授权专利都通过引用的方式并入本文,如同每一单独的出版物、专利申请或授权专利被特别和单独地指明通过引用的方式并入一样。

[0271] 尽管出于清楚理解的目的,已经通过例举和实例对上述发明进行了一些细节上的描述,但显而易见的是,本领域技术人员结合本发明的教导,可以对其作出一些改变和修饰,而不背离所附权利要求书的精神或范畴。仅出于示例的目的提供了下述的实施例,但并不是限制。本领域技术人员会容易理解可以改变或修饰多种非关键参数以产生基本上类似的结果。

实施例

[0272] 实施例 1

[0273] 体内血小板生成的刺激

[0274] 在体内测量了酪氨酰-tRNA 合成酶多肽对血小板生成的影响。下面描述的实验中利用的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽是 C-末端截短体,其包含全长人酪氨酰-tRNA 的氨基酸 1-364。该 C-末端截短的多肽融合到 8 氨基酸 C-末端标签(365-L-E-H-H-H-H-H-H-372)(SEQ ID NO:5)。全长人酪氨酰-tRNA 合成酶的氨基酸序列显示在 SEQ ID NO:1 中。

[0275] 为了测量酪氨酰-tRNA 合成酶多肽对血小板生成的影响,在第一组实验中,一天两次给小鼠皮下注射 3 μ g/kg 的 C-末端截短的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽,注射七天。在第

二组实验中,一天两次给小鼠注射 1,3 和 10 μ g/kg 的 C-末端截短的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽,注射七天。在第三组实验中,给小鼠一天两次皮下注射 (i) 3 和 300 μ g/kg 的 C-末端截短的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽 6 天,以及单次日注射 (ii) 90 μ g/kg 促血小板生成素 (TPO) 和 (iii) 250 μ g/kg G-CSF。

[0276] 对于上述的第一和第二组实验,在完成给药操作时,确定每只动物的血小板计数。对于第三组实验,在给药操作结束时,检测骨髓和脾的组织学。

[0277] 截短的酪氨酰-tRNA 合成酶给药约一周显示了血小板生成活性的可再现的体内增加,如通过增加的血小板计数或增加的巨核细胞数测量的。图 5(a) 显示了与磷酸缓冲盐 (PBS) 对照相比,其中小鼠被注射 1,3 和 10 μ g/kg 的截短的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的实验的血小板计数。图 5(b) 显示了与 PBS 对照相比,其中小鼠被注射 3 μ g/kg 的截短的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的实验的血小板计数。在两组实验中,小鼠在应答用本发明的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽处理时,显示了相对于对照增加的血小板计数。图 6 显示了应答截短的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽给药时,巨核细胞数目相对于未处理的动物增加,其可以与 TPO 给药后观测到增加的数目相比。这些结果表明,酪氨酰-tRNA 合成酶多肽片段,特别是 C-末端截短的片段能够刺激体内的血小板生成。

[0278] 实施例 2

[0279] 血小板生成的体外测量

[0280] 还在体外检测了对血小板生成的影响。干细胞在体外用本发明的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽处理以利用集落形成细胞 (CFC) 测定来确定它对红系、髓系和巨核细胞谱系的造血祖细胞的影响(例如,抑制、刺激、毒性、与其他细胞因子的协同、造血缺陷)。此外,CD34+ 巨核细胞祖细胞在体外用本发明的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽处理以监测巨核细胞扩增和分化(例如,祖细胞数目的增加、分化的刺激、多倍体的增加)。利用来自用酪氨酰-tRNA 合成酶多肽处理过的小鼠的骨髓和脾脏进行类似的实验。

[0281] 实施例 3

[0282] 组合疗法刺激血小板生成

[0283] 为了评估本发明的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽是否对体外巨核细胞的增殖和分化具有协同和/或相加效应,在最优的或次最优的诸如 IL-11 的细胞因子制剂 (StemCell Technologies, Vancouver) 存在的情况下,CD34+ 脐带血细胞生长于液体培养基中,并用渐增浓度的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽处理。通过监测祖细胞在两种制剂条件中的生长和分化能够确定相加作用或协同作用。

[0284] 类似地,在与实施例 1 描述的操作相当的操作方案中,给小鼠注射限制量的促血小板生成素和注射渐增量的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽,并且通过血小板和巨核细胞计数能够确定这种组合疗法对体内血小板生成的影响。此外,与限制量的参与造血的其他细胞因子、趋化因子和/或生长因子的组合疗法能够利用相同类型的方案来评价。

[0285] 实施例 4

[0286] 酪氨酰-tRNA 合成酶多肽在大鼠体内的血小板生成活性

[0287] 在大鼠中检测了两种酪氨酰-tRNA 合成酶多肽对血小板生成的影响。下述实验中利用的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽是 i) C-末端截短体,其包含融合到 8 氨基酸 C-末端组氨酸标签 (SEQ ID NO:5) 的全长人酪氨酰-tRNA 的氨基酸 1-364 (SEQ ID NO:3),和 ii) 全

长人酪氨酰-tRNA 合成酶的突变体,在 341 位具有单个酪氨酸到丙氨酸的氨基酸取代,称为"Y341A"(SEQ ID NO:2)。

[0288] 为了测量酪氨酰-tRNA 合成酶多肽对血小板生成的影响,在第一次安排的注射前一天确定每只大鼠的血小板计数,并将动物根据它们初始的血小板计数分为 7 个组别。三组大鼠分别给一天一次静脉内注射 0.1, 10 和 1000 $\mu\text{g/kg}$ 的 C-末端截短的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽,注射 7 天。另外三组被给予相同剂量的 Y341A。一组对照动物每天仅接受缓冲液注射 (0.5X PBS, 2mM DTT), 以及另外一个对照组每天注射 90 $\mu\text{g/kg}$ 的促血小板生成素 (R&D Systems, Minneapolis, MN)。

[0289] 两种酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的给药导致血小板计数的显著提高,相当于或优于促血小板生成素组观测的血小板计数提高 (参加实施例 20)。这些结果表明,酪氨酰-tRNA 合成酶多肽能够刺激体内血小板生成。

[0290] 实施例 5

[0291] 酪氨酰-tRNA 合成酶多肽是巨核细胞的化学引诱物

[0292] 将 M07e 细胞 (DSMZ, Braunschweig, Germany) 在添加了 20% 热灭活的 FBS 和 10ng/ml IL-3 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 的 RPMI-1640 培养基中培养。细胞维持在 2×10^5 至 1×10^6 /ml 的密度,含有 0.1% BSA 的 RPMI-1640 培养基作为迁移缓冲液。在迁移测定前,细胞在迁移缓冲液中进行血清饥饿 30 分钟,并负载 8 $\mu\text{g/ml}$ 的钙黄绿素 AM (Invitrogen, Carlsbad, CA)。细胞在 200g 下无制动 (brake) 离心 5 分钟,并用迁移缓冲液洗涤一次以去除游离的钙黄绿素 AM。细胞密度调整为 1×10^7 /ml,将 100 μl 加入到 6.5mm transwell 8.0 μm 孔径的过滤插入物 (filter inserts) (Costar, Cambridge, MA)。将含有 PBS、对照趋化因子或酪氨酰-tRNA 合成酶多肽的 600 μl 迁移缓冲液加入到下室,允许细胞迁移 4 至 16 小时 (对于 16 小时的迁移时间,细胞在迁移后被染色)。收集迁移到下室的细胞并重悬在 100 μl PBS 中,转移到 384-孔的不透明 Greiner 板中,并在读板仪中通过荧光计数。图 21 显示了酪氨酰-tRNA 合成酶多肽刺激 M07e 原巨核细胞迁移。

[0293] 实施例 6

[0294] 酪氨酰-tRNA 合成酶多肽通过刺激 VCAM-1 表达促进细胞粘附到内皮单层

[0295] 对 YRS 多肽刺激 THP-1 细胞到 HUVEC-2 细胞内皮单层的粘附的能力进行了检测。HUVEC-2 细胞 (BD Biosciences, San Jose, CA) 被培养在 EGM-2 培养基中 (Lonza, Allendale, NJ) 并在它们达到 10 代前使用。THP-1 细胞 (ATCC, Manassas, VA) 被培养在添加有 10% 热灭活的 FBS 的 RPMI-1640 培养基中,并维持在 $2-4 \times 10^5$ /ml 的密度。将细胞以约 1×10^4 细胞/孔接种在纤维粘连蛋白包被的 (10 $\mu\text{g/ml}$, 在 37°C 进行 2 小时) 不透明 96-孔板中。

[0296] HUVEC-2 细胞生长直到形成单层,然后在 EGM-2 培养基中用 PBS、IL-1 β 或酪氨酰-tRNA 合成酶多肽刺激过夜。收集 THP-1 细胞并在含 0.1% BSA 和钙黄绿素 AM (6 $\mu\text{l/ml}$) 的 RPMI-1640 无血清培养基中孵育 30 分钟。然后将细胞在含 0.1% BSA 的 RPMI-1640 无血清培养基中洗涤,并以 1.5×10^5 细胞/ml 的密度重悬在含有 10% FBS 的 RPMI 培养基中。将 100 μl THP-1 细胞添加至 HUVEC 单层并孵育 15 分钟。未结合的 THP-1 细胞用 PBS 洗涤两次,剩余的细胞用 2% 甲醛固定,并在读板仪中通过荧光计数。

[0297] 图 22 显示了 THP-1 荧光细胞对用酪氨酰-tRNA 合成酶多肽处理过的内皮单层的

粘附。

[0298] 测量了内皮单层暴露于酪氨酰-tRNA 合成酶多肽后粘附分子的表达。如前段所述,将 1×10^4 HUVEC-2 细胞接种在 96 孔板中,并生长 48 小时。将稀释在生长培养基中的酪氨酰-tRNA 合成酶多肽添加至孔中并孵育 16 小时。去除培养基并将细胞用 $50 \mu\text{l}$ Z fix (Anatech Ltd, Battle Creek, MI) 在室温固定 15 分钟。随后将孔用 $50 \mu\text{l}$ 酪蛋白封闭 1 小时,接着用 PBS 进行多次 $200 \mu\text{l}$ 洗涤。随后所有的试剂稀释在酪蛋白中,并在室温下进行所有步骤。添加抗 VCAM-1 和 E-选择素的抗体 (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA) 1 小时。然后如上述洗涤孔,并加入 HRP-标记的二抗 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 1 小时。洗涤孔,然后加入 HRP 的底物。15 分钟后,加入等体积的 2M 硫酸,测定 450nm 的吸光度。

[0299] 图 23 显示了内皮细胞用酪氨酰-tRNA 合成酶多肽刺激后,VCAM-1 表达增加。

[0300] 实施例 7

[0301] 酪氨酰-tRNA 合成酶多肽刺激转染了 CXCR-2 受体的 293 和 CHO 细胞系的迁移

[0302] 通过测定表达 CXCR-2 的细胞应答酪氨酰-tRNA 合成酶多肽时的迁移,检测了该多肽对 CXCR-2 信号传导的影响。293/CXCR-2 细胞维持在添加了 10% 热灭活的 FBS、1% 青霉素-链霉素和 $800 \mu\text{g/ml}$ 的遗传霉素 (Geneticin) 的 DMEM 培养基中,所有试剂购自 Invitrogen, Carlsbad, CA。含有 0.1% BSA 的 DMEM 培养基用作迁移缓冲液。在迁移测定前,细胞在迁移缓冲液中进行血清饥饿 30 分钟,以 200g 离心 5 分钟,并以 1×10^6 细胞/ml 的终密度重悬在迁移缓冲液中。将 $100 \mu\text{l}$ 加入到 6.5mm transwell 过滤插入物 (Costar, Cambridge, MA), 含有对照趋化因子、酪氨酰-tRNA 合成酶多肽或仅缓冲液的 $600 \mu\text{l}$ 迁移缓冲液添加至板的下室中。允许细胞迁移 4 小时,用棉拭子移走上室 (transwell 过滤插入物) 中剩余的细胞。然后将过滤插入物转移到含有 $500 \mu\text{l}$ 细胞解离缓冲液 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 和 $12 \mu\text{g/ml}$ 钙黄绿素 AM (Invitrogen, Carlsbad, CA) 的新 24 孔板中。在 37°C 孵育 1 小时后,收集细胞并悬浮在 $100 \mu\text{l}$ PBS 中,转移入 384-孔不透明 Greiner 板中,在读板仪中通过荧光计数。

[0303] CHO-K1/CXCR-2 维持在添加了 10% 热灭活 FBS、1% 青霉素-链霉素-谷氨酰胺和 $800 \mu\text{g/ml}$ 的遗传霉素的 F12 培养基中。含有 0.5% BSA 的 F12 培养基用作迁移缓冲液。迁移前,细胞在迁移缓冲液中进行血清饥饿 30 分钟,通过使用细胞解离缓冲液收集,在 200g 下离心 5 分钟,并以 1×10^6 细胞/ml 的终密度重悬在迁移缓冲液中。将 $100 \mu\text{l}$ 加入到 6.5mm transwell 过滤插入物 (Costar, Cambridge, MA), 含有对照趋化因子、酪氨酰-tRNA 合成酶多肽或仅缓冲液的 $600 \mu\text{l}$ 迁移缓冲液添加至板的下室中。允许细胞迁移 3 小时,用棉拭子移走上室 (transwell 过滤插入物) 中剩余的细胞。然后将过滤插入物转移到含有 $500 \mu\text{l}$ PBS 和 $12 \mu\text{g/ml}$ 钙黄绿素 AM 的新 24 孔板中。在 37°C 孵育 30 分钟后,将插入物再次转移至含有 $500 \mu\text{l}$ 无酚红胰蛋白酶的新 24 孔板中。孵育 2-5 分钟后,收集脱离的细胞并悬浮在 $100 \mu\text{l}$ PBS 中,转移至 384-孔不透明 Greiner 板中,在读板仪中通过荧光计数。

[0304] 图 24 证实了酪氨酰-tRNA 合成酶多肽诱导 CXCR-2 转染的细胞迁移的能力。

[0305] 实施例 8

[0306] 酪氨酰-tRNA 合成酶多肽刺激多形核 (PMN) 细胞迁移为了检测 YRS 多肽对 PMN 细胞迁移的影响,利用 RosetteSep® 人粒细胞富集试剂盒 (StemCell Technologies,

Vancouver, BC), 按照生产商的说明书, 从新鲜的人外周血纯化人粒细胞。添加了 0.5% FBS 的无血清的 RPMI 培养基作为迁移缓冲液。将 4×10^7 细胞重悬在 1ml 迁移缓冲液中, 并用 $8 \mu\text{l}$ 的 1mg/ml 钙黄绿素 AM 溶液 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 孵育 30 分钟。收集细胞, 以 200g 无制动离心 5 分钟, 用迁移缓冲液洗涤一次并以 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 的终浓度重悬在相同缓冲液中。

[0307] 将 $100 \mu\text{l}$ 加入到 6.5mm transwell 过滤插入物 (Costar, Cambridge, MA), 以及含有对照趋化因子、酪氨酰-tRNA 合成酶多肽或仅缓冲液的 $600 \mu\text{l}$ 迁移缓冲液添加至板的下室中。允许细胞在孵育器中迁移 45 分钟, 并且收集迁移到下室的细胞, 重悬在 $100 \mu\text{l}$ PBS 中, 转移至 384-孔不透明 Greiner 板中, 以及在读板仪中通过荧光计数。

[0308] 图 25 显示了通常使用趋化因子观测到的钟形迁移曲线。酪氨酰-tRNA 合成酶多肽在低 pM 和较高的 μM 浓度时诱导双相迁移。

[0309] 实施例 9

[0310] 酪氨酰-tRNA 合成酶多肽防止嗜中性细胞在脂多糖 (LPS) 激发后浸润到肺脏 (预防实施例)

[0311] 嗜中性细胞从循环系统迁移到肺脏参与慢性阻塞性肺疾病 (COPD) (参见, 例如 R. A. Stockley, Chest 121:151S-155S, 2002)。CXCR-2 表达在嗜中性细胞迁移中发挥作用 (参见, 例如 Rios-Santos et al, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 175:490-497, 2007)。开发动物模型来检测酪氨酰-tRNA 合成酶多肽在 COPD 中的作用。变应原激发之前和期间, 以实现循环中嗜中性细胞脱敏所需的浓度和频率通过静脉给予动物酪氨酰-tRNA 合成酶多肽 (例如, 100ng/kg 至 5mg/kg, 以及例如在给予 LPS 前 12 小时、1 小时和给予 LPS 后 4 小时)。然后将动物进行变应原激发 (例如, 经由鼻内给药途径将 LPS 输入肺中)。4-8 小时后, 使动物安乐死, 并插入气管导管通过用等渗盐溶液灌注肺脏以收集支气管肺泡灌洗 (BAL) 样品。分析 BAL 流体的总细胞计数和不同的细胞计数。

[0312] 在该实施例中, 酪氨酰-tRNA 合成酶多肽能够防止嗜中性细胞应答 LPS 激发时迁移到肺。

[0313] 实施例 10

[0314] 酪氨酰-tRNA 合成酶多肽影响骨髓细胞培养物中的巨核细胞祖细胞

[0315] 为了检测 YRS 多肽对骨髓细胞培养物中的巨核细胞祖细胞的影响, 在无血清的胶原蛋白培养基 MegaCult-C® 4950 中评估了巨核细胞的集落形成祖细胞 (CFU-Mk, 集落形成单位-巨核细胞) 谱系, 所述培养基添加了专有浓度的细胞因子 (StemCell Technologies, Vancouver, BC)。正常人骨髓低密度细胞 (Lonza, Allendale, NJ) 储存在 -152°C 直至需要测试。实验当天, 细胞在 37°C 迅速解冻, 将小瓶中的内容物稀释在 10mL 含有 2% 胎牛血清 (FBS) 的 Iscove's 改良的 Dulbecco's 培养基 (IMDM) 中, 并通过离心洗涤 (1200rpm 离心 10 分钟, 室温下)。丢弃上清液, 并将细胞沉淀重悬在已知体积的含 2% FBS 的 IMDM 中。进行细胞计数 (3% 冰醋酸) 以及存活力评估 (台盼蓝排斥试验)。

[0316] 酪氨酰-tRNA 合成酶多肽 (储存在 50% 甘油 / 0.5X PBS / 2mM DTT 中) 在 0.5X PBS / 2mM DTT 中透析总共 5 小时, 3 小时后换一次缓冲液以便去除甘油。透析后, 将蛋白和缓冲样品无菌过滤, 并调整浓度以补偿体积的增加。

[0317] 测试蛋白 (YRS 多肽) 添加到无血清的胶原蛋白培养基 MegaCult-C® 4950 的管

中,所述培养基添加了细胞因子(rhTpo, rhIL-3 和 rhIL-6)。也包括标准对照培养(不含测试蛋白)和溶剂对照培养(不含测试蛋白,但含等同浓度的缓冲液)。然后将骨髓细胞添加到每管培养基中以得到每一载片 1×10^5 细胞的终浓度。然后加入牛胶原蛋白,振荡管,将内容物分配到一式三份的双室载片中。所有培养物在 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 下孵育 10-12 天。

[0318] 孵育后,在显微镜下评估培养物的集落形成,然后使载片脱水和固定。利用检测 GPIIa/IIIb(CD41) 表达的抗体染色操作方案,利用碱性磷酸酶检测系统使载片上的集落染色,如 StemCell Technical Manual" Assays for the Quantitation of Human and Murine Megakaryocyte Progenitors", 第 7 节中所述的,其通过引用的方式以其整体并入本文。集落数目由经过训练的 StemCell 人员打分和评估。基于大小和形态,将集落分为以下类别, i) CFU-Mk(2-20)- 衍生自更成熟的祖细胞的小巨核细胞集落包含 2-20 个细胞; ii) CFU-Mk- 衍生自更原始的祖细胞的中等巨核细胞集落包含 21-49 个细胞; 以及 iii) CFU-Mk(> 50)- 衍生自最原始的谱系- 限制性祖细胞的大巨核细胞集落包含大于 50 个的细胞。

[0319] 图 26 显示了酪氨酰-tRNA 合成酶多肽对最原始的谱系限制性祖细胞的影响(刺激)(图 26(A)),以及对更成熟的祖细胞的影响(抑制)(图 26(A) 和 (B))。

[0001]

序列表

<110> ATYR 医药公司
拉杰什·贝拉尼;
杰弗里·迪安·沃特金斯;
张伟;
阿兰·菲利普·瓦瑟洛特

<120> 酪氨酰-tRNA合成酶多肽的血小板生成活性

<130> 120161.409PC

<140> PCT

<141> 2009-06-10

<160> 15

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 528

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

```

Met Gly Asp Ala Pro Ser Pro Glu Glu Lys Leu His Leu Ile Thr Arg
 1           5           10
Asn Leu Gln Glu Val Leu Gly Glu Glu Lys Leu Lys Glu Ile Leu Lys
 20           25           30
Glu Arg Glu Leu Lys Ile Tyr Trp Gly Thr Ala Thr Thr Gly Lys Pro
 35           40           45
His Val Ala Tyr Phe Val Pro Met Ser Lys Ile Ala Asp Phe Leu Lys
 50           55           60
Ala Gly Cys Glu Val Thr Ile Leu Phe Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu
 65           70           75           80
Asp Asn Met Lys Ala Pro Trp Glu Leu Leu Glu Leu Arg Val Ser Tyr
 85           90           95
Tyr Glu Asn Val Ile Lys Ala Met Leu Glu Ser Ile Gly Val Pro Leu
100          105          110
Glu Lys Leu Lys Phe Ile Lys Gly Thr Asp Tyr Gln Leu Ser Lys Glu
115          120          125
Tyr Thr Leu Asp Val Tyr Arg Leu Ser Ser Val Val Thr Gln His Asp
130          135          140
Ser Lys Lys Ala Gly Ala Glu Val Val Lys Gln Val Glu His Pro Leu
145          150          155          160
Leu Ser Gly Leu Leu Tyr Pro Gly Leu Gln Ala Leu Asp Glu Glu Tyr
165          170          175
Leu Lys Val Asp Ala Gln Phe Gly Gly Ile Asp Gln Arg Lys Ile Phe
180          185          190
Thr Phe Ala Glu Lys Tyr Leu Pro Ala Leu Gly Tyr Ser Lys Arg Val
195          200          205
His Leu Met Asn Pro Met Val Pro Gly Leu Thr Gly Ser Lys Met Ser
210          215          220
Ser Ser Glu Glu Glu Ser Lys Ile Asp Leu Leu Asp Arg Lys Glu Asp
225          230          235          240
Val Lys Lys Lys Leu Lys Lys Ala Phe Cys Glu Pro Gly Asn Val Glu
245          250          255
Asn Asn Gly Val Leu Ser Phe Ile Lys His Val Leu Phe Pro Leu Lys

```

[0002]

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

<210> 2
 <211> 528
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 2

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

[0003]

Leu	Lys	Val	Asp	165	Ala	Gln	Phe	Gly	Gly	170	Ile	Asp	Gln	Arg	Lys	175	Ile	Phe
Thr	Phe	Ala	Glu	180	Lys	Tyr	Leu	Pro	Ala	185	Leu	Gly	Tyr	Ser	Lys	190	Arg	Val
His	Leu	Met	Asn	195	Pro	Met	Val	Pro	Gly	200	Leu	Thr	Gly	Ser	Lys	205	Met	Ser
Ser	Ser	Glu	Glu	210	Glu	Ser	Lys	Ile	Asp	215	Leu	Leu	Asp	Arg	Lys	220	Glu	Asp
Val	Lys	Lys	Lys	225	Leu	Lys	Lys	Ala	Phe	230	Cys	Glu	Pro	Gly	Asn	235	Val	Glu
Asn	Asn	Gly	Val	245	Leu	Ser	Phe	Ile	Lys	250	His	Val	Leu	Phe	Pro	255	Leu	Lys
Ser	Glu	Phe	Val	260	Ile	Leu	Arg	Asp	Glu	265	Lys	Trp	Gly	Gly	Asn	270	Lys	Thr
Tyr	Thr	Ala	Tyr	275	Val	Asp	Leu	Glu	Lys	280	Asp	Phe	Ala	Ala	Glu	285	Val	Val
His	Pro	Gly	Asp	290	Leu	Lys	Asn	Ser	Val	295	Glu	Val	Ala	Leu	Asn	300	Lys	Leu
Leu	Asp	Pro	Ile	305	Arg	Glu	Lys	Phe	Asn	310	Thr	Pro	Ala	Leu	Lys	315	Lys	Leu
Ala	Ser	Ala	Ala	325	Ala	Pro	Asp	Pro	Ser	330	Lys	Gln	Lys	Pro	Met	335	Ala	Lys
Gly	Pro	Ala	Lys	340	Asn	Ser	Glu	Pro	Glu	345	Glu	Val	Ile	Pro	Ser	350	Arg	Leu
Asp	Ile	Arg	Val	355	Gly	Lys	Ile	Ile	Thr	360	Val	Glu	Lys	His	Pro	365	Asp	Ala
Asp	Ser	Leu	Tyr	370	Val	Glu	Lys	Ile	Asp	375	Val	Gly	Glu	Ala	Glu	380	Pro	Arg
Thr	Val	Val	Ser	385	Gly	Leu	Val	Gln	Phe	390	Val	Pro	Lys	Glu	Glu	395	Leu	Gln
Asp	Arg	Leu	Val	405	Val	Val	Leu	Cys	Asn	410	Leu	Lys	Pro	Gln	Lys	415	Met	Arg
Gly	Val	Glu	Ser	420	Gln	Gly	Met	Leu	Leu	425	Cys	Ala	Ser	Ile	Glu	430	Gly	Ile
Asn	Arg	Gln	Val	435	Glu	Pro	Leu	Asp	Pro	440	Pro	Pro	Ala	Gly	Ser	445	Ala	Gly
Glu	His	Val	Phe	450	Val	Lys	Gly	Tyr	Glu	455	Lys	Gly	Gln	Pro	Asp	460	Glu	Glu
Leu	Lys	Pro	Lys	465	Lys	Lys	Val	Phe	Glu	470	Lys	Leu	Gln	Ala	Asp	475	Phe	Lys
Ile	Ser	Glu	Glu	485	Cys	Ile	Ala	Gln	Trp	490	Lys	Gln	Thr	Asn	Phe	495	Met	Thr
Lys	Leu	Gly	Ser	500	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	505	Leu	Lys	Gly	Gly	Asn	510	Ile	Ser
				515						520						525		

<210> 3

<211> 364

<212> PRT

<213> 人

<400> 3

Met	Gly	Asp	Ala	Pro	Ser	Pro	Glu	Glu	Lys	Leu	His	Leu	Ile	Thr	Arg
1				5					10					15	
Asn	Leu	Gln	Glu	Val	Leu	Gly	Glu	Glu	Lys	Leu	Lys	Glu	Ile	Leu	Lys
			20					25					30		
Glu	Arg	Glu	Leu	Lys	Ile	Tyr	Trp	Gly	Thr	Ala	Thr	Thr	Gly	Lys	Pro
			35				40					45			
His	Val	Ala	Tyr	Phe	Val	Pro	Met	Ser	Lys	Ile	Ala	Asp	Phe	Leu	Lys
			50			55					60				
Ala	Gly	Cys	Glu	Val	Thr	Ile	Leu	Phe	Ala	Asp	Leu	His	Ala	Tyr	Leu

[0004]

65	70	75	80
Asp Asn Met Lys	Ala Pro Trp Glu Leu	Leu Glu Leu Arg Val	Ser Tyr
	85	90	95
Tyr Glu Asn Val	Ile Lys Ala Met	Leu Glu Ser Ile Gly	Val Pro Leu
	100	105	110
Glu Lys Leu Lys	Phe Ile Lys Gly Thr	Asp Tyr Gln Leu	Ser Lys Glu
	115	120	125
Tyr Thr Leu Asp	Val Tyr Arg Leu	Ser Ser Val Val	Thr Gln His Asp
	130	135	140
Ser Lys Lys Ala	Gly Ala Glu Val	Val Lys Gln Val	Glu His Pro Leu
	145	150	155
Leu Ser Gly Leu	Leu Tyr Pro Gly	Leu Gln Ala Leu	Asp Glu Glu Tyr
	165	170	175
Leu Lys Val Asp	Ala Gln Phe Gly	Gly Ile Asp Gln	Arg Lys Ile Phe
	180	185	190
Thr Phe Ala Glu	Lys Tyr Leu Pro	Ala Leu Gly Tyr	Ser Lys Arg Val
	195	200	205
His Leu Met Asn	Pro Met Val Pro	Gly Leu Thr Gly	Ser Lys Met Ser
	210	215	220
Ser Ser Glu Glu	Glu Ser Lys Ile	Asp Leu Leu Asp	Arg Lys Glu Asp
	225	230	235
Val Lys Lys Lys	Leu Lys Lys Ala	Phe Cys Glu Pro	Gly Asn Val Glu
	245	250	255
Asn Asn Gly Val	Leu Ser Phe Ile	Lys His Val Leu	Phe Pro Leu Lys
	260	265	270
Ser Glu Phe Val	Ile Leu Arg Asp	Glu Lys Trp Gly	Gly Asn Lys Thr
	275	280	285
Tyr Thr Ala Tyr	Val Asp Leu Glu	Lys Asp Phe Ala	Ala Glu Val Val
	290	295	300
His Pro Gly Asp	Leu Lys Asn Ser	Val Glu Val Ala	Leu Asn Lys Leu
	305	310	315
Leu Asp Pro Ile	Arg Glu Lys Phe	Asn Thr Pro Ala	Leu Lys Lys Leu
	325	330	335
Ala Ser Ala Ala	Tyr Pro Asp Pro	Ser Lys Gln Lys	Pro Met Ala Lys
	340	345	350
Gly Pro Ala Lys	Asn Ser Glu Pro	Glu Glu Val Ile	
	355	360	

<210> 4

<211> 1683

<212> DNA

<213> 人

<400> 4

```

atgggggacg ctcccagccc tgaagagaaa ctgcacctta tcacccggaa cctgcaggag 60
gttctggggg aagagaagct gaaggagata ctgaaggagc gggaacttaa aatttactgg 120
ggaacggcaa ccacgggcaa accacatgtg gcttactttg tgcccatgtc aaagattgca 180
gacttcttaa agcaggggtg tgaggttaaca attctgtttg cggacctcca cgcatactg 240
gataacatga aagcccatg ggaacttcta gaactccgag tcagttacta tgagaatgtg 300
atcaaagcaa tgcaggagag cattggtgtg cccttgaga agctcaagtt catcaaaggc 360
actgattacc agctcagcaa agagtacaca ctgatgtgt acagactctc ctccgtggtc 420
acacagcacg attccaagaa ggctggagct gaggtggtaa agcaggtgga gcaccctttg 480
ctgagtggcc tcttataccc cggactgcag gctttggatg aagagtattt aaaagtagat 540
gcccaatttg gaggcattga tcagagaaag attttcacct ttgcagagaa gtacctccct 600
gcacttggtt attcaaaacg ggtccatctg atgaatccta tggttccagg attaacaggc 660
agcaaaatga gctcttcaga agaggagtcc aagattgatc tccttgatcg gaaggaggat 720
gtgaagaaaa aactgaagaa ggccttctgt gagccaggaa atgtggagaa caatggggtt 780
ctgtccttca tcaagcatgt cctttttccc cttaagtccg agtttgtgat cctacgagat 840
gagaaatggg gtggaaacaa aacctacaca gcttacgtgg acctggaaaa ggactttgct 900
gctgaggttg tacatcctgg agacctgaag aattctgttg aagtcgcact gaacaagttg 960
ctggatccaa tccgggaaaa gttaataacc cctgccctga aaaaactggc cagcgctgcc 1020

```

[0005]

```

taccagatc cctcaaagca gaagccaatg gccaaaggcc ctgccaagaa ttcagaacca 1080
gaggaggta tcccatcccg gctggatata cgtgtgggga aaatcatcac tgtggagaag 1140
caccagatg cagacagcct gtatgtagag aagattgacg tgggggaagc tgaaccacgg 1200
actgtggtga gcggcctggt acagttcgtg cccaaggagg aactgcagga caggctggtg 1260
gtggtgctgt gcaacctgaa accccagaag atgagaggag tcgagtccca aggcattgctt 1320
ctgtgtgctt ctatagaagg gataaacgcg caggttgaa cttctggacc tccggcaggc 1380
tctgctcctg gtgagcacgt gtttgtgaag ggctatgaaa agggccaacc agatgaggag 1440
ctcaagccca agaagaaagt cttcgagaag ttgcaggctg acttcaaaat ttctgaggag 1500
tgcatcgcac agtgggaagca aaccaacttc atgaccaagc tgggctccat ttctgtaaa 1560
tcgctgaaag gggggaacat tagctagcca gccagcatc tccccccctt cttccaccac 1620
tgagtcatct gctgtctctt cagtctgctc catccatcac ccatttacc atctctcagg 1680
aca 1683

```

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> C-末端标签

<400> 5

Leu Glu His His His His His His

1

5

<210> 6

<211> 348

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 变体

<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

<223> Xaa = 任意氨基酸

<400> 6

```

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Ile Phe Thr Phe Ala Glu
1 5 10 15
Lys Tyr Leu Pro Ala Leu Gly Tyr Ser Lys Arg Val His Leu Met Asn
20 25 30
Pro Met Val Pro Gly Leu Thr Gly Ser Lys Met Ser Ser Ser Glu Glu
35 40 45
Glu Ser Lys Ile Asp Leu Leu Asp Arg Lys Glu Asp Val Lys Lys Lys
50 55 60
Leu Lys Lys Ala Phe Cys Glu Pro Gly Asn Val Glu Asn Asn Gly Val
65 70 75 80
Leu Ser Phe Ile Lys His Val Leu Phe Pro Leu Lys Ser Glu Phe Val
85 90 95
Ile Leu Arg Asp Glu Lys Trp Gly Gly Asn Lys Thr Tyr Thr Ala Tyr
100 105 110
Val Asp Leu Glu Lys Asp Phe Ala Ala Glu Val Val His Pro Gly Asp
115 120 125
Leu Lys Asn Ser Val Glu Val Ala Leu Asn Lys Leu Leu Asp Pro Ile
130 135 140
Arg Glu Lys Phe Asn Thr Pro Ala Leu Lys Lys Leu Ala Ser Ala Ala
145 150 155 160
Tyr Pro Asp Pro Ser Lys Gln Lys Pro Met Ala Lys Gly Pro Ala Lys
165 170 175
Asn Ser Glu Pro Glu Glu Val Ile Pro Ser Arg Leu Asp Ile Arg Val
180 185 190
Gly Lys Ile Ile Thr Val Glu Lys His Pro Asp Ala Asp Ser Leu Tyr

```

[0006]

Val	Glu	Lys	Ile	Asp	Val	Gly	Glu	Ala	Glu	Pro	Arg	Thr	Val	Val	Ser
210						215					220				
Gly	Leu	Val	Gln	Phe	Val	Pro	Lys	Glu	Glu	Leu	Gln	Asp	Arg	Leu	Val
225					230					235					240
Val	Val	Leu	Cys	Asn	Leu	Lys	Pro	Gln	Lys	Met	Arg	Gly	Val	Glu	Ser
			245						250					255	
Gln	Gly	Met	Leu	Cys	Ala	Ser	Ile	Glu	Gly	Ile	Asn	Arg	Gln	Val	
			260				265					270			
Glu	Pro	Leu	Asp	Pro	Pro	Ala	Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Glu	His	Val	Phe
		275					280					285			
Val	Lys	Gly	Tyr	Glu	Lys	Gly	Gln	Pro	Asp	Glu	Glu	Leu	Lys	Pro	Lys
290						295					300				
Lys	Lys	Val	Phe	Glu	Lys	Leu	Gln	Ala	Asp	Phe	Lys	Ile	Ser	Glu	Glu
305					310					315					320
Cys	Ile	Ala	Gln	Trp	Lys	Gln	Thr	Asn	Phe	Met	Thr	Lys	Leu	Gly	Ser
			325						330					335	
Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Leu	Lys	Gly	Gly	Asn	Ile	Ser				
			340					345							

<210> 7

<211> 2178

<212> DNA

<213> 人

<400> 7

```

ttcagaaagt ggtggaggga agacttcctt tttcccagag acagaagggtt atgcacccag 60
tggcctggga ccattgttct gggctttttt tcccttcgac atggatttgc ttctcactgt 120
gtaccccaac caccaaaacc accctgagat caatgctggg gctcctgcat cagatggctt 180
agagatcctt ccacctctta acacaagcat ctaggctccac tttactcaaa tctggcctca 240
gttgagagca gattatacca tcagagccca ttctcctgtc tgctgtctgg gacgtggaaa 300
gaaagttagc tctagggggg ctttcagggg gcctctgtaa ggactggatg ctcctttccg 360
gaatccaaga gttcaccagg ctgcttctct aatggacgat gatcctctc ctcctgacgt 420
ctctccctgg cagcaccag atgcagacag cctgtatgta gagaagattg acgtggggga 480
agctgaacca cggactgtgg tgagcggcct ggtacagttc gtgccaagg aggaactgca 540
ggacaggctg gtagtggtgc tgtgcaacct gaaaccccag aagatgagag gagtcgagtc 600
ccaaggcatg cttctgtgtg cttctatgtg agtgaggact tggagtgggg cacaggacct 660
ggggaggcca ggaagagtag ggaatcagcc catatgatgt ccttcacac accaggtgga 720
agctctgaga acacgtgcct ctctcttget gatgccaaaa gttgatgcat gaaggactta 780
tcgtacaagt actgttaatg aagcatttta cctacagtta atttgttaa aatagaaatg 840
gagggtcaa accagtacat acccaagtct tactactagt aaggagtgga gcagggttc 900
aaatcccagt tttgatgtct ataaagtctt cgctacgtta ttttatactt cctcccttag 960
aaacacagat tttgtatct tgacacacaa ttttggata gcctgggtta atgtaaccct 1020
ggtgatatgc aggatgtag caagataaga ggacctctg gggctctggg actgaggatg 1080
ccctaaatcc catcaggggc cctgtgtaaa ggcccggatt gctttggcct ccacagtcac 1140
tggaacccat ccatagcctc actcttctct tgctctgtgt cttcccagag aagggataaa 1200
ccgccagggt gaacctctgg accctccggc aggetctget cctggtgagc acgtgtttgt 1260
gaagggtat gaaaagggcc aaccagatga ggagctcaag cccaagagga aagtcttcga 1320
gaagtgcag gctgacttca aaatttctga ggagtgcac gcacagtgga agcaaaccac 1380
cttcatgacc aagctgggct ccatttctct taaatcgtct aaagggggga acattagcta 1440
gccagcccag catcttcccc ctttcttcca cactgagtc atctgctgtc tcttcagtct 1500
gtccaccca tcacccattt acccatctct caggacacgg aagcagcggg tttggactct 1560
ttattcggtg cagaactcgg caaggggcag cttaccctcc ccagaacca ggatcatcct 1620
gtctggctgc agtgagagac caaccctaa caagggtgg gccacagcag ggagtccagc 1680
cctaccttct tccttggca gctggagaaa tctggtttca atataactca tttaaaaatt 1740
tatgccacag tccttataat tggaataata ctggtgcccc ggttttcttg gatttatcca 1800
agcagctgcg cccctagctg ggatctggtg cctggactag gctaattaca gcttctcccc 1860
aacaggaaac tgtgggattt gaaaaggaaa gggaagggaa aacagagaac ctagtggctc 1920
accaagtggg tggcaacttt cccaatgtct gcttactctg aggcttggca ctgggggcca 1980
gggcctgcc cagggtcctt ggaatttccc ttgatccagc taggctggga cactccctaa 2040
atcagctgcg tgtgttagc atcaggcaga atgaatggca gagagtgatt ctgtcttcat 2100

```

[0007]

agaggggtggg gtacttctcc ataaggcatc tcagtc aaat ccccatcact gtcataaatt 2160
 caaataaaat gtctgaac 2178

<210> 8
 <211> 388
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <221> 变体
 <222> 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365,
 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377,
 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388
 <223> Xaa = 任意氨基酸

<400> 8
 Met Gly Asp Ala Pro Ser Pro Glu Glu Lys Leu His Leu Ile Thr Arg
 1 5 10 15
 Asn Leu Gln Glu Val Leu Gly Glu Glu Lys Leu Lys Glu Ile Leu Lys
 20 25 30
 Glu Arg Glu Leu Lys Ile Tyr Trp Gly Thr Ala Thr Thr Gly Lys Pro
 35 40 45
 His Val Ala Tyr Phe Val Pro Met Ser Lys Ile Ala Asp Phe Leu Lys
 50 55 60
 Ala Gly Cys Glu Val Thr Ile Leu Phe Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu
 65 70 75 80
 Asp Asn Met Lys Ala Pro Trp Glu Leu Leu Glu Leu Arg Val Ser Tyr
 85 90 95
 Tyr Glu Asn Val Ile Lys Ala Met Leu Glu Ser Ile Gly Val Pro Leu
 100 105 110
 Glu Lys Leu Lys Phe Ile Lys Gly Thr Asp Tyr Gln Leu Ser Lys Glu
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Asp Val Tyr Arg Leu Ser Ser Val Val Thr Gln His Asp
 130 135 140
 Ser Lys Lys Ala Gly Ala Glu Val Val Lys Gln Val Glu His Pro Leu
 145 150 155 160
 Leu Ser Gly Leu Leu Tyr Pro Gly Leu Gln Ala Leu Asp Glu Glu Tyr
 165 170 175
 Leu Lys Val Asp Ala Gln Phe Gly Gly Ile Asp Gln Arg Lys Ile Phe
 180 185 190
 Thr Phe Ala Glu Lys Tyr Leu Pro Ala Leu Gly Tyr Ser Lys Arg Val
 195 200 205
 His Leu Met Asn Pro Met Val Pro Gly Leu Thr Gly Ser Lys Met Ser
 210 215 220
 Ser Ser Glu Glu Glu Ser Lys Ile Asp Leu Leu Asp Arg Lys Glu Asp
 225 230 235 240
 Val Lys Lys Lys Leu Lys Lys Ala Phe Cys Glu Pro Gly Asn Val Glu
 245 250 255
 Asn Asn Gly Val Leu Ser Phe Ile Lys His Val Leu Phe Pro Leu Lys
 260 265 270
 Ser Glu Phe Val Ile Leu Arg Asp Glu Lys Trp Gly Gly Asn Lys Thr
 275 280 285
 Tyr Thr Ala Tyr Val Asp Leu Glu Lys Asp Phe Ala Ala Glu Val Val
 290 295 300
 His Pro Gly Asp Leu Lys Asn Ser Val Glu Val Ala Leu Asn Lys Leu
 305 310 315 320
 Leu Asp Pro Ile Arg Glu Lys Phe Asn Thr Pro Ala Leu Lys Lys Leu
 325 330 335
 Ala Ser Ala Ala Tyr Pro Asp Pro Ser Lys Gln Lys Pro Met Ala Lys
 340 345 350
 Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 355 360 365

[0008]

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 370 375 380
 Xaa Xaa Xaa Xaa
 385

<210> 9
 <211> 1167
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 9
 atgggggacg ctcccagccc tgaagagaaa ctgcacctta tcacccggaa cctgcaggag 60
 gttctggggg aagagaagct gaaggagata ctgaaggagc gggaacttaa aatttactgg 120
 ggaacggcaa ccacgggcaa accacatgtg gcttactttg tgcccatgtc aaagattgca 180
 gacttcttaa aggcagggtg tgaggttaaca attctgtttg cggacctcca cgcataacctg 240
 gataacatga aagcccatg ggaacttcta gaactccgag tcagttacta tgagaatgtg 300
 atcaaagcaa tgctggagag cattgggtgt cccttggaga agctcaagtt catcaaaggc 360
 actgattacc agctcagcaa agagtacaca ctagatgtgt acagactctc ctccgtggtc 420
 acacagcacg attccaagaa ggctggagct gaggtggtaa agcagggtga gcaccctttg 480
 ctgagtggcc tcttataccc cggactgcag gctttggatg aagagtattt aaaagtagat 540
 gccaattttg gaggcattga tcagagaaag attttcacct ttgcagagaa gtacctccct 600
 gcacttggct attcaaaacg ggtccatctg atgaatccta tggttccagg attaacaggc 660
 agcaaaatga gctcttcaga agaggagtcc aagattgacg tccttgatcg gaaggaggat 720
 gtgaagaaaa aactgaagaa ggccttctgt gagccaggaa atgtggagaa caatgggggt 780
 ctgtccttca tcaagcatgt cctttttccc cttaagtccg agtttgtgat cctacgagat 840
 gagaaatggg gtggaacaa aacctacaca gcttacgtgg acctggaaaa ggactttgct 900
 gctgaggttg tacatcctgg agacctgaag aattctgttg aagtcgact gaacaagttg 960
 ctggatccaa tccgggaaaa gtttaatacc cctgccctga aaaaactggc cagcgctgcc 1020
 taccagatc cctcaaagca gaagccaatg gccaaaggcc tgccaagaat tcagaaccag 1080
 aggaggtcat cccatcccgg ctggatatcc gtgtggggaa aatcatcact gtggagaagc 1140
 acccagatgc agacagcctg tatgtag 1167

<210> 10
 <211> 318
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 10
 Met Asn Pro Met Val Pro Gly Leu Thr Gly Ser Lys Met Ser Ser Ser
 1 5 10 15
 Glu Glu Glu Ser Lys Ile Asp Leu Leu Asp Arg Lys Glu Asp Val Lys
 20 25 30
 Lys Lys Leu Lys Lys Ala Phe Cys Glu Pro Gly Asn Val Glu Asn Asn
 35 40 45
 Gly Val Leu Ser Phe Ile Lys His Val Leu Phe Pro Leu Lys Ser Glu
 50 55 60
 Phe Val Ile Leu Arg Asp Glu Lys Trp Gly Gly Asn Lys Thr Tyr Thr
 65 70 75 80
 Ala Tyr Val Asp Leu Glu Lys Asp Phe Ala Ala Glu Val Val His Pro
 85 90 95
 Gly Asp Leu Lys Asn Ser Val Glu Val Ala Leu Asn Lys Leu Leu Asp
 100 105 110
 Pro Ile Arg Glu Lys Phe Asn Thr Pro Ala Leu Lys Lys Leu Ala Ser
 115 120 125
 Ala Ala Tyr Pro Asp Pro Ser Lys Gln Lys Pro Met Ala Lys Gly Pro
 130 135 140
 Ala Lys Asn Ser Glu Pro Glu Glu Val Ile Pro Ser Arg Leu Asp Ile
 145 150 155 160
 Arg Val Gly Lys Ile Ile Thr Val Glu Lys His Pro Asp Ala Asp Ser
 165 170 175
 Leu Tyr Val Glu Lys Ile Asp Val Gly Glu Ala Glu Pro Arg Thr Val

[0009]

Val	Ser	Gly	180	Leu	Val	Gln	Phe	Val	185	Pro	Lys	Glu	Glu	Leu	190	Gln	Asp	Arg
		195							200						205			
Leu	Val	Val	Val	Leu	Cys	Asn	Leu	Lys	Pro	Gln	Lys	Met	Arg	Gly	Val			
	210					215						220						
Glu	Ser	Gln	Gly	Met	Leu	Leu	Cys	Ala	Ser	Ile	Glu	Gly	Ile	Asn	Arg			
225					230					235				240				
Gln	Val	Glu	Pro	Leu	Asp	Pro	Pro	Ala	Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Glu	His			
				245					250					255				
Val	Phe	Val	Lys	Gly	Tyr	Glu	Lys	Gly	Gln	Pro	Asp	Glu	Glu	Leu	Lys			
			260					265					270					
Pro	Lys	Lys	Lys	Val	Phe	Glu	Lys	Leu	Gln	Ala	Asp	Phe	Lys	Ile	Ser			
	275						280					285						
Glu	Glu	Cys	Ile	Ala	Gln	Trp	Lys	Gln	Thr	Asn	Phe	Met	Thr	Lys	Leu			
	290					295				300								
Gly	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Leu	Lys	Gly	Gly	Asn	Ile	Ser					
305					310					315								

<210> 11
 <211> 1736
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 11
 gaaagatttt cacctttgca gagaagtacc tccctgcact tggctattca aaacgggtcc 60
 atctgatgaa tcctatgggt ccaggattaa caggcagcaa aatgagctct tcagaagagg 120
 agtccaagat tgatctcctt gatcggagg aggatgtgaa gaaaaaactg aagaaggcct 180
 tctgtgagcc aggaaatgtg gagaacaatg gggttctgtc ctccatcaag catgtccttt 240
 ttcccttaa gtccgagttt gtgatcctac gagatgagaa atgggggtgga aacaaaacct 300
 acacagctta cgtggacctg gaaaaggact ttgctgtcga gggtgtacat cctggagacc 360
 tgaagaattc tgttgaagtc gcaactgaaca agttgctgga tccaatccgg gaaaagtta 420
 ataccctgc cctgaaaaaa ctggccagcg ctgectacce agatccctca aagcagaagc 480
 caatggccaa aggcctgcc aagaattcag aaccagagga ggtcatccca tcccggctgg 540
 atatccgtgt ggggaaaatc atcactgtgg agaagcacc agatgcagac agcctgtatg 600
 tagagaagat tgacgtgggg gaagctgaac cacggactgt ggtgagcggc ctggtacagt 660
 tegtgcceaa ggaggaactg caggacagge tggtagtggg gctgtgcaac ctgaaacccc 720
 agaagatgag aggagtcgag tcccaaggca tgcttctgtg tgcttctata gaagggataa 780
 accgccaggt tgaacctctg gaccctccgg caggctctgc tcctgggtgag cacgtgtttg 840
 tgaagggcta tgaaaagggc caaccagatg aggagctcaa gcccagaag aaagtcttcg 900
 agaagttgca ggctgacttc aaaatttctg aggagtgcac cgcacagtgg aagcaaacca 960
 acttcatgac caagctgggc tccatttct gtaaatcgct gaaagggggg aacattagct 1020
 agccagccca gcattctccc ccttcttcc accactgagt catctgctgt ctcttcagtc 1080
 tgctccatcc atcacccatt taccatctc tcaggacacg gaagcagcgg gtttggactc 1140
 ttatttcggt gcagaactcg gcaaggggca gcttaccctc ccagaaccc aggatcatcc 1200
 tgtctggctg cagttagaga ccaaccctta acaagggtcg ggccacagca gggagtccag 1260
 ccctaccttc ttcccttggc agctggagaa atctggtttc aatataactc atttaaaaat 1320
 ttatgccaca gtccctataa ttggaaaaat actggtgcc aggttttctt ggagttatcc 1380
 aagcagctgc gccctagct gggatctggt acctggacta ggctaattac agcttctccc 1440
 caacaggaaa ctgtgggatt tgaaaaggaa agggaaggga aaacagagaa cctagtggtc 1500
 taccaagtgg ttggcaactt tcccaatgtc tgcttactct gaggcttggc actggggggc 1560
 agggcctgcc ccaggctcc tggaatttcc cttagtccag ctaggctggg aactcccta 1620
 aatcagctgc gtgttgttag catcaggcag aatgaatggc agagagtgat tctgtcttca 1680
 tagagggtgg ggtacttctc cataaggcat ctcaagtcaa tccccatcac tgtcat 1736

<210> 12
 <211> 179
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 12
 Met Ala Lys Gly Pro Ala Lys Asn Ser Glu Pro Glu Glu Val Ile Pro

[0010]

```

1      5      10      15
Ser Arg Leu Asp Ile Arg Val Gly Lys Ile Ile Thr Val Glu Lys His
20      25      30
Pro Asp Ala Asp Ser Leu Tyr Val Glu Lys Ile Asp Val Gly Glu Ala
35      40      45
Glu Pro Arg Thr Val Val Ser Gly Leu Val Gln Phe Val Pro Lys Glu
50      55      60
Glu Leu Gln Asp Arg Leu Val Val Val Leu Cys Asn Leu Lys Pro Gln
65      70      75      80
Lys Met Arg Gly Val Glu Ser Gln Gly Met Leu Leu Cys Ala Ser Ile
85      90      95
Glu Gly Ile Asn Arg Gln Val Glu Pro Leu Asp Pro Pro Ala Gly Ser
100     105     110
Ala Pro Gly Glu His Val Phe Val Lys Gly Tyr Glu Lys Gly Gln Pro
115     120     125
Asp Glu Glu Leu Lys Pro Lys Lys Val Phe Glu Lys Leu Gln Ala
130     135     140
Asp Phe Lys Ile Ser Glu Cys Ile Ala Gln Trp Lys Gln Thr Asn
145     150     155     160
Phe Met Thr Lys Leu Gly Ser Ile Ser Cys Lys Ser Leu Lys Gly Gly
165     170     175
Asn Ile Ser

```

<210> 13
 <211> 1167
 <212> DNA
 <213> 人

```

<400> 13
atgggggacg ctcccagccc tgaagagaaa ctgcacetta tcaccgggaa cctgcaggag 60
gttctggggg aagagaagct gaaggagata ctgaaggagc gggaacttaa aatttactgg 120
ggaacggcaa ccacgggcaa accacatgtg gcttactttg tgcccatgtc aaagattgca 180
gacttcttaa aggcagggtg tgaggtaaca attctgtttg cggacctcca cgcatacctg 240
gataacatga aagcccatg ggaacttcta gaactccgag tcagttacta tgagaatgtg 300
atcaaagcaa tgctggagag cattggtgtg cccttggaga agctcaagtt catcaaaggc 360
actgattacc agctcagcaa agagtacaca ctagatgtgt acagactcic ctccgtggtc 420
acacagcacg attccaagaa ggctggagct gaggtggtaa agcaggtgga gcaccctttg 480
ctgagtggcc tcttataccc cggactgcag gctttggatg aagagtattt aaaagtagat 540
gccaatttg gaggcattga tcagagaaag attttcacct ttgcagagaa gtacctccct 600
gcacttggt attcaaacg ggtccatctg atgaatccta tggttccagg attaacaggc 660
agcaaatga gctcttcaga agaggagtcc aagattgatc tccttgatcg gaaggaggat 720
gtgaagaaaa aactgaagaa ggccttctgt gagccaggaa atgtggagaa caatggggtt 780
ctgtccttca tcaagcatgt cctttttccc cttaagtccg agtttgtgat cctacgagat 840
gagaaatggg gtggaaacaa aacctacaca gcttacgtgg acctggaaaa ggactttgct 900
gctgaggttg tacatcctgg agacctgaag aattctgttg aagtcgcact gaacaagttg 960
ctggatccaa tccgggaaaa gttaataacc cctgcctga aaaaactggc cagcgtgcc 1020
taccagatc cctcaaagca gaagccaatg gccaaaggcc tgccaagaat tcagaaccag 1080
aggaggtcat cccatcccgg ctggatatcc gtgtggggaa aatcatcact gtggagaagc 1140
accagatgc agacagcctg tatgtag 1167

```

<210> 14
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <221> 变体
 <222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
 <223> Xaa = 任意氨基酸

[0011]

<400> 14

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Met Ala Lys Gly Pro Ala Lys
 1 5 10 15
 Asn Ser Glu Pro Glu Glu Val Ile Pro Ser Arg Leu Asp Ile Arg Val
 20 25 30
 Gly Lys Ile Ile Thr Val Glu Lys His Pro Asp Ala Asp Ser Leu Tyr
 35 40 45
 Val Glu Lys Ile Asp Val Gly Glu Ala Glu Pro Arg Thr Val Val Ser
 50 55 60
 Gly Leu Val Gln Phe Val Pro Lys Glu Glu Leu Gln Asp Arg Leu Val
 65 70 75 80
 Val Val Leu Cys Asn Leu Lys Pro Gln Lys Met Arg Gly Val Glu Ser
 85 90 95
 Gln Gly Met Leu Leu Cys Ala Ser Ile Glu Gly Ile Asn Arg Gln Val
 100 105 110
 Glu Pro Leu Asp Pro Pro Ala Gly Ser Ala Pro Gly Glu His Val Phe
 115 120 125
 Val Lys Gly Tyr Glu Lys Gly Gln Pro Asp Glu Glu Leu Lys Pro Lys
 130 135 140
 Lys Lys Val Phe Glu Lys Leu Gln Ala Asp Phe Lys Ile Ser Glu Glu
 145 150 155 160
 Cys Ile Ala Gln Trp Lys Gln Thr Asn Phe Met Thr Lys Leu Gly Ser
 165 170 175
 Ile Ser Cys Lys Ser Leu Lys Gly Gly Asn Ile Ser
 180 185

<210> 15

<211> 2262

<212> DNA

<213> 人

<400> 15

gccagacaca gtggtcaca cctgtaatct taacactttg gaaggctgag gcaggcggat 60
 cacttgagcc caaaagttag agacaaaac ccagtctcta cccaaaaaaa aaaaaaaaaa 120
 aaaaattagc caggcatagt agcacatgcc tgtagtccca gctacttggg aggctgaggt 180
 gagaggatca cctgagcatg gggaagtga gactgcagtg agccatgac gcaccactgc 240
 actccagcct gggcaacaga gtgagacict atgtctcaaa aaaagaaaaa tgatagaaat 300
 tagattagac ctattatacc caaccggtat atagggtatc gatagtttct tacacagctg 360
 ttgggcagag cctgcagagc ttagagaagc ttatctttag attctcccag tttccttcta 420
 tgtgcatggg cctggctctt agttggccat ccacttgtgc gtaatgctaa gatattggca 480
 ttgatagctt tgtgcgaccc ttccagaaaa aaactcagta actcagtaaa attttttttt 540
 ttttttctaa aagagacaga gtctggtctt gttgcccagc ctggtcttga agtctctggc 600
 ttaagcaatc ctcccgtctc agcctcccaa agtgctagaa ttacaggtgt gagctaccac 660
 acctggccaa gactcagtaa attctatgtg gaatgcatga atggaaatac cttaaaggagg 720
 caaagctact actgctccct ccccgctagt ctaataattg agggagagaa cagatgaaaa 780
 tcaggtatgt catgtctgaa aggttgccaa cccagtatta aagaagttac aactcagtgt 840
 ttagactctg gggattctac actaaatctt acctaatctc agtgtcttaa cgtggtggga 900
 tcagcagctg acctgccaca gggaagaatt ctacctatg gggttcttct cattcccaga 960
 gccaatggcc aaaggccctg ccaagaattc agaaccagag gaggtcatcc catcccggct 1020
 ggatatccgt gtggggaaaa tcatcactgt ggagaagcac ccagatgcag acagcctgta 1080
 ttagagaag attgacgtgg gggaagctga accacggact gtggtgagcg gcctgtgaca 1140
 gttcgtgccc aaggaggaac tgcaggacag gctggtagtgt gtgctgtgca acctgaaacc 1200
 ccagaagatg agaggagtcg agtcccaagg catgcttctg tgtgcttcta tagaagggat 1260
 aaaccgccag gttgaacctc tggacctcc ggcaggctct gctcctgggt agcacgtgtt 1320
 tgtgaagggc tatgaaaagg gccaaaccaga tgaggagctc aagcccaaga agaaagtctt 1380
 cgagaagttg caggctgact tcaaaatttc tgaggagtgc atgcacagt ggaagcaaac 1440
 caacttcattg accaagctgg gctccatttc ctgtaaatcg ctgaaagggg ggaacattag 1500
 ctgaccagcc cagcatcttc ccccttctt ccaccactga gtcacttctt gtctcttcag 1560
 tctgtccat ccatcaccca tttaccatc tctcaggaca cggaagcagc gggtttggac 1620
 tctttattcg gtgcagaact cggcaagggg cagcttacc tccccagAAC ccaggatcat 1680
 cctgtctggc tgcagtgaga gaccaacccc taacaagggc tgggccacag caggagatcc 1740

[0012]

agccctacct	tcttcccttg	gcagctggag	aaatctgggt	tcaatataac	tcatttaaaa	1800
atttatgcca	cagtccttat	aattggaaaa	atactgggtc	ccaggttttc	ttggagttat	1860
ccaagcagct	gcgcccctag	ctgggatctg	gtacctggac	taggctaatt	acagcttctc	1920
cccaacagga	aactgtggga	tttgaaaagg	aaaggaagg	gaaaacagag	aacctagtgg	1980
tctaccaagt	ggttggcaac	tttcccaatg	tctgcttact	ctgaggcttg	gcactggggg	2040
ccagggcctg	ccccagggt	cctggaattt	cccttgatcc	agctaggctg	ggacactccc	2100
taaatcagct	gcgtgttggt	agcatcaggc	agaatgaatg	gcagagagtg	attctgtctt	2160
catagagggt	ggggtacttc	tccataaggc	atctcagtca	aatccccatc	actgtcataa	2220
attcaaataa	aatgtctgaa	caagggaaaa	aaaaaaaaaa	aa		2262

10	20	30	40	50
MGDAPSPEEK	LHLITRNLQE	VLGEEKLKEI	LKERELKIYW	GTATTGKPHV
60	70	80	90	100
AYFVPMKIA	DFLKAGCEVT	ILFADLHAYL	DNMKAPWELL	ELRVSYENV
110	120	130	140	150
IKAMLESIGV	PLEKLKFIKG	TDYQLSKEYT	LDVYRLSSVV	TQHDSKKAGA
160	170	180	190	200
EVVKQVEHPL	LSGLLYPGLQ	ALDEEYLKVD	AQFGGIDQRK	IFTFAEKYLP
210	220	230	240	250
ALGYSKRVHL	MNPMVPGLTG	SKMSSSEEEES	KIDLLDRKED	VKKKLKKAFC
260	270	280	290	300
EPGNVENNGV	LSFIKHVLF	LKSEFVILRD	EKWGGNKTYT	AYVDLEKDFA
310	320	330	340	350
AEVVHPGDLK	NSVEVALNKL	LDPIREKFNT	PALKKLASAA	YPDPSKQKPM
360	370	380	390	400
AKGPAKNSEP	EEVIPSRLDI	RVGKIITVEK	HPDADSLYVE	KIDVGAEPR
410	420	430	440	450
TVVSGLVQFV	PKEELQDRLV	VVLCNLKPQK	MRGVESQGML	LCASIEGINR
460	470	480	490	500
QVEPLDPPAG	SAPGEHVFEK	GYEKGQPDEE	LKPKKKVFEK	LQADFKISEE
510	520			
CIAQWKQTNF	MTKLGSISCK	SLKGGNIS (SEQ ID NO:1)		

图 1

10	20	30	40	50
MGDAPSPEEK	LHLITRNLQE	VLGEEKLKEI	LKERELKIYW	GTATTGKPHV
60	70	80	90	100
AYFVPMSKIA	DFLKAGCEVT	ILFADLHAYL	DNMKAPWELL	ELRVSYYENV
110	120	130	140	150
IKAMLESIGV	PLEKLKFIKG	TDYQLSKEYT	LDVYRLSSVV	TQHDSKKAGA
160	170	180	190	200
EVVKQVEHPL	LSGLLYPGLQ	ALDEEYLKVD	AQFGGIDQRK	IFTFAEKYLP
210	220	230	240	250
ALGYSKRVHL	MNPMVPGLTG	SKMSSSEES	KIDLLDRKED	VKKKLKKAFC
260	270	280	290	300
EPGNVENNGV	LSFIKHVLF	LKSEFVILRD	EKWGGNKTYT	AYVDLEKDFA
310	320	330	340	350
AEVVHPGDLK	NSVEVALNKL	LDPIREKFNT	PALKKLASAA	■PDPSKQKPM
360	370	380	390	400
AKGPAKNSEP	■EEVIPSRLDI	RVGKIITVEK	HPDADSLYVE	KIDVGEAEPR
410	420	430	440	450
TVVSGLVQFV	PKEELQDRLV	VVLCNLKPQK	MRGVESQGML	LCASIEGINR
460	470	480	490	500
QVEPLDPPAG	SAPGEHVFEK	GYEKGQPDEE	LKPKKKVFEE	LQADFKISEE
510	520			
CIAQWKQTNF	MTKLGSISCK	SLKGGNIS (SEQ ID NO:2)		

图 2

10	20	30	40	50
MGDAPSPEEK	LHLITRNLQE	VLGEEKLKEI	LKERELKIYW	GTATTGKPHV
60	70	80	90	100
AYFVPMSKIA	DFLKAGCEVT	ILFADLHAYL	DNMKAPWELL	ELRVSYEENV
110	120	130	140	150
IKAMLESIGV	PLEKLKFIKG	TDYQLSKEYT	LDVYRLSSVV	TQHDSKKAGA
160	170	180	190	200
EVVKQVEHPL	LSGLLYPGLQ	ALDEEYLKVD	AQFGGIDQRK	IFTFAEKYLP
210	220	230	240	250
ALGYSKRVHL	MNPMVPGLTG	SKMSSSEEEES	KIDLLDRKED	VKKKLKKAFC
260	270	280	290	300
EPGNVENNGV	LSFIKHVLEP	LKSEFVILRD	EKWGGNKTYT	AYVDLEKDFA
310	320	330	340	350
AEVVHPGDLK	NSVEVALNKL	LDPIREKFNT	PALKKLASAA	YPDPSKQKPM
360				
AKGPAKNSEP	EEVI	(SEQ ID NO:3)		

图 3

```

1      atgggggacg ctcccagccc tgaagagaaa ctgcacctta tccccggaa cctgcaggag
61     gttctggggg aagagaagct gaaggagata ctgaaggagc gggaaacttaa aatttactgg
121    ggaacggcaa ccacgggcaa accacatgtg gcttactttg tgcccatgtc aaagattgca
181    gacttcttaa aggcagggtg tgaggtaaaca attctgtttg cggacctcca cgcatacctg
241    gataacatga aagcccatg ggaacttcta gaactccgag tcagttacta tgagaatgtg
301    atcaaaagcaa tgctggagag cattggtgtg cccttgga gaactcaagt catcaaaagg
361    actgattacc agctcagcaa agagtacaca ctagatgtgt acagactctc ctccgtggtc
421    acacagcacg attccaagaa ggctggagct gaggtggtaa agcagggtga gacccctttg
481    ctgagtggcc tcttatacc cggactgcag gctttggatg aagagtattt aaaagtagat
541    gcccaatttg gaggcattga tcagagaaag attttcacct ttgcagagaa gtacctccct
601    gcacttggct attcaaaacg ggtccatctg atgaatccta tggttccagg ataacaggc
661    agcaaaatga gctcttcaga agaggagtcc aagattgata tccttgatcg gaaggaggat
721    gtgaagaaaa aactgaagaa ggccttctgt gagccaggaa atgtggagaa caatgggggtt
781    ctgtccttca tcaagcatgt cctttttccc gcttaagtcg agtttgtgat cctacgagat
841    gagaaatggg gtggaaacaa aacctacaca gcttacgtgg acctggaaaa ggactttgct
901    gctgaggttg tacatcctgg agacctgaag aattctgttg aagtcgact gaacaagtgtg
961    ctggatccaa tccgggaaaa gttttaatacc cctgccctga aaaaactggc cagcgctgcc
1021   taccagatc cctcaaaagca gaagccaatg gccaaaggcc ctgccaagaa ttcagaacca
1081   gaggaggtca tcccatcccg gctggatatc cgtgtgggga aaatcatcac tgtggagaag
1141   caccagatg cagacagcct gtatgtagag aagattgacg tgggggaagc tgaaccacgg
1201   actgtggtga gcggcctggt acagtctgtg cccaaggagg aactgcagga caggctggtg
1261   gtggtgctgt gcaacctgaa accccagaag atgagaggag caggtgaac ctctggacc
1321   ctgtgtgctt ctatagaagg gataaacccg caggtgaac ggctatgaaa agggccaaac
1381   tctgctcctg gtgagcacgt gtttgtgaag ttgcaggctg acttcaaaat tctgaggag
1441   ctcaagccca agaagaaagt cttcgagaag ttgcaggctg atgaccaagc tgggctccat
1501   tgcatacgac agtggaagca aaccaactc atgaccaagc tgggctccat ttcctgtaaa
1561   tcgctgaaag gggggaacat tagctagcca gccagcatc ttccccctt cttccaccac
1621   tgagtcattc gctgtctctt cagtctgtc catccatcac ccatttacc atctctcagg
1681   aca (SEQ ID NO:4)

```

图 4

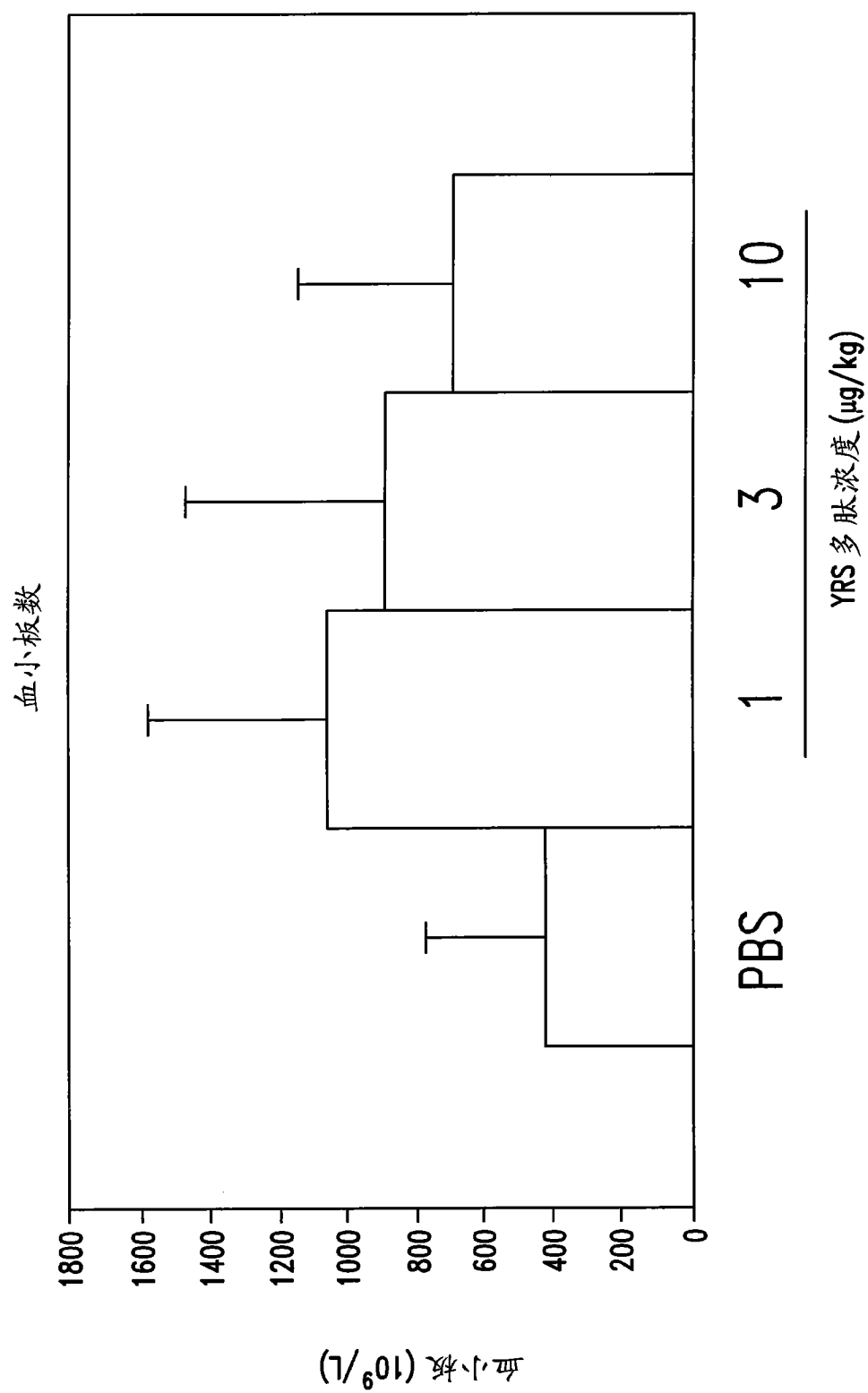


图 5A

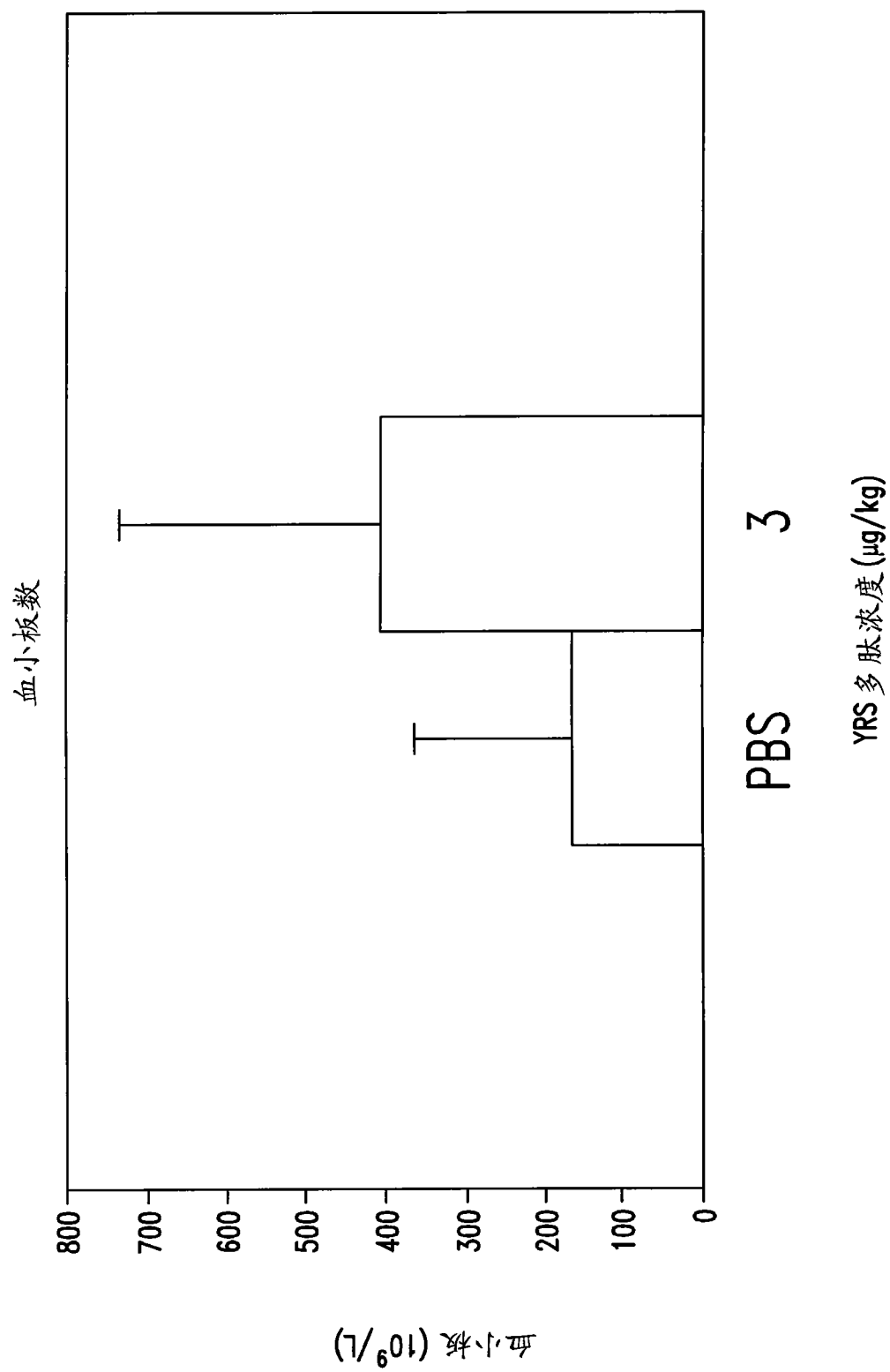


图 5B

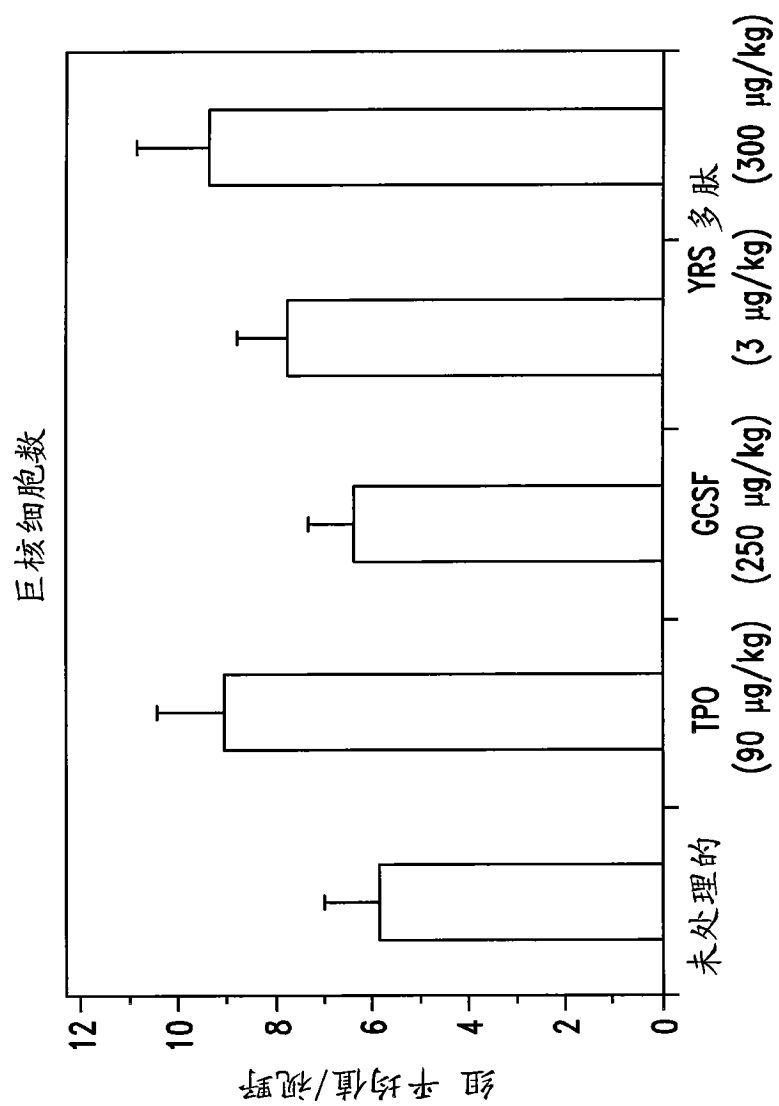


图 6

SP1

10	20	30	40	50
XXXXXXXXXXK	IFTFAEKYLP	ALGYSKRVHL	MNPMVPGLTG	SKMSSSEEEES
60	70	80	90	100
KIDLLDRKED	VKKKLKKAFC	EPGNVENNGV	LSFIKHVLF	LKSEFVILRD
110	120	130	140	150
EKWGGNKTYT	AYVDLEK DFA	AEVVHPGDLK	NSVEVALNKL	LDPIREKFNT
160	170	180	190	200
PALKKLASAA	YPDPSKQKPM	AKGPAKNSEP	EEVIPSRLDI	RVGKIITVEK
210	220	230	240	250
HPDADSLYVE	KIDVGAEPR	TVVSGLVQFV	PKEELQDRLV	VVLCNLKPQK
260	270	280	290	300
MRGVESQGML	LCASIEGINR	QVEPLDPPAG	SAPGEHV FVK	GYEKGQPDEE
310	320	330	340	
LKPKKKVF EK	LQADFKISEE	CIAQWKQTNF	MTKLGSISCK	SLKGGNIS

(SEQ ID NO:6)

图 7

编码SP1的cDNA

```
1 ttcagaaagt ggtggagggg agacttcctt tttccagag acagaagggt atgcacccag
61 tggcctggga ccattgttct gggctttttt tcccttcgac atggatttgc ttctcactgt
121 gtaccccaac caccaaaacc accctgagat caatgctggt gtccttgcac cagatggcctt
181 agagatcctt ccacctctta acacaagcat ctagggtccac tttactcaa tctggcctca
241 gttgagagca gagtatacca tcagagccca ttctcctgtc tgctgtctgg gacgtggaaa
301 gaaagttagc tctagggggg ctttccaggg gcctctgtaa ggactggatg ctcctttccg
361 gaatccaaga gttcaccagg ctgcttctct aatggacgat gatcctcttc ctcctgacgt
421 ctctccctgg cagcaccagg atgcagacag cctgtatgta gagaagattg acgtggggga
481 agctgaacca cggactgtgg tgagcggcct ggtacagttc gtgccaagg aggaactgca
541 ggacaggctg gtagtggtgc tgtgcaacct gaaaccccag aagatgagag gactcgagtc
601 ccaaggcatg cttctgtgtg cttctatgtg agtgaggact tggagtgggg cacaggacct
661 ggggaggcca ggaagagtag ggaatcagcc catatgatgt ccttcacac accaggtgga
721 agctctgaga acacgtgcct cttccttgct gatgccaaa gttgatgcat gaaggactta
781 tcgtacaagt actgttaatg aagcatttta cctacagtta attttgtaa aatagaaatg
841 gagggtcaa accagtacat acccaagtct tactactagt aaggagtgga gcagggattc
901 aaatcccagt tttgatgtct ataaagtcc cgtacgtta ttttatactt cctcccctag
961 aaacacagat tttggtatct tgacacacaa ttttggtata gcctgggtta atgtaaccct
1021 ggtgatatgc agggatgtag caagataaga ggacctcctg gggctctggt actgaggatg
1081 ccctaaatcc catcagggcc cctgtgtaaa ggcccggatt gctttggcct ccacagtcac
1141 tggaacccat ccatagcctc actcttctct tgcctgtgt cttcccagag aagggataaa
1201 ccgccagggt gaacctctgg accctccggc aggctctgct cctggtgagc acgtgtttgt
1261 gaagggtcat gaaaagggcc aaccagatga ggagctcaag cccaagagga aagtcttcga
1321 gaagttgcag gctgacttca aaatttctga ggagtgcac gcacagtgga agcaaaccaa
1381 cttcatgacc aagctgggct ccatttctct taaatcgctg aaagggggga acattagcta
1441 gccagccag catcttcccc ctttcttcca cactgagtc atctgctgtc tcttcagtct
1501 gctccacca tcacccattt acccatctct caggacacgg aagcagcggg tttggactct
1561 ttattcgggt cagaactcgg caagggggcag cttaccctcc ccagaacca ggatcatcct
1621 gtctggctgc agtgagagac caaccctaa caagggtctg gccacagcag ggagtccagc
1681 cctaccttct tcccttgga gctggagaaa tctggtttca atataactca tttaaaaatt
1741 tatgccacag tccttataat tggaaaaata ctggtgccca ggttttcttg gagttatcca
1801 agcagctgcg ccctagctg ggatctggt cctggactag gctaattaca gcttctcccc
1861 aacaggaaac tgtgggattt gaaaaggaaa gggaaggga aacagagaac ctagtggctt
1921 accaagtggg tggcaacttt cccaatgtct gcttactctg aggcttgga ctgggggcca
1981 gggcctgccc cagggtcctt ggaatttccc ttgatccagc taggctggga cactccctaa
2041 atcagctgcg tgttggttag atcaggcaga atgaatggca gagagtgatt ctgtcttcat
2101 agagggtggg gtacttctcc ataaggcatc tcagtcaaat cccatcact gtcataaatt
2161 caaataaaat gtctgaac (SEQ ID NO:7)
```

图 8

SP2

10	20	30	40	50
MGDAPSPEEK	LHLITRNLQE	VLGEEKLKEI	LKERELKIYW	GTATTGKPHV
60	70	80	90	100
AYFVPMSKIA	DFLKAGCEVT	ILFADLHAYL	DNMKAPWELL	ELRVSYYENV
110	120	130	140	150
IKAMLESIGV	PLEKLKFIKG	TDYQLSKEYT	LDVYRLSSVV	TQHDSKKAGA
160	170	180	190	200
EVVKQVEHPL	LSGLLYPGLQ	ALDEEYLKVD	AQFGGIDQRK	IFTFAEKYLP
210	220	230	240	250
ALGYSKRVHL	MNPMVPGLTG	SKMSSEEES	KIDLLDRKED	VKKKLKKAFC
260	270	280	290	300
EPGNVENNGV	LSFIKHVLP	LKSEFVILRD	EKWGGNKTYT	AYVDLEKDEA
310	320	330	340	350
AEVVHPGDLK	NSVEVALNKL	LDPIREKFNT	PALKKLASAA	YPDPSKQKPM
360	370	380		
AKGXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXX	XXXXXXXX (SEQ ID NO:8)	

图 9

编码 SP2 的 cDNA

```

1  atgggggacg ctcccagccc tgaagagaaa ctgcacctta tcacccggaa cctgcaggag
61  gttctggggg aagagaagct gaaggagata ctgaaggagc gggaacttaa aatttactgg
121  ggaacggcaa ccacgggcaa accacatgtg gcttactttg tgcccatgtc aaagattgca
181  gacttcttaa aggcagggtg tgaggtaaac attctgtttg cggacctcca cgcatacctg
241  gataacatga aagcccatg ggaacttcta gaactccgag tcagttacta tgagaatgtg
301  atcaaaagcaa tgctggagag cattggtgtg cccttggaga agctcaagtt catcaaaggc
361  actgattacc agctcagcaa agagtacaca ctagatgtgt acagactctc ctccgtggtc
421  acacagcacg attccaagaa ggctggagct gagtggttaa agcaggtgga gcaccctttg
481  ctgagtggcc tcttataccc cggactgcag gctttggatg aagagtattt aaaagtagat
541  gcccaatttg gaggcattga tcagagaaaag attttcacct ttgcagagaa gtaccctccct
601  gcaacttggct attcaaaacg ggtccatctg atgaatccta tggttccagg attaacaggc
661  agcaaaatga gctctcaga agaggagtcc aagattgatc tccttgatcg gaaggaggat
721  gtgaagaaaa aactgaagaa ggccttctgt gagccaggaa atgtggagaa caatgggggtt
781  ctgtcccttca tcaagcatgt cctttttccc cttaagtccg agtttgtgat cctacgagat
841  gagaaatggg gtggaaaaca aacctacaca gcttacgtgg acctggaaaa aagtcgcact gaacaagtgt
901  gctgaggttg tacatccctg agacctgaag aattctgttg aaaaactggc cagcgctgcc
961  ctggatccaa tccgggaaaa gtttaatacc cctgccctga tgccaagaat tcagaaccag
1021  taccagatc cctcaaaagc gaagccaatg gccaaaggcc tgccaagaat tcagaaccag
1081  aggaggtcat ccatcccgg ctggatatcc gtgtggggaa aatcatcact gtggagaagc
1141  acccagatgc agacagcctg tatgtag (SEQ ID NO:9)

```

图 10

SP3

10	20	30	40	50
MNPMVPGLTG	SKMSSSEEEES	KIDLLDRKED	VKKKLKKAFC	EPGNVENNGV
60	70	80	90	100
LSFIKHVLF	LKSEFVILRD	EKWGGNKTYT	AYVDLEKDFA	AEVVHPPGDLK
110	120	130	140	150
NSVEVALNKL	LDPIREKFNT	PALKKLASAA	YPDPSKQKPM	AKGPAKNSEP
160	170	180	190	200
EEVIPSRLDI	RVGKIITVEK	HPDADSLYVE	KIDVGAEPR	TVVSGLVQFV
210	220	230	240	250
PKEELQDRLV	VVLCNLKPQK	MRGVESQGML	LCASIEGINR	QVEPLDPPAG
260	270	280	290	300
SAPGEHVFK	GYEKGQPDEE	LKPKKKVFKE	LQADFKISEE	CIAQWKQTNF
310				
MTKLGSISCK	SLKGGNIS	(SEQ ID NO:10)		

图 11

编码 SP3 的 cDNA

```

1  gaaagatttt caccttttgc gagaagtacc tccctgcact tggctattca aaacgggtcc
61  atctgatgaa tcctatggtt ccaggattaa caggcagcaa aatgagctct tcagaagagg
121 agtccaagat tgatctcctt gatcggaagg aggatgtgaa gaaaaaactg aagaaggcct
181 tctgtgagcc aggaatatgt gagaacaatg ggtttctgtc cttcatcaag catgtccttt
241 tcccccttaa gtccgagttt gtgacctac gagatgagaa atggggtgga acaaaaacct
301 acacagctta cgtggacctg gaaaaggact ttgctgtgga gttgtacat cctggagacc
361 tgaagaattc tgttgaaagtc gcaactgaaca agttgctgga tccaatccgg gaaaagttta
421 ataccctgc cctgaaaaaa ctggccagcg ctgcctaccc agatccctca aagcagaagc
481 caatggccaa aggcctgcc aagaattcag aaccagagga ggtcatccca tcccggctgg
541 atatccgtgt ggggaaaatc atcactgtgg agaagcacc agatgcagac agcctgtatg
601 tagagaagat tgacgtgggg gaagctgaac caggactgtt ggtgagcggc ctggtacagt
661 tcgtgcccaa ggaggaactg caggacagcg tggtagtggt gctgtgcaac ctgaaacccc
721 agaagatgag aggagtcgag tcccaaggca tgcttctgtg tgcttctata gaaggataa
781 accgccaggt tgaacctctg gacctccgg caggctctgc tccgtgtgag cacgtgtttg
841 tgaagggcta tgaaaagggc caaccagatg aggagtcaa gcccaagaag aaagtcttcg
901 agaagttgca ggctgacttc aaaatttctg aggagtgcac cgcacagtgg aagcaaacca
961 acttcatgac caagctgggc tccatttctt gtaaatacgt gaaagggggg aacattagct
1021 agccagccca gcattcttcc cccttcttcc accactgagt catctgctgt ctcttcagtc
1081 tgctccatcc atcacccatt taccatctc tcaggacacg gaagcagcgg gtttggactc
1141 ttatttcggt gcagaactcg gcaaggggca gcttaccctc ccagaacccc aggatcatcc
1201 tgtctggctg cagtgaagaa ccaaccccta acaagggctg ggcacagca gggagtccag
1261 ccctaccttc ttcccttggc agctggagaa atctggtttc aatataactc atttaaaaat
1321 ttatgccaca gtccctataa ttggaaaaat actggtgccc aggttttctt ggagttatcc
1381 aagcagctgc gccctagctt gggatctggt acctggacta ggctaattac agcttctccc
1441 caacaggaaa ctgtgggatt tgaaaaggaa agggaaaggga aaacagagaa cctagtggtc
1501 taccagtggt ttggcaactt tcccaatgtc tgcttactct gaggcttggc actggggggc
1561 agggcctgcc ccagggctcc tggaaatttc cttgatccag ctaggctggg acactcccta
1621 aatcagctgc gtgttgtag catcaggcag aatgaatggc agagagtgat tctgtcttca
1681 tagagggtgg ggtacttctc cataaaggcat ctcaagtcaaa tccccatcac tgtcat

```

(SEQ ID NO:11)

图 12

SP4

1 11 21 31 41 51
M AKGPAKNSEP EEVIPSRLDI RVGKIITVEK HPDADSLYVE KIDVGAEPR

 61 71 81 91 101
TVVSGLVQFV PKEELQDRLV VVLCNLKPQK MRGVESQGML LCASIEGINR

 111 121 131 141 151
QVEPLDPPAG SAPGEHVFVK GYEKGQPDEE LKPKKKVFEE LQADFKISEE

 161 171
CIAQWKQTNE MTKLGSISCK SLKGGNIS (SEQ ID NO:12)

图 13

编码 SP4 的 cDNA

```

1  atgggggacg ctccagccc tgaagagaaa ctgcacctta tcacccgaa cctgcaggag
61  gtctgtgggg aagagaagct gaagagagata ctgaaggagc gggaaacttaa aattactgg
121 ggaacggcaa ccacgggcaa accacatgtg gcttactttg tgcccatgtc aaagattgca
181 gacttcttaa aggcagggtg tgaggtaaca attctgtttg cggacctcca cgcatacctg
241 gataacatga aagccccatg ggaacttcta gaactccgag tcagttacta tgagaaatgtg
301 atcaaaagcaa tgctggagag cattggtgtg cccttggaga agctcaagtt catcaaaggc
361 actgattacc agctcagcaa agagtacaca ctagatgtgt acagactctc ctccgtggtc
421 acacagcacg attccaagaa ggctggagct gaggtggtaa agcagggtga gcaccctttg
481 ctgagtggcc tcttataccc cggactgcag gctttggatg aagagtattt aaaagtagat
541 gcccaatttg gaggcattga tcagagaaaag atttcacct ttgcagagaa gtacctccct
601 gcacttggct attcaaaaacg ggtccatctg atgaatccta tggttccagg attaacaggc
661 agcaaaatga gctcttcaga agaggagtcc aagattgata tccttgatcg gaaggaggat
721 gtgaagaaaa aactgaagaa ggccttctgt gagccaggaa atgtggagaa caatggggtt
781 ctgtccttca tcaagcatgt cctttttccc cttaagtccg agtttgtgat cctacgagat
841 gagaaatggg gtggaacaaa aacctacaca gcttacgtgg acctggaaaa ggactttgct
901 gctgagggtg tacatcctgg agacctgaag aattctgttg aagtcgcact gaacaagtgtg
961 ctggatccaa tccgggaaaa gtttaatacc cctgcccctga aaaaactggc cagcgctgcc
1021 taccagatc cctcaaaagca gaagccaatg gccaaaggcc tgccaagaat tcagaaccag
1081 aggaggtcat cccatcccgg ctggatatcc gtgtggggaa aatcatcact gtggagaagc
1141 acccagatgc agacagcctg tatgtag (SEQ ID NO:13)

```

图 14

SP5

10	20	30	40	50
XXXXXXXXXPM	AKGPAKNSEP	EEVIPSRLDI	RVGKIITVEK	HPDADSLYVE
60	70	80	90	100
KIDVGAEPR	TVVSGLVQFV	PKEELQDRLV	VVLCNLKPQK	MRGVESQGML
110	120	130	140	150
LCASIEGINR	QVEPLDPPAG	SAPGEHVFEK	GYEKGQPDEE	LKPKKKVFEK
160	170	180		
LQADFKISEE	CIAQWKQTNF	MTKLGSISCK	SLKGGNIS	(SEQ ID NO:14)

图 15

编码SP5的 cDNA

```

1 gccagacaca gtggctcaca cctgtaatct taacactttg gaaggctgag gcaggcggat
61 cacttgagcc caaaagttag agaccaaacc ccagtctcta cccaaaaaaa aaaaaaaaaa
121 aaaaattagc caggcatagt agcacatgcc tgtagtccca gctacttggg aggctgaggt
181 gagaggatca cctgagcatg gggaagttag gactgcagtg agccatgata gcaccactgc
241 actccagcct gggcaacaga gtgagactct atgtctcaaa aaaagaaaaa tgatagaaat
301 tagattagac ctattatacc caaccggtat atagggtatc gatagtttct tacacagctg
361 ttgggcagag cctgcagagc ttagagaagc ttatctttag attctcccag tttccttcta
421 tgtgcatggg cctggctctt agttggccat ccacttgtgc gtaatgctaa gatattggca
481 ttgatagctt tgtgcgaccc ttccagaaaa aaactcagta actcagtaaa attttttttt
541 ttttttctaa aagagacaga gtctggctct gttgccagc ctggtcttga agtcctgggc
601 ttaagcaatc ctccgctctc agcctcccaa agtgctagaa ttacaggtgt gagctaccac
661 acctggccaa gactcagtaa attctatgtg gaatgcatga atggaaatac cttaaaggag
721 caaagctact actgctccct ccccgctagt ctaataattg agggagagaa cagatgaaaa
781 tcaggatagt catgtctgaa aggttgccaa ccagattata aagaagttac aactcagtgt
841 ttagactctg gggattctac actaaatctt acctaattct agtgtcttaa cgtggtggga
901 tcagcagctg acctgccaca gggaagaatt ctacctcatg ggttcttctt cattcccaga
961 gccaatggcc aaaggccctg ccaagaattc agaaccagag gaggtcatcc catcccggtc
1021 ggatatccgt gtggggaaaa tcatcactgt ggagaagcac ccagatgcag acagcctgta
1081 tgtagagaag attgacgtgg gggaagttag accacggact gtggtgagcg gcctggtaca
1141 gttcgtgccc aaggaggaac tgcaggacag gctggtagtg gtgctgtgca acctgaaacc
1201 ccagaagatg agaggagtgc agtcccaagg catgcttctg tgtgcttcta tagaagggat
1261 aaaccgccag gttgaacctc tggacctcc ggagggtctt gtcctggtg agcagtggtt
1321 tgtgaagggc tatgaaaagg gcccaaccaga tgaggagctc aagcccaaga agaaagtctt
1381 cgagaagtgt caggctgact tcaaaatttc tgaggagtgc atcgcacagt ggaagcaaac
1441 caacttcatg accaagctgg gctccatttc ctgtaaatac ctgaaagggg ggaacattag
1501 ctagccagcc cagcatcttc ccccttctt ccaccactga gtcactgtct gtctcttcag
1561 tctgctccat ccatcaccac tttaccatc tctcaggaca cgaagcagc gggtttgga
1621 tctttattcg gtgcagaact cggcaagggg cagcttacc tcccagaac ccaggatcat
1681 cctgtctggc tgcagtgaga gaccaacccc taacaagggc tgggccacag cagggagtcc
1741 agccctacct tcttcccttg gcagctggag aaatctggtt tcaatataac tcatttaaaa
1801 atttatgcca cagtccttat aattggaaaa atactggtgc ccaggttttc ttggagttat
1861 ccaagcagct gcgcccctag ctgggatctg gtacctggac taggctaatt acagcttctc
1921 cccaacagga aactgtggga tttgaaaagg aaagggaagg gaaaacagag aacctagtgg
1981 tctaccaagt ggttggaac tttcccaatg totgcttact ctgaggcttg gcaactgggg
2041 ccagggcctg cccagggtct cctggaattt cccttgatcc agctaggctg ggacactccc
2101 taaatcagct gcgtgttgtt agcatcaggc agaatgaatg gcagagagtg attctgtctt
2161 catagagggt ggggtacttc tccataaggc atctcagtca aatccccatc actgtcataa
2221 attcaaataa aatgtctgaa caagggaaaa aaaaaaaaaa aa (SEQ ID NO:15)

```

图 16

酪氨酰-tRNA 合成酶的基因剪接

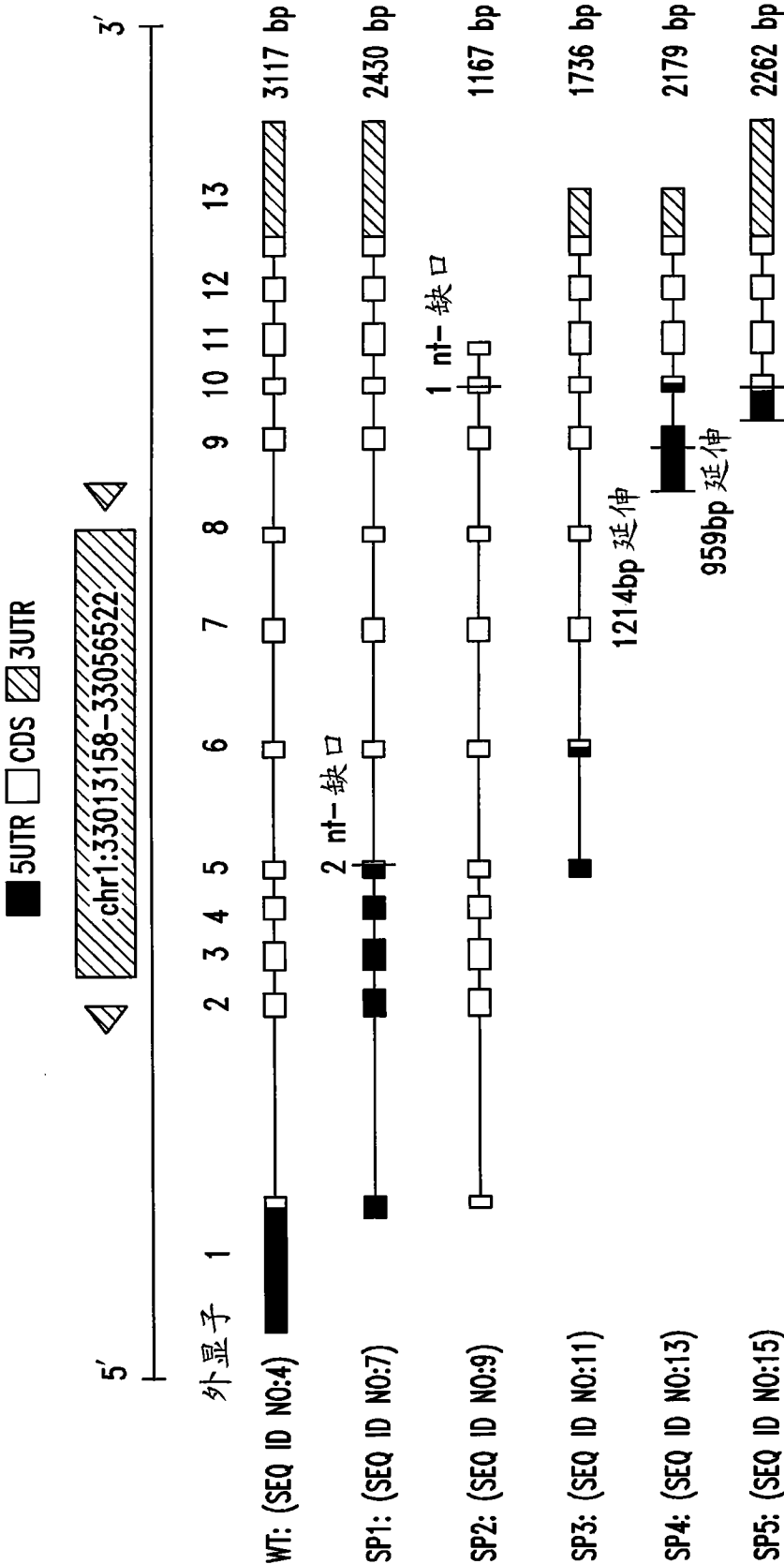


图 17

变体	NCBI	注释	与参照的mRNA差异	NCBI ORF 预测
SP1 (SEQ ID NO: 7)	<u>AK026635</u>	人cDNA: FLJ22882 fis, 克隆KAT03597, 与HSU88436人酪氨酰-tRNA合成酶Mma高度相似, 印戒细胞癌	跳读部分外显子1, 外显子5中2nt-缺口	348aa
SP2 (SEQ ID NO: 9)	<u>HSU40714</u>	人酪氨酰-tRNA合成酶, 完整的cds	跳读外显子12&13和部分外显子1&11, 外显子10中1nt-缺口	388aa (报道的)
SP3 (SEQ ID NO: 11)	<u>CR626320</u>	胎盘Cot 25-常模化的全长cDNA克隆CS0DI068YE17	跳读外显子1-4, 无缺口	318aa
SP4 (SEQ ID NO: 13)	<u>AK127182</u>	人cDNA FLJ45247 fis, 克隆BRCCOC2016661, 与酪氨酰-tRNA合成酶高度相似, 肝腺体 (脑)	跳读外显子1-8, 外显子9前的1214bp的内含子8-9延伸, 无缺口	179aa
SP5 (SEQ ID NO: 15)	<u>BC35242</u>	人酪氨酰-tRNA合成酶, 睾丸mRNA (cDNA克隆IMAGE:4837840), 具有明显保留的内含子	跳读外显子1-9, 外显子10前的959bp的内含子9-10延伸, 无缺口	188aa

图 18

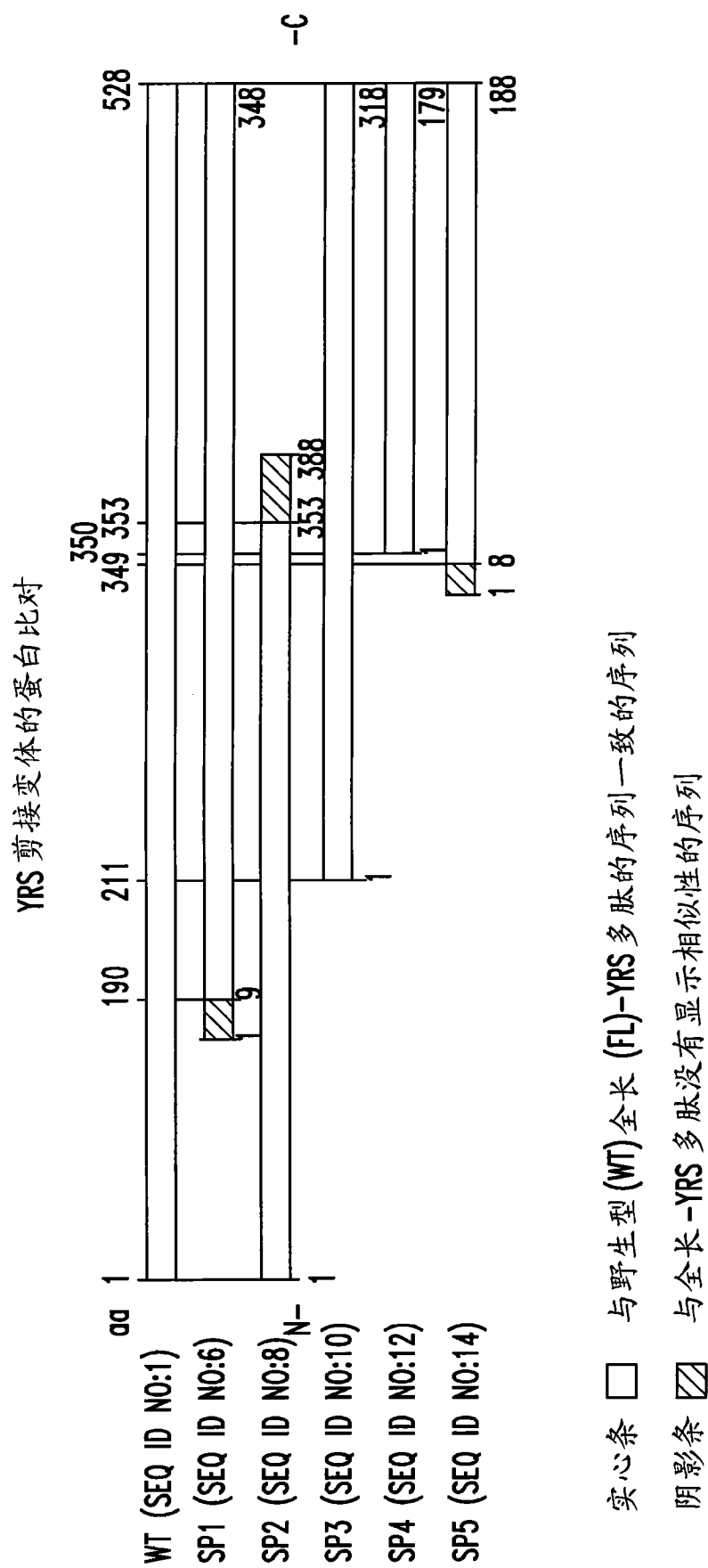


图 19

84

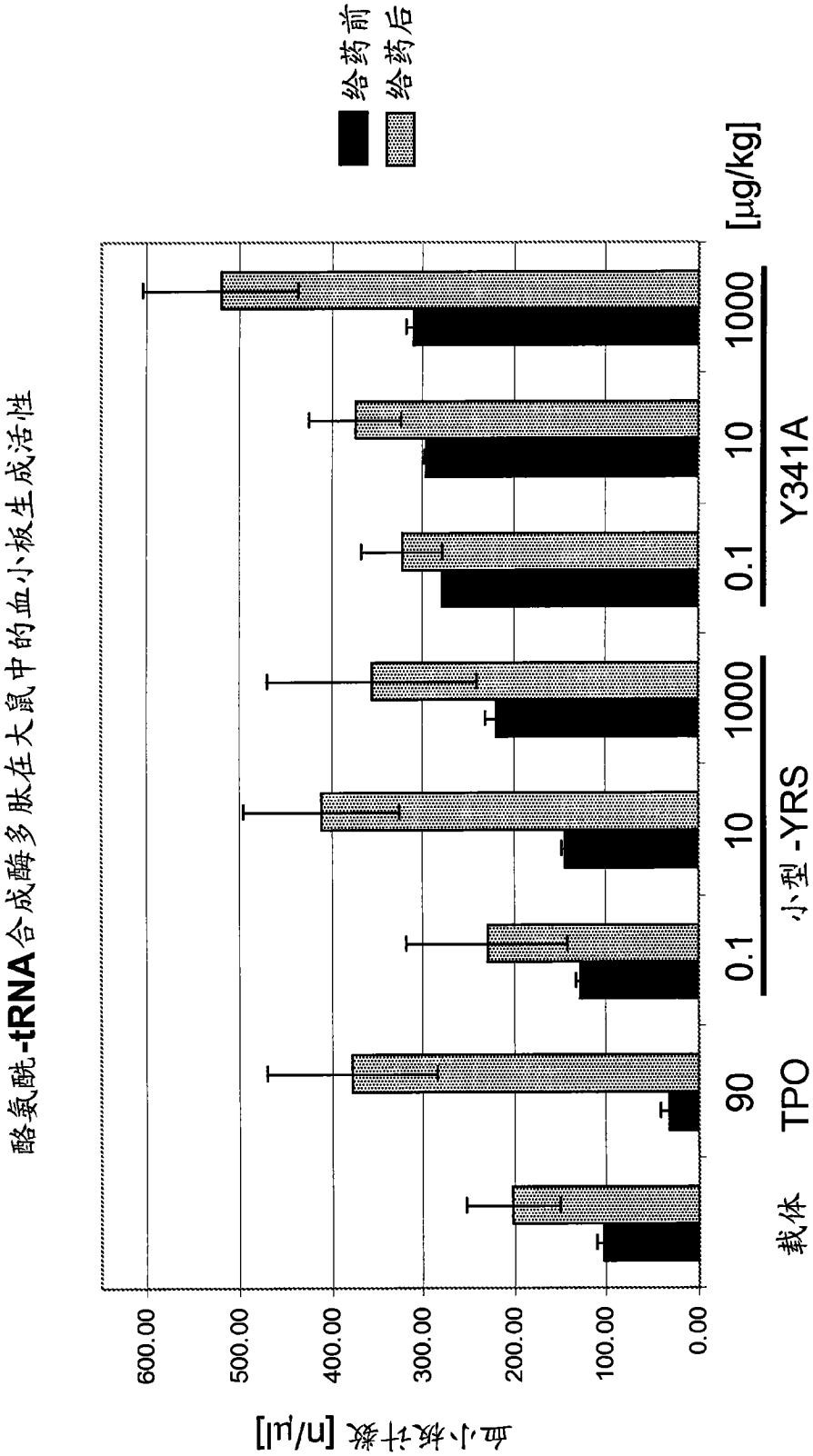


图 20

酪氨酰-tRNA合成酶多肽是MO7e原巨核细胞的化学引诱物

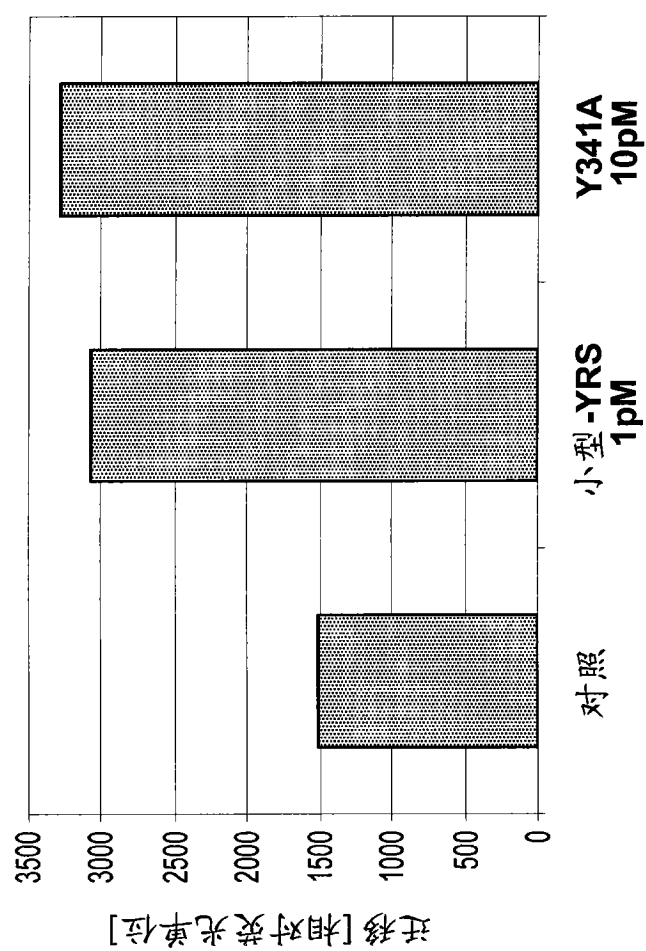


图 21

酪氨酰-tRNA合成酶多肽促进细胞到内皮单层的粘附

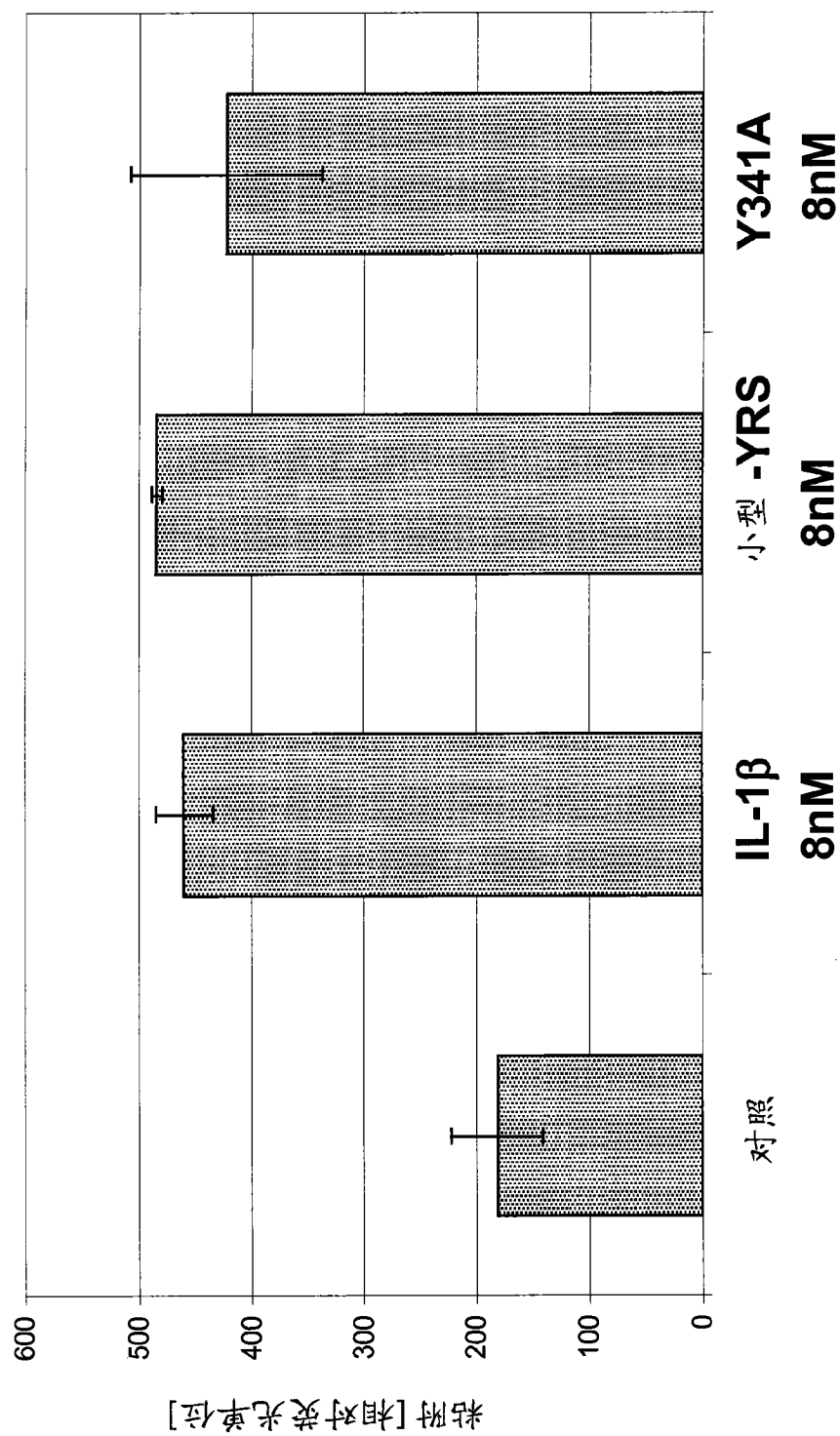
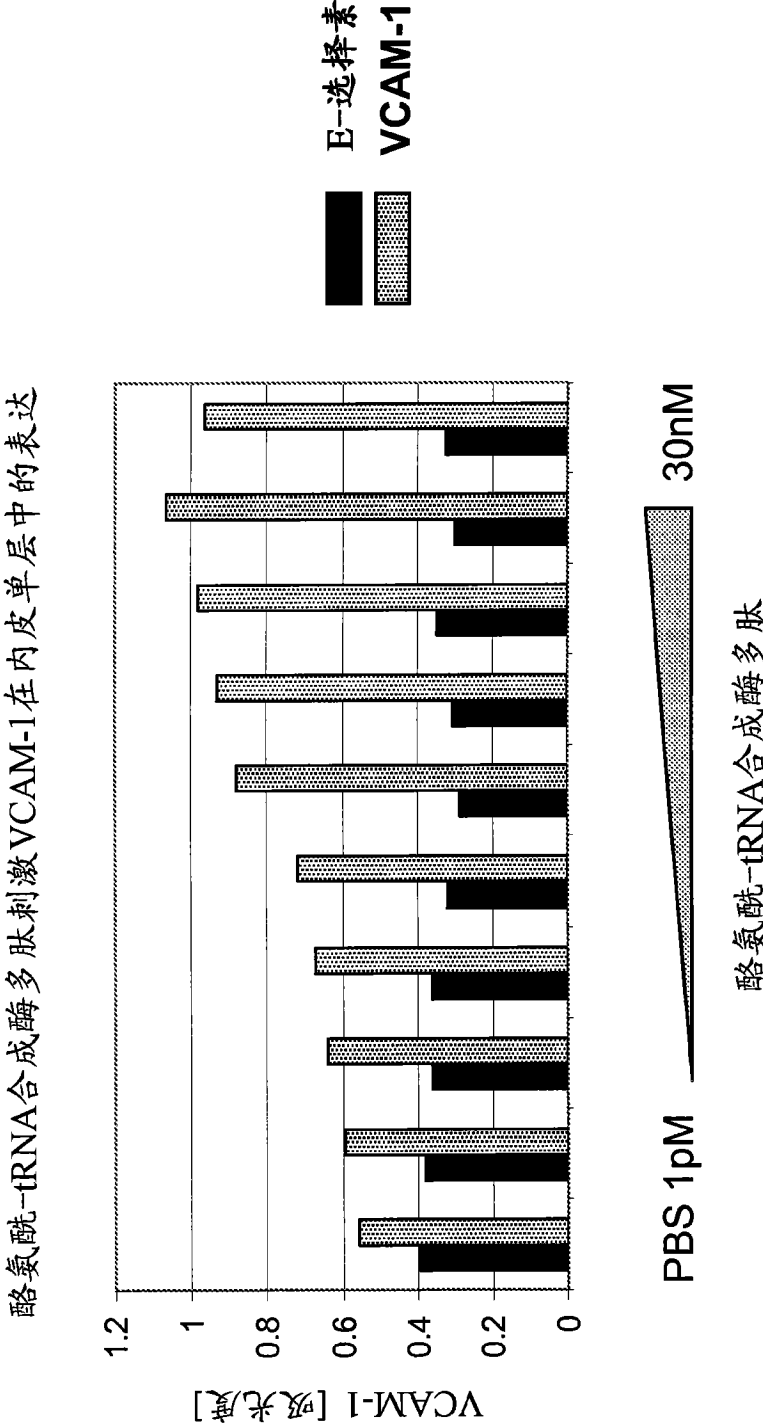


图 22



酪氨酰-tRNA合成酶多肽刺激感染了CXCR-2受体的293和CHO细胞系的迁移

293/CXCR-2

CHO/CXCR-2

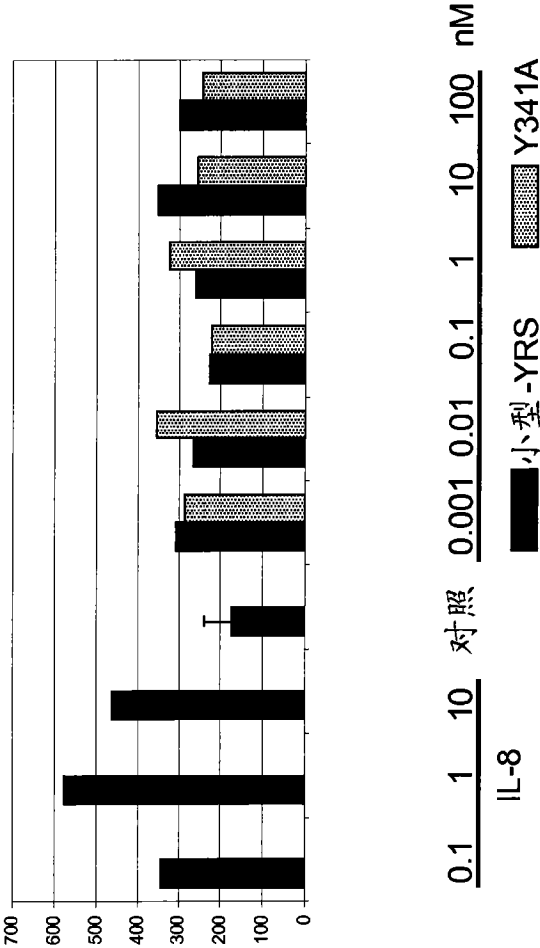
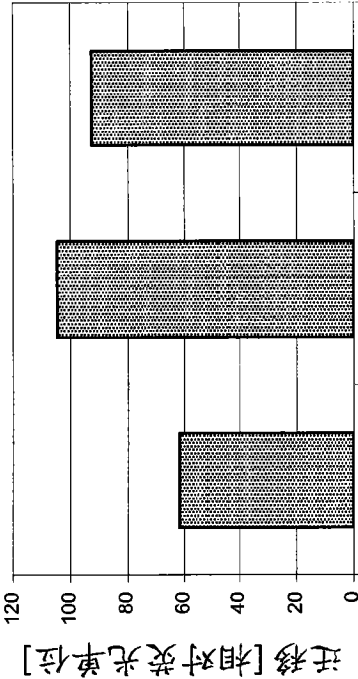


图 24

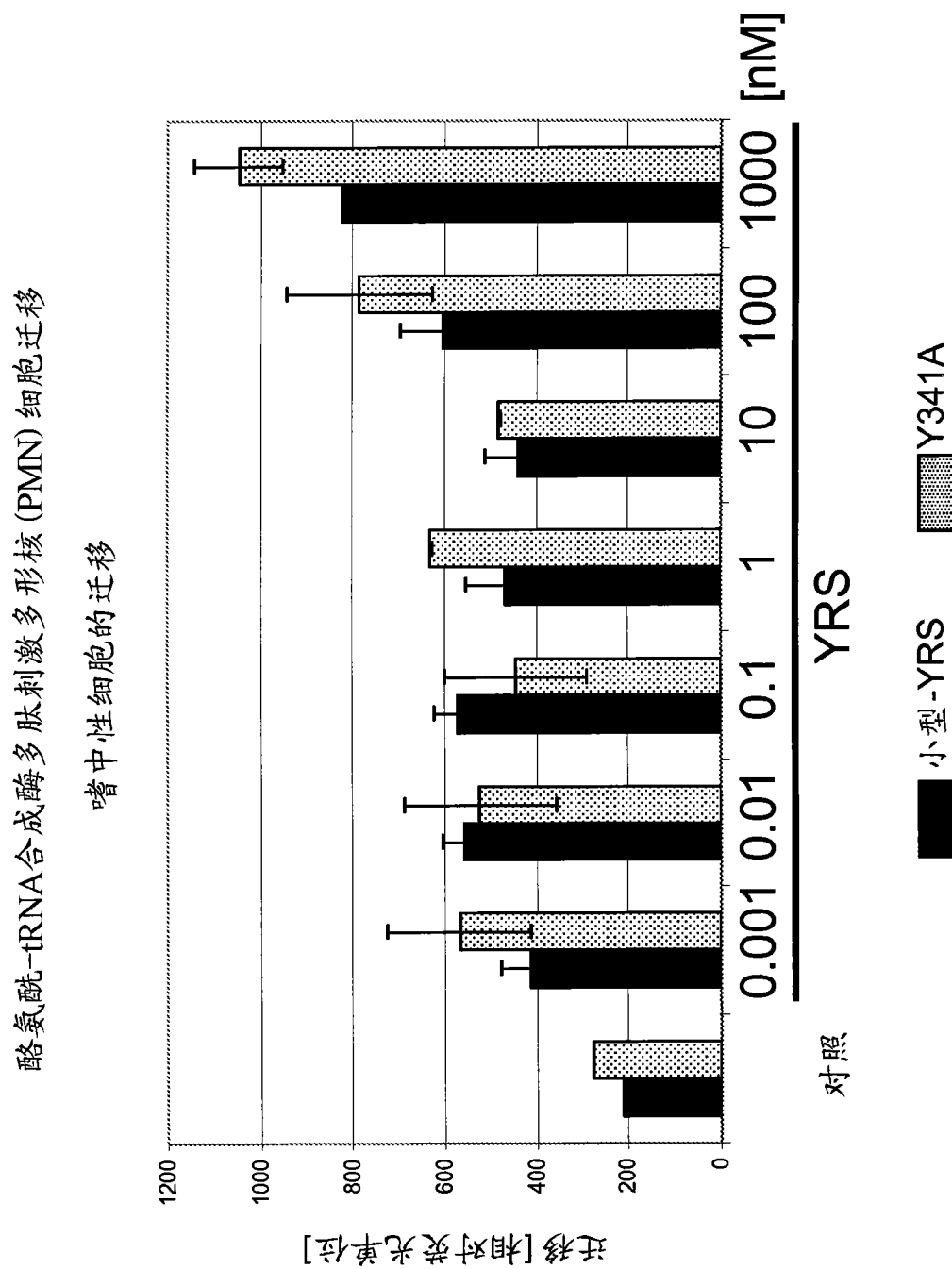


图 25

酪氨酰-tRNA合成酶多肽影响巨核细胞祖细胞

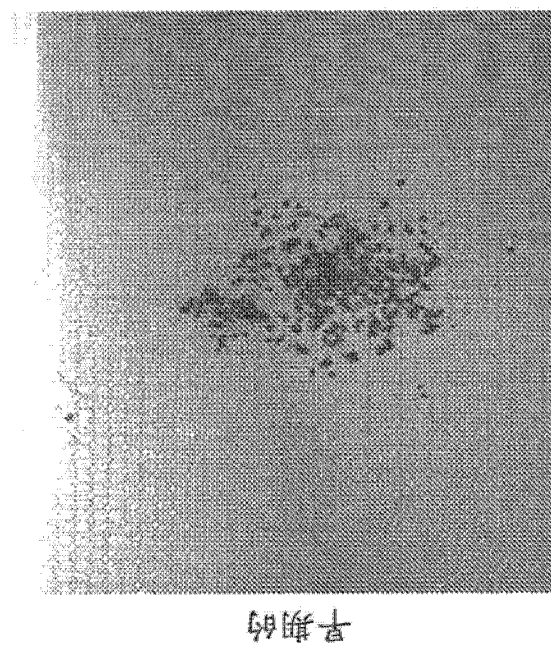
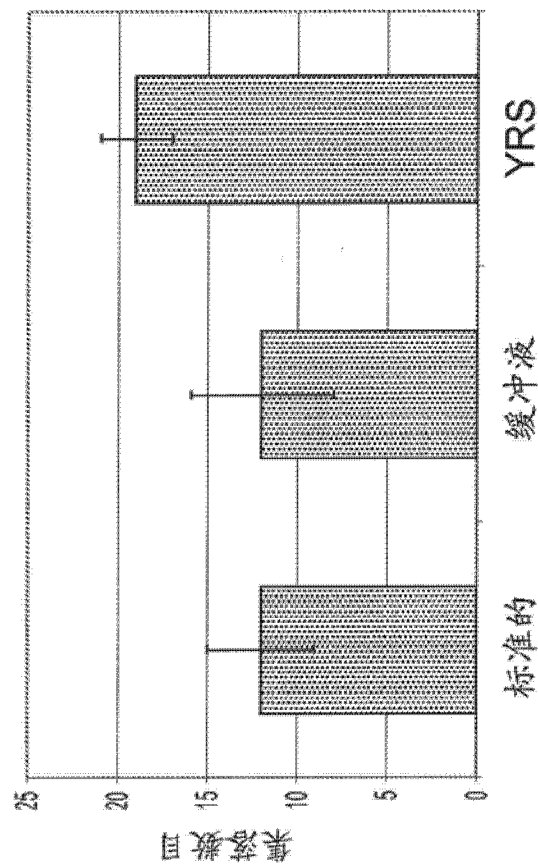


图 26A

酪氨酰-tRNA合成酶多肽影响巨核细胞祖细胞

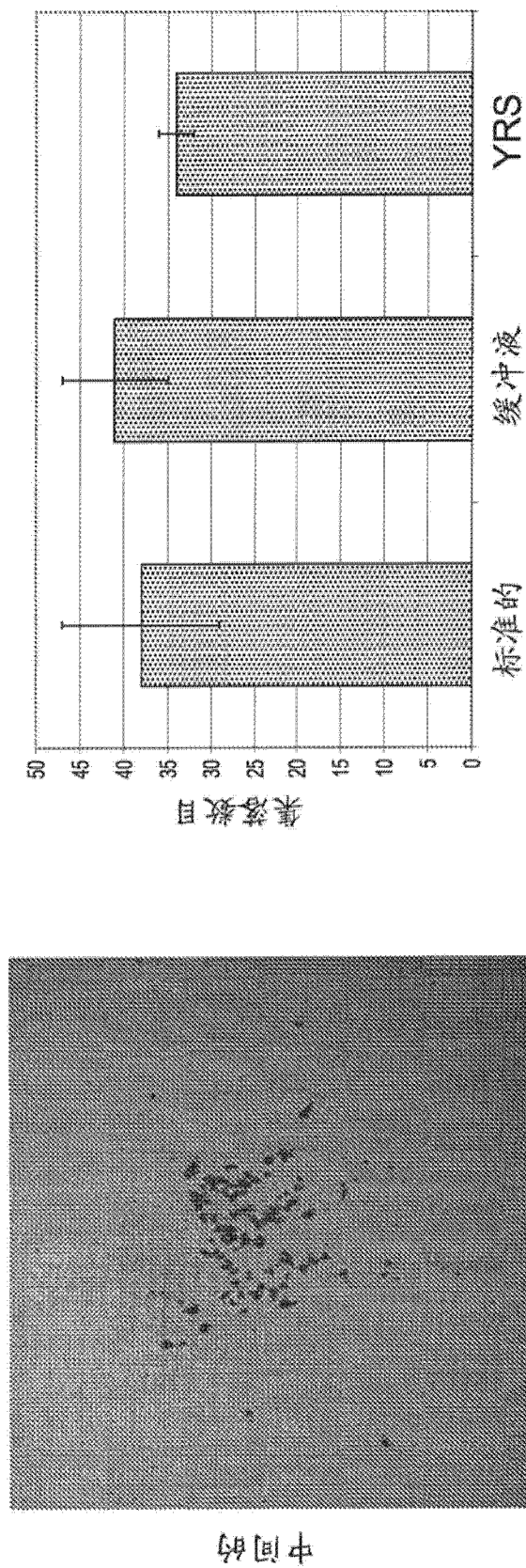


图 26B

酪氨酰-tRNA合成酶多肽影响巨核细胞祖细胞

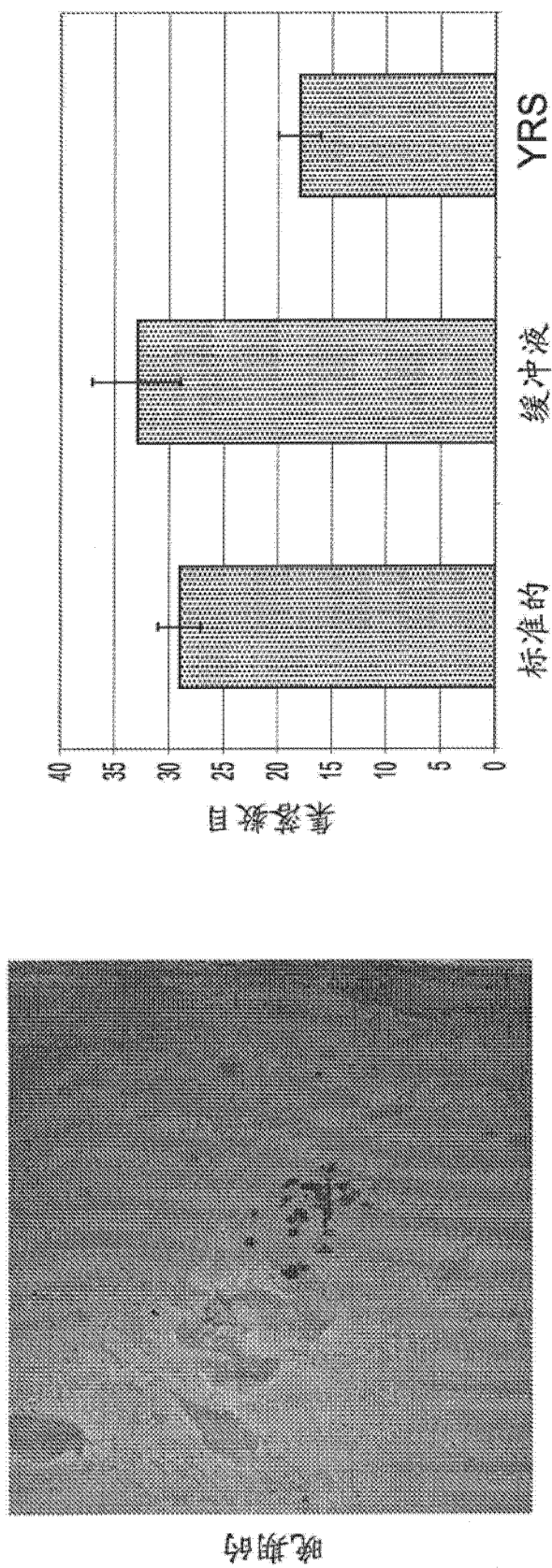


图 26C