

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101336299 B

(45) 授权公告日 2012. 12. 05

(21) 申请号 200680052307. X

(22) 申请日 2006. 12. 01

(30) 优先权数据

60/741, 580 2005. 12. 02 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 08. 04

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/046106 2006. 12. 01

(87) PCT申请的公布数据

W02007/064941 EN 2007. 06. 07

(73) 专利权人 斯克里普斯研究学院

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 X·-L·杨

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 程淼 付磊

(51) Int. Cl.

C07K 14/00(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1183803 A, 1998. 06. 03, 摘要, 权利要求 10, 实施例的活性测定.

审查员 吴永庆

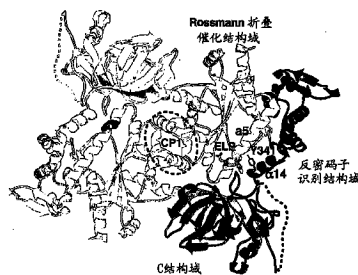
权利要求书 1 页 说明书 10 页
序列表 10 页 附图 7 页

(54) 发明名称

血管生成性酪氨酰 tRNA 合成酶组合物和方法

(57) 摘要

本发明提供了一种分离的酪氨酰 tRNA 合成酶 (TyrRS) 多肽变体, 该变体包括 (a) Rossmann 折叠区域或其部分, 优选地包括 α 5 卷曲; 和 (b) 反密码子识别结构域或其部分, 优选地包括 α 14 卷曲。优选地, 相对于天然人类 TyrRS 中的相应空间间隔, 在该变体的三级结构中 α 5 卷曲和 α 14 卷曲具有更大的空间间隔。该变体优选具有相对于人类 TyrRS 的氨基酸残基序列 (SEQ ID NO: 3) 的至少大约 50% 的氨基酸残基序列同一性, 相对于人类 TyrRS 氨基酸残基序列包括至少一个非保守的氨基酸残基取代, 并且优选地在该多肽三级结构外面部分的 α 5 卷曲中提供暴露的 ELR 基序。优选的 TyrRS 蛋白变体包含 SEQ ID NO: 4 的氨基酸残基序列或其部分。本发明的蛋白质和蛋白片段有血管生成活性, 可用于在哺乳动物组织中刺激血管生成。



1. 一种分离的酪氨酰 tRNA 合成酶多肽变体,其具有由 SEQ IDNO :4 组成的氨基酸序列,其中位置 341 的 Xaa 残基为丙氨酸残基。
2. 权利要求 1 的分离的酪氨酰 tRNA 合成酶多肽变体用于制备刺激血管生成的药物的用途。
3. 权利要求 1 的分离的酪氨酰 tRNA 合成酶多肽变体用于制备刺激内皮细胞迁移以促进伤口愈合的药物的用途。

血管生成性酪氨酰 tRNA 合成酶组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉援引

[0002] 本申请要求 2005 年 12 月 2 日提交的专利系列号为 60/741,580 的美国临时申请的利益,该临时申请通过援引并入本文。

[0003] 政府利益申述

[0004] 在此描述的工作的一部分由国家卫生研究院基金号 CA92577 资助。美国政府在本发明中享有一定的权利。

发明领域

[0005] 本发明涉及血管生成性酪氨酰 tRNA 合成酶 (TyrRS) 组合物。更具体的说本发明涉及血管生成性 TyrRS 蛋白变体和其血管生成片段,以及由此刺激血管生成的方法。

[0006] 发明背景

[0007] 氨基酰基 -tRNA 合成酶是催化作为蛋白质合成第一步的氨基酸加载到关联 tRNA 上的必需酶。这些必需酶根据独特序列基序的存在以及催化结构域的整体结构分为两种类型。I 类合成酶在其十个成员的催化结构域中具有两个高度保守的氨基酸基序,即序列 HIGH(SEQ ID NO :1) 和 KMSKS(SEQ ID NO :2)。相反,II 类合成酶具有三个高度简并的序列基序,称为基序 1-3。在过去的二十年中,tRNA 合成酶的一些附加功能被发现,包括 RNA 剪接、核输出以及调控基因转录。在这些古老的酶的长期进化中获得了这些附加功能。许多这些附加功能是附加结构域的结果,这些结构域已经和核心的合成酶序列融合。在高等真核生物中,两种合成酶的附加结构域已经证明具有与核心酶功能无关的生物学功能。例如,两种人类 tRNA 合成酶,即酪氨酰 -tRNA 合成酶 (TyrRS) 和色氨酰基 -tRNA 合成酶 (TrpRS),的片段已经证明具有细胞因子样活性。人类 TrpRS 的两个相关片段,称为微型 -TrpRS (mini-TrpRS) 和 T2-TrpRS,是血管生成的负调节物。人类 TyrRS (SEQ ID NO :3) 可被容易地分成两个活性片段。C 末端附加结构域片段具有类似于促炎细胞因子内皮 - 单核细胞 - 活化多肽 II (EMAPII) 的活性,而 N 末端片段 (微型 -TyrRS, SEQ ID NO :3 残基 1-364) 诱导血管生成。

[0008] 血管生成是严密调节的过程,其中必须维持促血管生成和抗血管生成的因子之间的缜密平衡。该平衡破坏导致过度或不足的血管生长,与诸如老年性黄斑变性、类风湿性关节炎、伤口愈合迟缓及许多其它状况的疾病有关。调控通过各种过程包括转录和翻译控制、翻译后修饰以及配体加工来得以控制。其它的促血管生长细胞因子,包括肿瘤坏死因子 - α 和肝细胞生长因子,是由前体蛋白的蛋白水解切割而产生的。类似的,蛋白酶切割由人类 TrpRS 和 TyrRS 释放出活性细胞因子片段。

[0009] 高等真核生物的 TrpRS 和 TyrRS 酶由核心催化区域组成,包括具有许多 α 卷曲和散布的 β 片层节段的 Rossmann 折叠。人类 TyrRS 的 Rossmann 折叠催化结构域 (SEQ ID NO :3 的残基 1 至 230) 包括在 Rossmann 折叠区域的 α 5 卷曲和反密码子识别结构域的 α 14 卷曲之间的氢键连接 (tether) (见图 3 底部和图 4 顶部)。该连接部分地阻止了在该蛋白活性位点结构域 α 5 卷曲中的 Glu-Leu-Arg (ELR) 基序。

[0010] 人类 TyrRS 和 TrpRS 的催化结构域均与它们各自相应的细菌和低等真核生物酶的催化结构域同源,各自附加 C 末端或 N 末端延伸。人类 TyrRS 的 C 末端延伸与促炎细胞因子 EMAP II 有大约 51% 的序列同一性。在每种情况中,全长的酶虽有合成酶功能,但无细胞因子活性。当高等真核生物特有的延伸被移除时,酶变成能够控制血管生成的活性细胞因子。

[0011] 现已发现,相对于天然人类 TyrRS 的以下卷曲的间隔,打开 Rossmann 折叠结构域的 $\alpha 5$ 卷曲和反密码子 (anticodon) 识别结构域的 $\alpha 14$ 卷曲之间的间隔使该蛋白具有血管生成作用。本发明提供 TyrRS 蛋白变体和其片段,它们可用于在哺乳动物组织中刺激血管生成。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明提供一种生物活性的 TyrRS 多肽变体,和其血管生成片段 (angiogenic fragments) (在此统称为“TyrRS 多肽变体”),它们适用于在哺乳动物组织中刺激血管生成 (angiogenesis)。本发明的分离的酪氨酰 tRNA 合成酶 (TyrRS) 多肽变体包含 Rossmann 折叠结构域或其部分;反密码子 (anticodon) 识别结构域或其部分;以及包括相对于人类 TyrRS 氨基酸残基序列 (SEQ ID NO:3) 的至少一个非保守氨基酸残基取代。该变体显示的血管生成活性大于天然的人类 TyrRS 的血管生成活性。优选地,本发明的 TyrRS 多肽变体具有相对于人类 TyrRS 的氨基酸残基序列 (SEQ ID NO:3) 的至少 50% 的氨基酸残基序列同一性,更优选地至少 80% 的序列同一性,最优选地,与 SEQ ID NO:3 相比至少大约 95% 的序列同一性。优选地,该 TyrRS 多肽变体包括在对应于 SEQ ID NO:3 的位置 46、340、以及 341 的一个或多个位置上的氨基酸残基的非保守氨基酸残基取代。

[0014] 在优选实施方案中,本发明的 TyrRS 多肽变体包含 Rossmann 折叠区域或其部分,其包括 $\alpha 5$ 卷曲,以及反密码子识别结构域或其部分,包括 $\alpha 14$ 卷曲。TyrRS 多肽变体具有相对于人类 TyrRS 的氨基酸残基序列 (SEQ ID NO:3,图 1) 的至少大约 50% 的氨基酸残基序列同一性。相对于人类 TyrRS 的氨基酸残基序列,该变体包括至少一个非保守的氨基酸残基取代,其打开了 (open up) 在 $\alpha 5$ 卷曲和 $\alpha 14$ 卷曲之间的分隔 (separation),相对于天然的人类 TyrRS 的 $\alpha 5$ 卷曲和 $\alpha 14$ 卷曲之间的分隔而言。优选地,在该变体的三级结构中该 $\alpha 14$ 卷曲与 $\alpha 5$ 卷曲至少有大约 6 埃的间隔,这是由 $\alpha 14$ 卷曲的任一氨基酸残基的 α 碳和 $\alpha 5$ 卷曲中的任一氨基酸残基的 α 碳之间的空间间隔决定的。该变体优选在 $\alpha 5$ 卷曲和 $\alpha 14$ 卷曲之间没有氢键。

[0015] 在本发明的 TyrRS 多肽变体的另一个优选实施方案中, $\alpha 5$ 卷曲包括 ELR 基序,在该变体的三级结构中 $\alpha 14$ 卷曲与 $\alpha 5$ 卷曲的 ELR 基序至少有大约 6 埃的距离,这是由 $\alpha 14$ 卷曲的任一氨基酸残基的 α 碳和 $\alpha 5$ 卷曲的 ELR 基序的任一氨基酸残基的 α 碳之间的空间间隔 (spatial separation) 决定的。在该多肽三级结构的外面部分存在暴露的 ELR 基序。该 TyrRS 多肽变体具有与人类 TyrRS 氨基酸残基序列 (SEQ ID NO:3,图 1) 相比至少大约 50% 的氨基酸残基序列同一性,并包括相对于人类 TyrRS 的氨基酸残基序列的至少一个非保守的氨基酸残基取代,消除了该 TyrRS 多肽变体中 $\alpha 5$ 卷曲的 ELR 基序和 $\alpha 14$ 卷曲的氨基酸残基之间的氢键的形成,或者以其它方式使该变体三级结构中的 ELR 基序得以暴露。

[0016] 在另一个优选实施方案中,该 TyrRS 多肽变体包括在相当于 SEQ IDNO:3 的位置 46、340 和 341 的一个或多个位置上的氨基酸残基的非保守氨基酸残基取代。一种特别优选

的取代是在相当于 SEQ ID NO :3 的 341 位的酪氨酸上使用具有脂肪族侧链的氨基酸残基, 优选非极性脂肪族侧链, 如丙氨酸残基进行的氨基酸替代。

[0017] 本发明的 TyrRS 变体适用于在哺乳动物 (例如, 人类) 组织中刺激血管生成。

[0018] 本发明还提供了通过使本发明的 TyrRS 多肽变体接触组织而在哺乳动物的组织中刺激血管生成和内皮细胞迁移的方法, 如本文所述。

[0019] 附图简述

[0020] 图 1 显示了人类 TyrRS 的氨基酸残基序列 (SEQ ID NO :3)。

[0021] 图 2 显示了本发明优选的人类 TyrRS 变体的氨基酸残基序列 (SEQ ID NO :4)。

[0022] 图 3 (顶部) 显示了野生型人类 TyrRS 序列的示意图, 由 3 个结构域组成: Rossmann 折叠催化结构域 (黄色, 残基 1-230), 反密码子识别结构域 (绿色, 残基 231-364) 和 C 末端结构域 (紫色, 残基 364-528)。头两个结构域形成具有活性的核心酶, 被称作微型 TyrRS (mini TyrRS) (残基 1-364)。底部显示了人类 TyrRS 的二聚物模型, 该模型基于微型 TyrRS 和 C- 结构域的晶体结构, 是由实验确定的。

[0023] 图 4 (顶部) 显示 ELR 区域与其它残基相互作用的细节, 包括 Y341。底部则显示了来自于多种生物 TyrRS 的部分序列比对, 其中相当于人类 TyrRS 三个结构域的残基被比对, 即残基 39-55 (区域 1), 残基 87-97 (区域 2), 残基 337-346 (区域 3)。参与结构域接触 (contacts) 的保守残基被突出显示。第 1 行包括人类 TyrRS 的氨基酸残基, 其中区域 1 对应 SEQ ID NO :5, 区域 2 对应 SEQ ID NO :6, 区域 3 对应 SEQ ID NO :7。第 2 行显示了鼠 TyrRS 的比对, 其中如人类 TyrRS 一样, 区域 1 对应 SEQ ID NO :5, 区域 2 对应 SEQ ID NO :6, 区域 3 对应 SEQ ID NO :7。第 3 行显示牛 TyrRS 的比对, 其中区域 1 对应 SEQ ID NO :5, 区域 2 对应 SEQ ID NO :8, 区域 3 对应 SEQ ID NO :9。第 4 行显示果蝇 (*Drosophila melanogaster*) TyrRS 的比对, 其中区域 1 对应 SEQ ID NO :5, 区域 2 对应 SEQ ID NO :10, 区域 3 对应 SEQ ID NO :11。第 5 行显示了秀丽线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的 TyrRS 的比对, 其中区域 1 对应 SEQ ID NO :12, 区域 2 对应 SEQ ID NO :13, 区域 3 对应 SEQ ID NO :14。第 6 行显示了酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的 TyrRS 的比对, 其中区域 1 对应 SEQ ID NO :15, 区域 2 对应 SEQ ID NO :16, 区域 3 对应 SEQ ID NO :17。第 7 行显示了裂殖酵母 (*Saccharomyces pombe*) TyrRS 的比对, 其中区域 1 对应 SEQ ID NO :18, 区域 2 对应 SEQ ID NO :19, 区域 3 对应 SEQ ID NO :20。第 8 行显示大肠杆菌 (*Escherichia coli*) TyrRS 的比对, 其中区域 1 对应 SEQ ID NO :21, 区域 2 对应 SEQ ID NO :22, 区域 3 对应 SEQ ID NO :23。第 9 行显示枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) TyrRS 的比对, 其中区域 1 对应 SEQ ID NO :24, 区域 2 对应 SEQ ID NO :25, 区域 3 对应 SEQ ID NO :26。

[0024] 图 5 显示了对人类 TyrRS 和 TyrRS-Y341A 的 X 射线散射分布。对人类 TyrRS 和 TyrRS 的 Y341A 突变, 采用它们测量出的小角度 X 射线散射 (SAXS) 曲线来计算电子对距离分布函数。对两个分子, 旋转半径 (Radius of Gyration) (R_g) 和最大距离 (D_{max}) 被计算出。Y341A 具有的 R_g 比野生型 TyrRS 的要大大约 4 埃, D_{max} 比野生型 TyrRS 的要大大约 20 埃 (angstrom)。

[0025] 图 6 图解说明 Y341A 突变在整个人类 TyrRS 三级结构上的开口效果 (opening effect), 它暴露了 ELR 基序。通过 SAXS 分析和蛋白酶消化研究确证了 Y341A 突变, 以开放 TyrRS 结构, 如图所示。

[0026] 图 7 说明了 TyrRS-Y341A 在小鼠基质胶 (Matrigel) 血管生成模型中的活性。小鼠接受 400 μ L 生长因子减少的基质胶的单独皮下注射, 或与 250nM TyrRS 蛋白混合注射。人类 VEGF₁₆₅ (20nM) 作为阳性对照。五天培养之后, 小鼠被静脉内注射荧光素标记的内皮结合凝集素 (fluorescein-labeled endothelial binding lectin) Griffonia (Bandeiraea) Simplicifolia I、同工凝集素 (isolectin) B4。栓 (plugs) 被切下、溶解并通过光谱测定法评定荧光素含量。打开的 TyrRS-Y341A 变体被观察到具有相对于野生型 TyrRS 的增加的血管生成活性。

[0027] 图 8 显示了人类 TyrRS 和 TyrRS-Y341A 在鸡尿囊绒毛膜试验 (chickchorioallantoic membrane assay) 中的活性。使用鸡尿囊绒毛膜试验测定 TyrRS 蛋白在体内的血管生成活性。TyrRS 变体 (1 μ M)、由 VEGF 和 bFGF 的组合组成的阳性对照以及由单独的缓冲液组成的阴性对照被用于尼龙网镶嵌的胶原板 (nylon mesh-embedded collagen onplant) 中的 CAM。

[0028] 图 9 显示了使用本发明 TyrRS 变体和对照处理的受损内皮细胞培养物中剩余无细胞区域 (remaining cells-free area) 相对于初始损伤区域 (area of the initial wound) 的百分比面积 (area) (纵轴) 图。

[0029] 优选实施方案的详细描述

[0030] 蛋白质中的氨基酸残基已经按不同的方法进行了分类, 主要基于氨基酸侧链所赋予的物理化学特征。例如, 一种通常的分类包括三类氨基酸: (1) 疏水 (非极性) 氨基酸, 包括甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸基和亮氨酸; (2) 带电氨基酸, 包括天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸和精氨酸; 以及 (3) 极性氨基酸, 包括丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、组氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺和色氨酸; 甘氨酸有时被包括入第四类, 只有它自己 (见 Chapter 1 of Branden and Tooze, Introduction to Protein Structure, Second Edition, Garland Publishing, Inc. 1998, pages 3-12, 其通过援引并入本文)。

[0031] 氨基酸残基还可以根据它们的侧链是脂肪族还是芳香族、小或大、极性的或非极性的、带电或不带电、其组合等等进一步地分类。如在此使用的, 非极性脂肪族氨基酸包括甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸和脯氨酸; 不带电的大的 (bulky) 氨基酸包括酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸基和甲硫氨酸; 小的 (small) 非极性氨基酸包括甘氨酸、丙氨酸和脯氨酸。

[0032] 如在此和附加的权利要求中使用的术语“非保守的”, 当用于氨基酸残基取代时, 表示在野生型或天然蛋白中的氨基酸残基被明显不同的结构类别的氨基酸残基取代, 例如具有明显不同的极性分类 (即非极性对极性)、大小分类、带电性分类、其组合等等。例如, 对于非保守性替换, 极性氨基酸比如酪氨酸可被非极性氨基酸、相对小的非极性氨基酸等等取代; 而小的非极性氨基酸比如甘氨酸或丙氨酸可被大的氨基酸、带电氨基酸等等取代。

[0033] 体现本发明的优选的分离的 TyrRS 多肽变体适用于在哺乳动物组织中刺激血管生成, 其包含 Rossmann 折叠区域或其部分 (a portion thereof), 它包括 α 5 卷曲以及包括 α 14 卷曲的反密码子识别结构域或其部分。该变体在 α 5 卷曲和 α 14 卷曲之间具有间隔, 该间隔大于在天然的人类 TyrRS 中的 α 5 卷曲和 α 14 卷曲之间的间隔。优选地, 在该变体的三级结构中, α 14 卷曲与 α 5 卷曲至少间隔大约 6 埃, 这是通过 α 14 卷曲的任一氨基酸残基的 α 碳和 α 5 卷曲的任一氨基酸残基的 α 碳之间的空间间隔决定的。该变体优选在

α 5 卷曲和 α 14 卷曲之间无氢键存在。该 TyrRS 多肽变体具有相对于天然人类 TyrRS 的氨基酸残基序列 (SEQ ID NO :3, 图 1) 的至少大约 50% 的氨基酸残基序列同一性, 更优选的至少大约 80%, 最优选的至少大约 95% 的序列同一性。相对于人类 TyrRS 的氨基酸残基序列, 该变体包括至少一个非保守的氨基酸残基取代, 相对于天然的人类 TyrRS 的 α 5 卷曲和 α 14 卷曲的间隔, 它打开了 α 5 卷曲和 α 14 卷曲之间的间隔, 并赋予该变体血管生成活性。

[0034] 在另一个优选实施方案中, 本发明的 TyrRS 变体包含 Rossmann 折叠区域或其部分, 其在多肽三级结构外面部分 (external portion) 提供暴露的 ELR 基序, 并且该变体具有相对于人类 TyrRS 的氨基酸残基序列 (SEQ ID NO :3) 的至少大约 50% 的氨基酸残基序列同一性, 优选的至少大约 80%, 最优选的大约 95% 的序列同一性。该 TyrRS 多肽变体相对于人类 TyrRS 的氨基酸残基序列包括至少一个非保守氨基酸残基取代, 其暴露了催化性 Rossmann 折叠结构域的 α 5 卷曲的 ELR 基序, 从而赋予该多肽血管生成活性。本发明的变体中, 变体三级结构中 α 5 卷曲的 ELR 残基与 α 14 卷曲的每个残基优选地至少距离大约 6 埃, 这由 α 14 卷曲的任一氨基酸残基 α 碳和 α 5 卷曲 ELR 基序的任一氨基酸残基 α 碳之间的空间间隔决定。

[0035] 优选地, 所述至少一个非保守氨基酸残基取代是在相当于 SEQ ID NO :3 的氨基酸残基 46、340 和 341 的一个或多个位置上的氨基酸残基的取代。例如, SEQ ID NO :3 中 341 位的酪氨酸优选地被具有非极性侧链的氨基酸残基 (例如, 非极性的脂肪族氨基酸, 例如甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸和脯氨酸) 取代。相当于 SEQ ID NO :3 的 46 位甘氨酸和 / 或 340 位丙氨酸的氨基酸残基优选地被具有大的 (bulky) 非极性侧链的氨基酸残基 (例如, 较大的不带电的疏水性氨基酸, 例如酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸或甲硫氨酸) 取代。如在此使用的, 提到 TyrRS 多肽变体中“相当于” (corresponding to) 给定序列比如 SEQ ID NO :3 中的氨基酸残基的氨基酸, 表示在 TyrRS 多肽变体的同源序列中某个位置的氨基酸, 当该同源序列与该给定序列相比较时, 与 SEQ ID NO :3 中的给定位置对准 (即对应)。蛋白质领域普通技术人员可以理解, 同源序列中氨基酸残基的编号可能与给定序列的编号不同 (例如, SEQ ID NO :3)。

[0036] 在另一实施方案中, 本发明的分离的 TyrRS 多肽变体包含 Rossmann 折叠区域或其部分, 其在该蛋白或片段的外面部分提供暴露的 ELR 基序, 并且它具有相对于人类 TyrRS 的氨基酸残基序列 (SEQ ID NO :3) 的至少大约 50% 的氨基酸残基序列同一性。优选地, 该变体的氨基酸残基序列具有相对于 SEQ ID NO :3 的至少大约 80% 的序列同一性, 更优选地大约 95%, 并且包括在相当于 SEQ ID NO :3 的 341 位的位置上的具有非极性侧链的氨基酸残基。优选地, 该氨基酸残基具有非极性的脂肪族侧链。例如, 该变体相当于人类 TyrRS 的第 341 位酪氨酸残基的氨基酸残基可以是甘氨酸残基、丙氨酸残基、苯丙氨酸残基、缬氨酸残基、亮氨酸残基、异亮氨酸残基、甲硫氨酸残基或脯氨酸残基。在某些实施方案中, 相当于人类 TyrRS 的 341 位酪氨酸的氨基酸残基是甘氨酸残基、丙氨酸残基或脯氨酸残基, 优选丙氨酸残基。

[0037] 在另一个优选实施方案中, 分离的 TyrRS 多肽变体包含 SEQ ID NO :4 (图 2) 的氨基酸残基序列或其片段, 其中 SEQ ID NO :4 的 341 位的残基 X 是甘氨酸残基、丙氨酸残基、苯丙氨酸残基、缬氨酸残基、亮氨酸残基、异亮氨酸残基、甲硫氨酸残基或脯氨酸残基, 优选甘氨酸、丙氨酸或脯氨酸残基, 更优选丙氨酸残基。优选地, 该 TyrRS 多肽变体包含 SEQ

ID NO :4 的整个 N 末段区域 (即残基 1-364)。优选地,片段至少包括 Rossmann 折叠区域 α 5 链的残基,即相当于 SEQ ID NO :4 的 87 至 104 位的残基。更优选地,该片段包括整个 Rossmann 折叠区域 (SEQ ID NO :4 的 1-230 残基)。

[0038] 本发明的特别优选的血管生成 TyrRS 多肽变体由 SEQ ID NO :4 的氨基酸残基序列组成,其中 SEQ ID NO :4 的位置 341 上的残基 X 从由甘氨酸残基、丙氨酸残基、苯丙氨酸残基、缬氨酸残基、亮氨酸残基、异亮氨酸残基、甲硫氨酸残基和脯氨酸残基构成的组中选择。更优选地,SEQ ID NO :4 的 341 位的残基 X 从由甘氨酸残基、丙氨酸残基、脯氨酸残基构成的组中选出,最优选丙氨酸残基。

[0039] 本发明也提供一种在哺乳动物的组织中刺激血管生成的方法。该方法包括让组织接触血管生成量 (angiogenic amount) 的在此详细描写的本发明的 TyrRS 多肽变体。

[0040] 另一方面,本发明提供一种在哺乳动物的组织中刺激内皮细胞迁移的方法。该方法包括让组织接触内皮细胞迁移刺激量 (endothelial cellsmigration stimulating amount) 的在此详细描写的本发明的 TyrRS 多肽变体。

[0041] 方法步骤

[0042] 质粒构建. TyrRS-Y341A 和微型 -TyrRS-Y341A 质粒是通过使用 QuikChange 定点诱变试剂盒 (Stratagene, La Jolla, CA) 构建的。模板分别是包含野生型 TyrRS 和微型 -TyrRS 的 pET 20b (+) (Novagen, Masdison, WI) 载体。所有的蛋白质连同 C 末端 His 标签表达以利于多肽的分离。合成寡核苷酸从 Invitrogen 公司 (Carlsbad, CA) 购买。

[0043] 蛋白质的生产和内毒素的去除. 重组多肽用大肠杆菌 B121-CodonPlus (DE 3)-RIL 细胞 (Stratagene, La Jolla, CA) 表达。当细胞生长至 OD_{600} 为 0.8 时,使用 1mM 异丙基 β -D- 硫代半乳糖吡喃糖苷 (Roche, Basel, Switzerland) 诱导 3 小时。然后细胞被沉淀出来并在缓冲液 A (20mM Tris-HCl, pH7.9, 30mM 咪唑, 500mM NaCl) 中重悬。超声裂解后,通过 74,000g 离心 30 分钟分离细胞碎片。有 His 标签的多肽通过 Ni-NTA 亲和色谱纯化。上清液加样至 Ni-NTA 亲和柱 (Qiagen, Valencia, CA) 上,用 100ml 缓冲液 B (缓冲液 A 加上 0.1% Triton-X114 (Sigma, St. Louis, MO)) 和 150ml 缓冲液 A 洗涤。多肽通过缓冲液 A 和缓冲液 C (20mM Tris-HCl, pH7.9, 250mM 咪唑, 500mM NaCl) 的线性梯度洗脱。含有 > 95% 纯度多肽的级份被收集、浓缩并透析至储存缓冲液 (50% 磷酸盐缓冲盐水, PBS, pH7.4, 50% 甘油, 2mM 二硫苏糖醇, DTT)。蛋白浓度通过使用 Bio-Rad Protein Assay 试剂 (Bio-Rad, Hercules, CA) 以牛血清清蛋白 (BSA, Sigma, St. Louis, MO) 作为标准进行 Bradford 试验来确定。内毒素浓度通过使用 Limulus Amebocyte Lysate (LAL) 试验 (BioWhittaker, Walkersville, MD) 确定。

[0044] 小角度 X 射线散射在斯坦福同步辐射实验室 (SSRL) 对野生型 TyrRS 和本发明的 TyrRS-Y341A 变体于 beamline 4-2 实施小角度 X 射线散射 (SAXS) 测定。对不同浓度 (2-20g/L) 的样品测量 X 射线散射曲线。X 射线波长 (λ) 为 1.38 Å, 检测器通道数被转变为动量传递 $Q = 4\pi \sin \theta / \lambda$, 其中 2θ 是散射角。两个不同的样本 - 检测器距离用于覆盖极小至中等的散射角,即 2.5 米覆盖大约 0.01-0.25 Å⁻¹ 的 Q 范围,而 0.5 米覆盖大约 0.03-0.93 Å⁻¹ 的 Q 范围。

[0045] 用等分样本装满带有云母窗的聚碳酸酯池 (polycarbonate cell) 并在测量过程中保持 20°C。在整个数据采集过程中使用 MarCCD165 检测器。一套典型的数据采集由每个

10 秒钟依次记录的 24 个二维散射影像组成。一系列数据与匹配的缓冲散射数据一起处理, 该缓冲散射数据典型地在蛋白溶液测量之后或之前立即记录。数据针对整合的光束强度标定 (scaled for integrated beam intensity)、按方位平均 (azimuthally averaged)、观察时间 - 依赖性变化, 其通常由辐射损伤所引起, 并进行统计学分析。平均水平上, 大约为匹配缓冲数据的波动 (variation) 的大约 1.5 倍高的统计波动是允许的。相对于超过该水平的第一个蛋白散射数据帧 (dataframe), 任何显示更高水平偏差的数据帧都被淘汰。在上述数据处理之后, 处理的缓冲散射曲线 (buffer scattering curves) 从相应的蛋白散射曲线中扣除。

[0046] 小角度和高角度数据的标定通过 PRIMUS 软件程序 (Konarev et al. 2003. "PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis", J. Appl. Crystallogr. 36 :1277-1282) 进行, 该软件程序也应用于通过 $Q \cdot R_g$ 0.45-1.3 的范围内进行 Guinier 绘图来计算 R_g 和 $I(Q = 0)$ 。通过使用 Svergun 等的 GNOM 小角度散射数据处理程序 (可以从 embl-hamburg(dot)de 网站获得) 进行实验数据的间接 Fourier 变换获得电子对距离分布函数 $P(r)$, 最初仅用小角度数据来获得最大距离 (D_{max}) 的准确估算。然后再次计算 $P(r)$, 包括具有以上给定 D_{max} 值的高角度数据用于模型构造。

[0047] 蛋白酶消化. 将野生型 TyrRS 和 TyrRS-Y341A 与血浆素或白细胞弹性蛋白酶按蛋白对蛋白酶大约 32 μ g 比 1 μ g 血浆素和 2500 μ g 每单位弹性蛋白酶的比率混合。混合物在 20°C 孵育大约 2 小时, 然后加入甲酸至 0.1% 的终浓度以终止反应。混合物中的切割片段通过 MALDI TOF 质谱和使用 Edman 降解法的 N 末端测序进行分析。

[0048] CAM 血管生成试验鸡尿囊绒膜 (CAM) 血管生成试验通过以下步骤进行。将受精的补体固定禽白血病病毒 (COFAL) - 阴性卵 (Charles River 实验室, Storrs, CT) 在 38°C /60% 湿度下孵育 3.5 天。然后卵被打开, 胚胎被转移至无菌的塑料称量盒中。胚胎被覆盖并在 37.5°C /90% 湿度下孵育。五天之后, 将含有大约 30 μ L 的 PBS, VEGF 和 bFGF (各自大约 0.15 和 0.5 μ g) 或 TyrRS 多肽 (1 μ M) 的胶原 / 网板 (collagen/mesh onplant) 放至胚胎的 CAM 膜上, 再孵育 66 小时。植入物的上网层 (upper mesh layers) 在立体显微镜下检查并对“方框”(即, 被网纤维限定的三维区域) 的比例评分, 其含有相对于方框总数的血管。

[0049] 鼠基质胶血管生成试验。在 Athymic wehi 小鼠皮下植入 400 μ L 的生长因子耗尽的基质胶 (Matrigel) (Becton Dickinson), 基质胶中补充有 PBS、20nM VEGF 或 250nM TyrRS、微型 -TyrRS、TyrRS-Y341A 或微型 -TyrRS-Y341A。五天后, 将小鼠静脉内注射入荧光素标记的内皮结合凝集素 Griffonia (Bandeiraea) Simplicifolia I, 同工凝集素 B4 (GSL-B4) (Vector 实验室, Burlingame, CA)。切下基质胶栓并在放射免疫 - 沉淀 (RIPA) 缓冲液 (10mM 磷酸钠, pH7.4, 150mM 氯化钠, 1% Nonidet P-40, 0.5% 脱氧胆酸钠, 0.1% 十二烷基硫酸钠) 中匀浆。匀浆之后, 使用分光光度分析定量每个栓 (plug) 的荧光素含量。

[0050] 内皮细胞迁移试验。人类脐静脉内皮细胞 (HUVECs) (Cambrex) 在含有 10% 胎牛血清 (FBS) 的 EGM 培养基 (Cambrex) 中按大约 3×10^5 每孔的密度接种于 6 孔培养板, 并生长至汇合单层。将细胞在不含有 FBS 的培养基中饥饿 16 小时并用移液管尖头沿着孔损伤细胞。损伤层用无血清培养基洗涤两次以除去细胞碎片, 并让细胞在存在和缺少 TyrRS 变体

和对照因子 (control factors) 的条件下迁移。在损伤后 0 和 6 小时,无细胞创伤区域被照像,并用图像分析软件 (NIH ImageJ 1.33) 分析。按剩余无细胞区与初始的创伤区的百分比计算内皮细胞迁移率,从中确定每种条件下的闭合区域百分比。

[0051] 氨基酸活化作用。通过 ATP- 焦磷酸酯 (PPi) 交换反应测定氨基酸活化作用。反应在 37°C 于含有 Tris-HCl (100mM, pH7.8)、KF (10mM)、MgCl₂ (2mM)、ATP (1mM)、BSA (0.1mg/mL)、NaPPi (2mM, 130cpm/nmole)、β- 巯基乙醇 (5mM)、酪氨酸 (2mM) 和 200nM 的该多肽的缓冲液中进行。

[0052] 结果和讨论

[0053] TyrRS 的残基 Y341 支撑了 (secure) 围绕 ELR 基序的结构。人们知道微型 -TyrRS (即人类 TyrRS 的 1-364 氨基酸残基) 而不是全长 TyrRS 可作为促血管生成细胞因子起作用。促血管生成活性依赖于 ELR 基序的存在,而 ELR 基序也存在于 CXC 趋化因子比如 IL-8 中,并为其活性所必需。在图 3 顶端展示了 TyrRS 的氨基酸序列简图,它由 3 个结构域组成:Rossmann 折叠催化结构域 (黄色,残基 1-230),反密码子识别结构域 (绿色,残基 231-364) 以及 C 末端结构域 (紫色,残基 364-528)。前两个结构域形成了活性的核心酶,被称作微型 TyrRS (残基 1-364)。最近解析的微型 -TyrRS 的三级结构显示出围绕 ELR 基序的氢键网络,该网络连接了该蛋白的反密码子识别以及活性部位结构域 (参见图 3,底部)。在 ELR 基序的 R93 的侧链和反密码子识别结构域的主链 A340 之间有两个氢键相互作用,其将 α 5 卷曲连接 (tether) 至 α 14 卷曲。另外, Y341 的芳环和主链 G46 之间的叠加相互作用 (stacking interactions),创建了这些的结构域之间的接触。这四个残基中, R93、G46 和 Y341 在迄今鉴定的所有真核生物 TyrRS 蛋白中是保守的。如图 3 (底部) 所示,每个片段表面静电势的互补性提供了在 α 5 卷曲和 α 14 卷曲之间的连接的证据。ELR 基序 (在螺旋 α 5 上) 被 C- 结构域所屏蔽,当 C- 结构域被移除后暴露出来。因为这个原因,对于血管生成,微型 TyrRS 是有活性的,而全长 TyrRS 无活性。Tyr341 残基 (来自反密码子识别结构域螺旋 α 14) 与 ELR 互相作用,并在连接 C- 结构域来阻挡 ELR 中发挥重要作用。A340 也是高度保守的,在 *S. cerevisiae* 中只由另一种小氨基酸,甘氨酸,所取代。

[0054] 两种独立的方法用来展示 Y341A 突变对 TyrRS 产生的三维结构打开。第一种方法是小角度 X 射线散射 (SAXS)。当电磁辐射的波长与样本微粒在相同长度尺度上时,该微粒将对辐射产生散射。探测并分析该散射图样可以得到关于微粒大小、形状以及内部结构的有价值的信息。SAXS 技术是一种探测在溶液中的大分子 (如蛋白质) 的整体构象变化的有力技术。从测量的野生型人类 TyrRS 和 Y341A 突变的散射曲线,计算出各样本的电子对距离分布函数 (图 5)。随后从该分布函数 P(r) 中导出旋转半径 (Rg) 和最大距离 (D_{max}) 的值。

[0055] 图 4 显示了 R93 和 Y341 之间的氢键连接。该氢键连接的破坏打开三级结构并暴露 ELR 基序。在野生型人类 TyrRS 和 Y341 被丙氨酸取代的变体 (TyrRS-Y341A) 的小角度 X 射线散射研究提供这种开口的直接证据 (参见图 5)。X 射线散射研究显示相对于野生型蛋白该变体的电子对距离分布变宽。TyrRS Y341A 具有的 Rg 比野生型 TyrRS 的大大约 4 埃, D_{max} 比野生型 TyrRS 的大大约 20 埃。这证明了 TyrRS Y341A 具有相对于野生型 TyrRS 更开放和更伸展的构象。

[0056] 支持相对于野生型人类 TyrRS 而言 TyrRS-Y341A 中有开放结构的其他证据是从使

用血浆素 (plasmin) 和弹性蛋白酶的酶切消化研究中获得的。蛋白酶通常在柔性的环区切割蛋白质, 这里没有确定的二级结构如 α 螺旋或 β 链。与 Y341A 突变相关的暴露 ELR 基序的结构上的开口的存在被额外的切割片段证实, 观察到的这些额外的切割片段是由于在更松弛、开放的结构上存在额外切割位点所造成的。使用血浆素和白细胞弹性蛋白酶, 在 Y341A 突变体上观察到相对于野生型 TyrRS 的额外的切割位点。观察到的这些额外切割位点是 L333、K334 和 A337, 它们全部位于反密码子识别结构域的螺旋 α 14, 接近于突变位点 341。这证实了在 Y341A 突变中, α 14 是松弛的并本身呈柔性环状, 不再被连接于 ELR 区域。图 6 图解了 Y341A 突变对人类 TyrRS 整体三级结构的开口效果。

[0057] Y341A 突变赋予全长 TyrRS 血管生成活性。Y341 是一个理想的突变目标, 这是由于它在真核生物中的保守性并且涉及 ELR 基序周围区域的三级结构稳定性。在全长 TyrRS 和微型 -TyrRS 中将该残基突变为丙氨酸来确定所述连接的破坏改变细胞因子和酶活性的程度。细胞因子活性在鸡尿囊绒膜 (CAM) 中测定, 基质胶试验用于血管生成测定。

[0058] 微型 -TyrRS 中包括入 Y341A 突变在 CAM 试验中未对它的活性产生可观察到的影响 - 正常多肽和变体都促进了血管生成。全长野生型人类 TyrRS 在该试验中无活性。但是人类 TyrRS 的 Y341 突变为丙氨酸 (即 TyrRS-Y341A) 则将该酶转变成成为促血管生成的细胞因子。为了证实在 CAM 试验中观察到的结果, 又将该多肽在小鼠基质胶栓模型中进行测定。在这个试验中, 含有 PBS 或其它蛋白的胶原栓被皮下注射。当在栓内有促血管生成因子时, 血管会散布进入栓中。在注射荧光内皮细胞结合凝集素后, 每个栓中的血管密度可以通过分光光度分析定量。在这个模型中, VEGF 和微型 -TyrRS 都呈现血管生成活性阳性。野生型 TyrRS 则无活性, 与 PBS 的血管生成水平相似。相反, TyrRS-Y341A 则诱导血管生成。这些数据独立地证实了 CAM 试验的结果。

[0059] 具有 Y341A 突变的 TyrRS 变体导致含有植入物的 CAM 膜区域的血管新生显著增加, 而野生型多肽或 PBS 均没有诱导应答 (多肽在尼龙网 - 镶嵌的胶原植入物中按 $1 \mu\text{M}$ 的浓度施用)。

[0060] 图 7 进一步表征了在小鼠基质胶栓试验中该 TyrRS 多肽的体内活性。小鼠按 $400 \mu\text{L}$ 量皮下注射单独的生长因子减少的基质胶或与 250nM 蛋白混合。5 天培养后, 移除栓并评定血管的存在。VEGF₁₆₅ (20nM) 用作阳性对照。按先前的报道, 微型 -TyrRS 在这个试验中促进血管生成。在微型 -TyrRS 中 Y341 突变为丙氨酸 (即, 微型 -TyrRS-Y341A) 不影响该应答。但是当在全长 TyrRS 中制造 Y341A 突变时, 则相对于野生型 TyrRS 有 2 倍的血管生成应答提升。

[0061] Y341A 突变使 TyrRS 活化酪氨酸的能力丧失。通过测定酪氨酸依赖的 ATP-PPi 交换反应来评定氨基酸的活化作用。如图 8 所示, Y341A 点突变敲除了全长 TyrRS 以及微型 -TyrRS 形成酪氨酰腺苷酸的能力。因此参与 tRNA 氨基酰化的结构元件与那些参与细胞因子功能的不同。

[0062] 内皮细胞迁移试验用来评价本发明的 TyrRS 变体刺激与伤口愈合有关的内皮细胞迁移的能力。人类脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 接种于含有 10% FBS 的 EGM 培养基中并生长至汇合单层。将细胞在不含有 FBS 的培养基中饥饿处理, 然后用移液管尖头沿孔划伤细胞。损伤层用无血清培养基洗涤以除去细胞碎片, 允许细胞在存在和不存在 TyrRS 变体以及对照因子的条件下迁移。无细胞创伤区域的影像在损伤后 0 和 6 小时拍摄, 并使用图像

分析软件 (NIH ImageJ, 1.33 版) 进行分析。按剩余的无细胞区域 (remaining cell-free area) 相对初始的创伤区域 (area of the initial wound) 的百分比计算内皮细胞迁移, 从中确定在各种条件下闭合区域 (area closed) 的百分比。图 9 显示在用本发明的 TyrRS 变体和对照处理的损伤细胞培养物中, 剩余无细胞区域与初始创伤区域的百分比图 (纵轴)。无细胞区域相对更小的百分比显示内皮细胞迁移和伤口愈合的提高。如图 9 所示, 本发明的 TyrRS 变体刺激内皮细胞迁移的程度与微型 TyrRS 的程度相当, 而比野生型 TyrRS 的程度更大。

[0063] 在不脱离本发明新颖特征的精神和范围的情况下, 可以对上述实施方案进行许多变化和修改。对于在此阐述的特定实施方案并无意图进行限制, 也不应当推断为进行限制。

[0001]

序列表

<110> YANG, Xiang-Lei

<120> 血管生成性酪氨酰 tRNA 合成酶组合物和方法

<130> TSRI 1163.1 PCT

<150> US 60/741, 580

<151> 2005-12-02

<160> 26

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

His Ile Gly His

1

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Lys Met Ser Lys Ser

1

5

<210> 3

<211> 528

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

1

5

10

15

[0002]

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 Pro Ala Lys Asn Ser Glu Pro Glu Glu Val Ile Pro Ser Arg Leu
 355 360 365

[0003]

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> 4

<211> 528

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人类 TyrRS 变体

<221> 变体

<222> 341

<223> Xaa = Gly, Ala, Phe, Val, Leu, Ile, Met, 或 Pro

<400> 4

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

[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 | Xaa | Pro | Asp | Pro | Ser | Lys | Gln | Lys | Pro | Met | Ala | Lys |
| | | | 340 | | | | | | 345 | | | | | 350 | |
| Gly | Pro | Ala | Lys | Asn | Ser | Glu | Pro | Glu | Glu | Val | Ile | Pro | Ser | Arg | Leu |
| | | | 355 | | | | | | 360 | | | | | 365 | |
| Asp | Ile | Arg | Val | Gly | Lys | Ile | Ile | Thr | Val | Glu | Lys | His | Pro | Asp | Ala |
| | | | 370 | | | | | | 375 | | | | | 380 | |
| Asp | Ser | Leu | Tyr | Val | Glu | Lys | Ile | Asp | Val | Gly | Glu | Ala | Glu | Pro | Arg |
| | | | 385 | | | | | | 390 | | | | | 395 | |
| 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 |

[0005]

| | | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 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> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Tyr Trp Gly Thr Ala Thr Thr Gly Lys Pro His Val Ala Tyr Phe Val

1

5

10

15

Pro

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Trp Glu Leu Leu Glu Leu Arg Val Ser Tyr Tyr

1

5

10

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ala Ser Ala Ala Tyr Pro Asp Pro Ser Lys

[0006]

<211> 17

<212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 12

Tyr Trp Gly Thr Ala Thr Thr Gly Lys Pro His Val Gly Tyr Leu Val

1

5

10

15

Pro

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 13

Trp Glu Leu Leu Lys Cys Arg Val Ile Tyr Tyr

1

5

10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 14

Lys Glu Lys Gly Tyr Asn His Ser Thr Asp

1

5

10

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 15

Tyr Trp Gly Thr Ala Pro Thr Gly Arg Pro His Cys Gly Tyr Phe Val

1

5

10

15

Pro

<210> 16

[0008]

<211> 11

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 16

Leu Glu Val Val Asn Tyr Arg Ala Lys Tyr Tyr

1

5

10

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 17

Ser Glu Lys Gly Tyr Pro Val Ala Thr Pro

1

5

10

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> *Saccharomyces pombe*

<400> 18

Tyr Trp Gly Ser Ala Pro Thr Gly Arg Pro His Cys Gly Tyr Phe Val

1

5

10

15

Pro

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> *Saccharomyces pombe*

<400> 19

Met Glu Leu Val Gln His Arg Val Arg Tyr Tyr

1

5

10

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

[0009]

<213> *Saccharomyces pombe*

<400> 20

Leu Lys Ala Ala Tyr Pro Asp Pro Lys Asp

1 5 10

<210> 21

<211> 18

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 21

Tyr Cys Gly Phe Asp Pro Thr Ala Asp Ser Leu His Leu Gly His Leu

1 5 10 15

Val Pro

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 22

Leu Asn Thr Glu Glu Thr Val Gln Glu Trp Val

1 5 10

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 23

Asp Gly Val Pro Met Val Glu Met Glu

1 5

<210> 24

<211> 18

<212> PRT

<213> *Bacillus subtilis*

[0010]

<400> 24

Tyr Ser Gly Phe Asp Pro Thr Ala Asp Ser Leu His Ile Gly His Leu

1

5

10

15

Leu Pro

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 25

Leu Asn Thr Ala Asp Ile Val Ser Glu Trp Ser

1

5

10

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 26

Asp Val Pro Ser Met Glu Val Asp Ser Thr

1

5

10

SEQ ID NO: 3

```

1 MGDAPSPEEK LHLITRNLQE VLGEEKLKEI LKERELKIYW GTATTGKPHV AYFVPMSKIA
61 DFLKAGCEVT ILFADLHAYL DNMKAPWELL ELRVSYENV IKAMLESIGV PLEKLFKFIKG
121 TDYQLSKEYT LDVYRLSSVV TQHDSKKAGA EVVKQVEHPL LSGLLYPGLQ ALDEEYLKVD
181 AQFGGIDQRK IFTFAEKYLP ALGYSKRVHL MNPMPVGLTG SKMSSEEEES KIDLLDRKED
241 VKKKLLKKAFC EPGNVENNGV LSFIKHVLFP LKSEFVILRD EKWGGNKTYT AYVDLEK DFA
301 AEVVHPGDLK NSVEVALNKL LDPIREKFNT PALKKLASAA YPDPSKQKPM AKGPAKNSEP
361 EEVIPSRLDI RVGKIITVEK HPDADSLYVE KIDVGEAEP TVVSGLVQFV PKEELQDRLV
421 VVLCNLKPQK MRGVESQGML LCASIEGINR QVEPLDPPAG SAPGEHV FVK GYEKGQPD EE
481 LKPKKKVFEK LQADFKISEE CIAQWKQTNF MTKLGSISCK SLKGGNIS

```

图 1

SEQ ID NO: 4

```

1 MGDAPSPEEK LHLITRNLQE VLGEEKLKEI LKERELKIYW GTATTGKPHV AYFVPMSKIA
61 DFLKAGCEVT ILFADLHAYL DNMKAPWELL ELRVSYENV IKAMLESIGV PLEKLFKFIKG
121 TDYQLSKEYT LDVYRLSSVV TQHDSKKAGA EVVKQVEHPL LSGLLYPGLQ ALDEEYLKVD
181 AQFGGIDQRK IFTFAEKYLP ALGYSKRVHL MNPMPVGLTG SKMSSEEEES KIDLLDRKED
241 VKKKLLKKAFC EPGNVENNGV LSFIKHVLFP LKSEFVILRD EKWGGNKTYT AYVDLEK DFA
301 AEVVHPGDLK NSVEVALNKL LDPIREKFNT PALKKLASAA XPDPSKQKPM AKGPAKNSEP
361 EEVIPSRLDI RVGKIITVEK HPDADSLYVE KIDVGEAEP TVVSGLVQFV PKEELQDRLV
421 VVLCNLKPQK MRGVESQGML LCASIEGINR QVEPLDPPAG SAPGEHV FVK GYEKGQPD EE
481 LKPKKKVFEK LQADFKISEE CIAQWKQTNF MTKLGSISCK SLKGGNIS

```

图 2

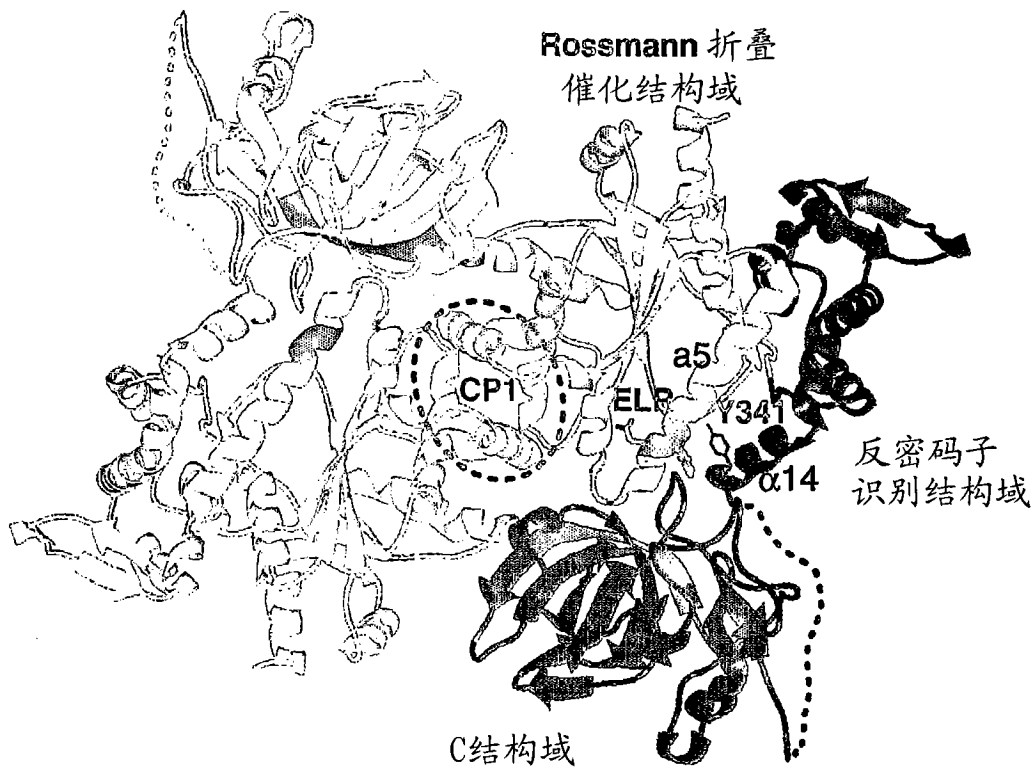
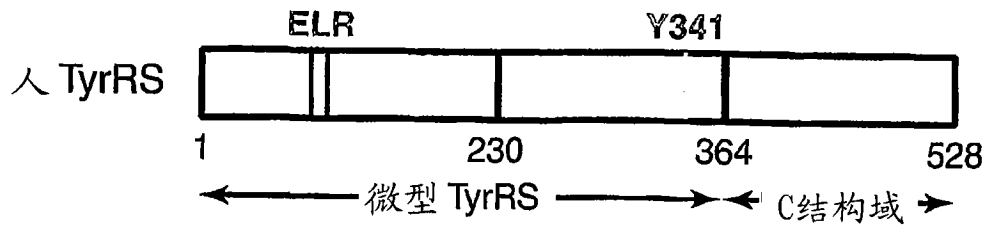
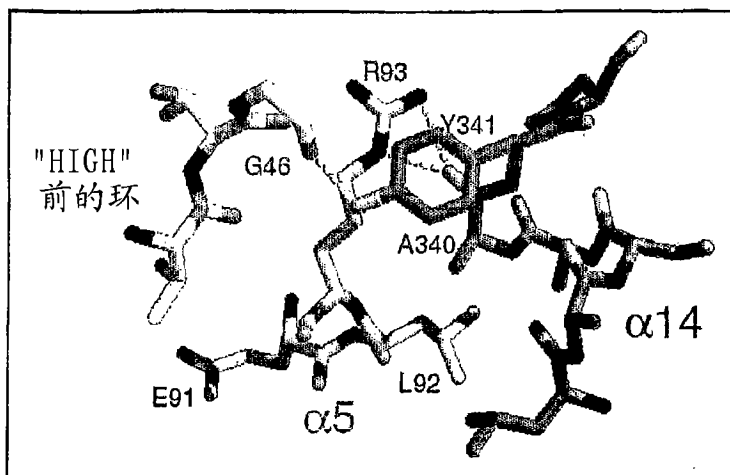


图 3



| | 区域1 | 区域2 | 区域3 |
|-------|-------------------------------------|----------------|---------------|
| | 39 | 55 | 87 97 337 346 |
| ROW 1 | <i>H. sap</i> YWGTATTG-KPHVAYFVP... | WELLELDVSY... | ASAPDPDSK |
| ROW 2 | <i>M. mus</i> YWGTATTG-KPHVAYFVP... | WELLELRYSY... | ASAPDPDSK |
| ROW 3 | <i>B. tau</i> YWGTATTG-KPHVAYFVP... | WDVLELRYSY... | SSAPDPDSK |
| ROW 4 | <i>D. mel</i> YWGTATTG-KPHVAYFVP... | WELLELRKY... | SAPPPAK |
| ROW 5 | <i>C. ele</i> YWGTATTG-KPHVGYLVP... | WELLKCRVIYY... | KEKGNHSTD |
| ROW 6 | <i>S. cer</i> YWGTAPTG-RPHCGYFVP... | LEVVNYPKY... | SEKSPVATP |
| ROW 7 | <i>S. pom</i> YWGSAPTG-RPHCGYFVP... | MELVQHEVRY... | LKASPPDPKD |
| ROW 8 | <i>E. col</i> YCGFDPTADSLHLGHLVP... | LNTTEETVQEW... | DG-VPMVEME |
| ROW 9 | <i>B. sub</i> YSGFDPTADSLHIGHLLP... | LNTADIVSEWS... | DVPSMEVDST |

图 4

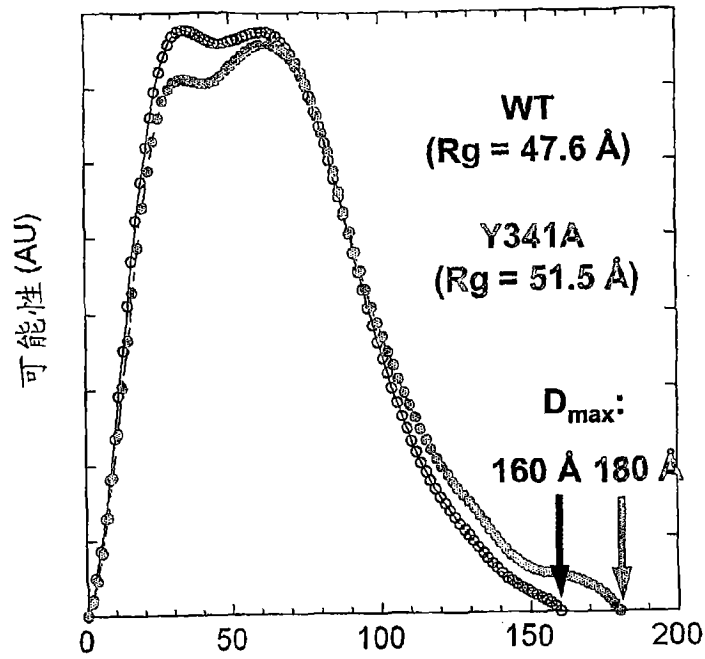
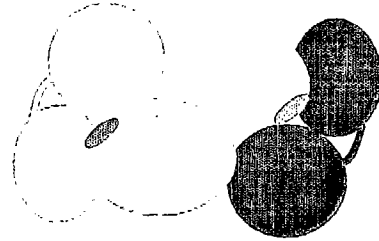


图 5

天然人TyrRS与封闭的ELR



Y341A突变或其他
序列变体

开放的人TyrRS与暴露的ELR



图 6

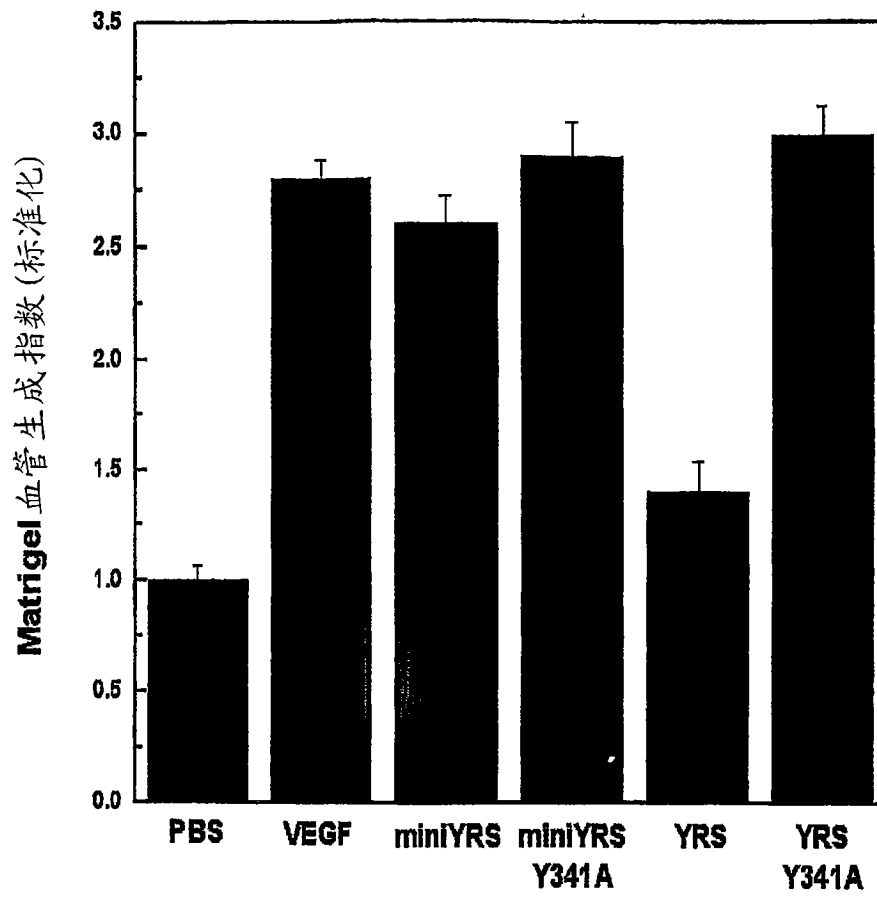


图 7

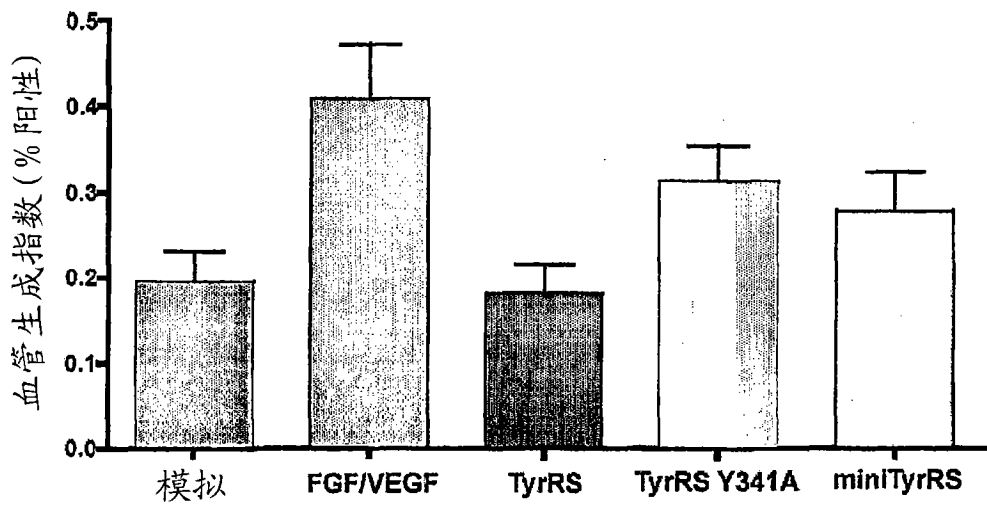


图 8

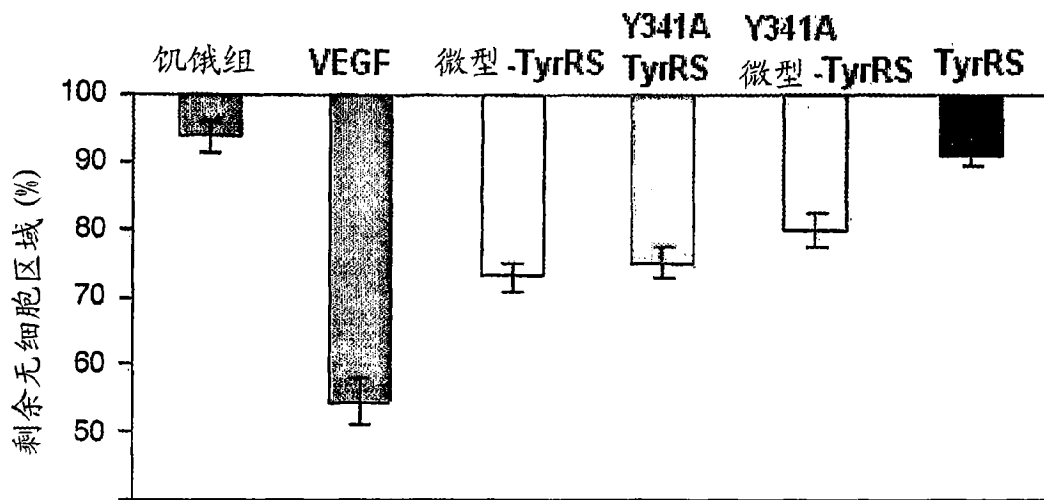


图 9