



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102159708 B

(45)授权公告日 2016.08.31

(21)申请号 200980132761.X

伊娃·瑞比卡·斯蒂芬妮·阿莫尔

(22)申请日 2009.06.26

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司 11204

(30)优先权数据

代理人 王达佐 洪欣

61/076,098 2008.06.26 US

61/095,548 2008.09.09 US

(51)Int.Cl.

C12N 9/64(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2011.02.22

(56)对比文件

(86)PCT国际申请的申请数据

WO 2008016356 A2,2008.02.07,

PCT/US2009/048915 2009.06.26

US 2007061916 A1,2007.03.15,

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2009/158649 EN 2009.12.30

Kevin L.An Active Dominant Mutation of Glycyl-tRNA Synthetase Causes Neuropathy in a Charcot-Marie-Tooth 2D Mouse Model.《Neuron》.2006,第51卷(第6期), 715-726.

(73)专利权人 ATYR医药公司
地址 美国加利福尼亚州

审查员 吕健

(72)发明人 克瑞斯迪·海伦·佩耶尔
莱斯利·安·格林尼
赖安·安德鲁·亚当斯 洪非
赵基

权利要求书3页 说明书33页
序列表8页 附图21页

(54)发明名称

包含具有非常规生物活性的甘氨酸-tRNA合成酶的组合物和方法

(57)摘要

提供了具有非常规生物活性的分离的甘氨酸-tRNA合成酶多肽和多核苷酸,以及与其相关的组合物和方法。

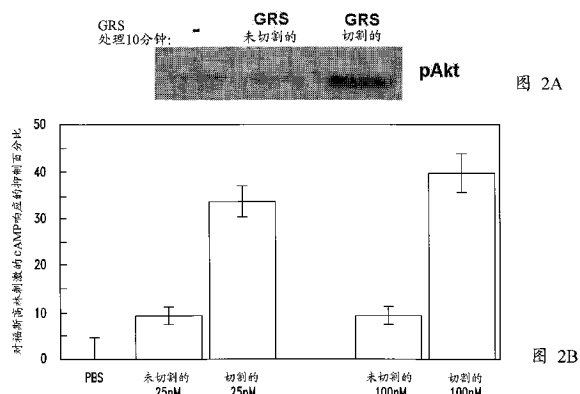


图 2: 切割的GRS片段诱导bAEC细胞中的信号转导
(A)AKt的激活,(B)对福斯高林刺激的cAMP响应的抑制

1. 分离的甘氨酸-tRNA合成酶多肽,其由以下组成:

(a).SEQ ID NO:1的氨基酸残基214-438;

(b).(a)的片段,所述片段包含SEQ ID NO:1的氨基酸残基367-438;

(c).(a)的变体,所述变体是通过对SEQ ID NO:1的氨基酸残基214-438进行5个或更少的氨基酸保守型取代而不同于SEQ ID NO:1的氨基酸残基214-438;或者

(d).(b)的变体,所述变体是通过对SEQ ID NO:1的氨基酸残基367-438进行5个或更少的氨基酸保守型取代不同于SEQ ID NO:1的氨基酸残基367-438;

其中所述甘氨酸-tRNA合成酶多肽具有细胞信号转导活性。

2. 如权利要求1所述的分离的甘氨酸-tRNA合成酶多肽,其中所述多肽由SEQ ID NO:1的氨基酸残基214-438或SEQ ID NO:1的氨基酸残基367-438组成;或者由与SEQ ID NO:1的氨基酸残基214-438、或与SEQ ID NO:1的氨基酸残基367-438不同的序列组成,所述不同序列是通过对SEQ ID NO:1的氨基酸残基214-438或SEQ ID NO:1的氨基酸残基367-438进行5个或更少的氨基酸保守型取代、缺失或添加获得的。

3. 如权利要求1所述的分离的甘氨酸-tRNA合成酶多肽,其中所述多肽由SEQ ID NO:1的氨基酸残基214-438组成,或者由与SEQ ID NO:1的氨基酸残基214-438不同的序列组成,其中所述不同的序列是通过对SEQ ID NO:1的氨基酸残基214-438进行5个或更少的氨基酸保守型取代、缺失或添加获得的。

4. 如权利要求2所述的分离的甘氨酸-tRNA合成酶多肽,其中所述多肽由SEQ ID NO:1的氨基酸残基214-438组成,或者由与SEQ ID NO:1的氨基酸残基214-438不同的序列组成,其中所述不同的序列是通过对SEQ ID NO:1的氨基酸残基214-438进行5个或更少的氨基酸保守型取代获得的。

5. 如权利要求2所述的分离的甘氨酸-tRNA合成酶多肽,其中所述多肽由SEQ ID NO:1的氨基酸残基214-438组成,或者由与SEQ ID NO:1的氨基酸残基214-438不同的序列组成,其中所述不同的序列是通过对SEQ ID NO:1的氨基酸残基214-438的C末端或N末端进行5个或更少的氨基酸缺失获得的。

6. 如权利要求2所述的分离的甘氨酸-tRNA合成酶多肽,其中所述多肽由SEQ ID NO:1的氨基酸残基214-438组成。

7. 如权利要求1所述的分离的甘氨酸-tRNA合成酶多肽,其中所述多肽由SEQ ID NO:1的氨基酸残基367-438组成,或者由与SEQ ID NO:1的氨基酸残基367-438不同的序列组成,所述不同的序列是通过对SEQ ID NO:1的氨基酸残基367-438进行5个或更少的氨基酸保守型取代、缺失或添加获得的。

8. 如权利要求2所述的分离的甘氨酸-tRNA合成酶多肽,其中所述多肽由SEQ ID NO:1的氨基酸残基367-438组成,或者由与SEQ ID NO:1的氨基酸残基367-438不同的序列组成,所述不同的序列是通过对SEQ ID NO:1的氨基酸残基367-438进行5个或更少的氨基酸保守型取代获得的。

9. 如权利要求2所述的分离的甘氨酸-tRNA合成酶多肽,其中所述多肽由SEQ ID NO:1的氨基酸残基367-438组成,或者由与SEQ ID NO:1的氨基酸残基367-438不同的序列组成,其中所述不同的序列是通过对SEQ ID NO:1的氨基酸残基367-438的C末端或N末端进行5个或更少的氨基酸缺失获得的。

10. 如权利要求7所述的分离的甘氨酸-tRNA合成酶多肽,其中所述多肽由SEQ ID NO:1的氨基酸残基367-438组成。

11. 如权利要求1所述的分离的甘氨酸-tRNA合成酶多肽,其中所述保守型取代选自(a)氨基酸亲水指数在 ± 2 以内的氨基酸的取代;(b)氨基酸亲水值在 ± 2 以内的氨基酸的取代;(c)氨基酸电荷近似的氨基酸的取代;以及(d)氨基酸大小近似的氨基酸的取代。

12. 如权利要求1所述的分离的甘氨酸-tRNA合成酶多肽,其中所述保守型取代选自以下氨基酸组:(a)天冬氨酸和谷氨酸;(b)赖氨酸和精氨酸;(c)甘氨酸和丙氨酸;(d)丝氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸;(e)天冬酰胺和谷氨酰胺;以及(f)亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸。

13. 如权利要求1所述的分离的甘氨酸-tRNA合成酶多肽,其中所述保守型取代选自以下氨基酸组:(1)ala、pro、gly、glu、asp、gln、asn、ser和thr;(2)cys、ser、tyr和thr;(3)val、ile、leu、met、ala和phe;(4)lys、arg和his;以及(5)phe、tyr、trp和his。

14. 如权利要求2所述的分离的甘氨酸-tRNA合成酶多肽,其中所述保守型取代选自(a)氨基酸亲水指数在 ± 2 以内的氨基酸的取代;(b)氨基酸亲水值在 ± 2 以内的氨基酸的取代;(c)氨基酸电荷近似的氨基酸的取代;以及(d)氨基酸大小近似的氨基酸的取代。

15. 如权利要求2所述的分离的甘氨酸-tRNA合成酶多肽,其中所述保守型取代选自以下氨基酸组:(a)天冬氨酸和谷氨酸;(b)赖氨酸和精氨酸;(c)甘氨酸和丙氨酸;(d)丝氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸;(e)天冬酰胺和谷氨酰胺;以及(f)亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸。

16. 如权利要求2所述的分离的甘氨酸-tRNA合成酶多肽,其中所述保守型取代选自以下氨基酸组:(1)ala、pro、gly、glu、asp、gln、asn、ser和thr;(2)cys、ser、tyr和thr;(3)val、ile、leu、met、ala和phe;(4)lys、arg和his;以及(5)phe、tyr、trp和his。

17. 如权利要求1-16任一项所述的分离的甘氨酸-tRNA合成酶多肽,其中所述多肽是聚乙二醇化的。

18. 如权利要求1-16任一项所述的分离的甘氨酸-tRNA合成酶多肽,其中所述细胞信号转导活性选自Akt介导的细胞信号转导的调节、Erk1/2介导的细胞信号转导的调节和GPCR介导的细胞信号转导的调节、CD71的调节和CD80的调节。

19. 如权利要求1-16任一项所述的分离的甘氨酸-tRNA合成酶多肽,其中所述细胞信号转导活性为细胞因子产生和/或释放的调节,其中所述细胞因子选自TNF- α 、IL1- β 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p40、MIP1- α 、MIP-1 β 、GRO- α 、MCP-1和IL-1ra。

20. 融合蛋白,包含权利要求1-19中任一项所述分离的甘氨酸-tRNA合成酶多肽和异源融合伴侣,所述异源融合伴侣选自亲和性标签和Fc区。

21. 分离的多核苷酸,其编码权利要求1-19中任一项所述的分离的甘氨酸-tRNA合成酶多肽或权利要求20所述的融合蛋白。

22. 包含权利要求21所述的分离的多核苷酸的表达载体。

23. 包含权利要求22所述的表达载体的宿主细胞。

24. 包含至少一种权利要求1-19任一项所述的分离的甘氨酸-tRNA合成酶多肽的二聚体复合物或多聚体复合物。

25. 组合物,其包含生理可接受的载体和至少一种选自以下的组分:

(i)如权利要求1-19任一项所述的分离的甘氨酸-tRNA合成酶多肽;

(ii)如权利要求20所述的融合蛋白;

- (iii)如权利要求21所述的分离的多核苷酸;
- (iv)如权利要求22所述的表达载体;和
- (v)如权利要求24所述的二聚体复合物或多聚体复合物。

26. 调节细胞信号转导活性的方法,包括使细胞或组织与权利要求25所述的组合物接触。

27. 如权利要求26所述的方法,其中所述细胞活性选自Akt介导的细胞信号转导的调节、Erk1/2介导的细胞信号转导的调节和GPCR介导的细胞信号转导的调节、CD71的调节和CD80的调节。

28. 如权利要求26所述的方法,其中所述细胞信号转导活性是细胞因子产生和/或释放的调节,其中所述细胞因子选自TNF- α 、IL1- β 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p40、MIP1- α 、MIP-1 β 、GRO- α 、MCP-1和IL-1ra。

29. 如权利要求25所述的组合物在制备治疗个体的疾病状态的药物中的用途,其中所述疾病状态选自炎性疾病、自身免疫性疾病、肿瘤疾病、代谢疾病、神经疾病、感染、心血管疾病和异常血管生成相关的疾病。

30. 如权利要求25所述的组合物,其用于治疗选自以下的疾病状态:炎性疾病、自身免疫性疾病、肿瘤疾病、代谢疾病、神经疾病、感染、心血管疾病和异常血管生成相关的疾病。

包含具有非常规生物活性的甘氨酸-tRNA合成酶的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35U.S.C. §119(e)要求于2008年9月9日提交的美国临时专利申请第61/095,548号和于2008年6月26日提交的美国临时专利申请第61/076,098号的优先权,将这些(两篇)临时申请的全部内容通过引用的方式并入本文。

[0003] 关于序列表的陈述

[0004] 以文本格式代替纸制版提供本申请相关的序列表,并且在此通过引用并入本说明书。包含序列表的文本文件命名为120161_408PC_SEQUENCE_LISTING.txt。该文本文件为22KB,创建于2009年6月26日,并且在提交本说明书同时,通过EFS-Web以电子方式提交了该文本文件。

[0005] 发明背景

发明领域

[0006] 本发明通常涉及甘氨酸-tRNA合成酶(GlyRS)多肽、包含该多肽的组合物、和使用该多肽的方法。

[0007] 相关技术的描述

[0008] 在翻译过程中,催化tRNA分子氨酰化的氨酰-tRNA合成酶对于遗传信息的解码是必不可少的。每个真核生物的tRNA合成酶都由核心酶和附加于该核心酶氨基末端或羧基末端的另外的结构域组成,所述核心酶与tRNA合成酶的原核生物对应部分密切相关。例如,人酪氨酰-tRNA合成酶(TyrRS)具有的羧基末端结构域不是原核生物和低等真核生物TyrRS分子的一部分。

[0009] 已经证实,数种氨酰tRNA合成酶具有不同于其参与翻译的非常规功能。例如,小酪氨酰tRNA合成酶(mini-tyrosyl tRNA)(小TyrRS),即对应于氨基酸残基1-364并且被多形核细胞弹性蛋白酶和纤维蛋白溶酶切割的TyrRS的N末端结构域,表现出在全长蛋白中未发现的非常规生物活性。在体外,小TyrRS表现出刺激嗜中性粒细胞活化和趋化作用、内皮细胞增殖和迁移,并且在鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)和小鼠基质胶分析中促进血管生成。小TyrRS具有ELR基序,所述ELR基序与诸如IL-8的CXC趋化因子相似,参与多种其趋化因子或血管生成活性。与其它包含ELR的细胞因子一样,该基序的突变抑制小TyrRS结合并刺激白细胞和血管生成。

[0010] 此外,已经证实,TrpRS的截短形式具有抗血管生成的特性。在正常的人细胞中,可以检测到两种形式的TrpRS:由全长分子(氨基酸残基1-471)构成的主要形式和次要的截短形式。所述次要形式是通过前体mRNA的其它剪接使氨基末端结构域缺失而产生的并且被称为小TrpRS。已经确定,小TrpRS的氨基末端是位于全长TrpRS分子的位置48处的蛋氨酸残基。可选择地,可以通过蛋白质水解产生截短的TrpRS。例如,牛TrpRS在胰腺中高表达并被分泌进胰液中,由此产生截短的TrpRS分子。其它的研究表明,小TrpRS抑制VEGF诱导的细胞增殖和迁移(Wakasugiet al.,Proc.Natl.Acad.Sci.99:173-177(2002))。尤其是,鸡CAM分

析表明,小TrpRS阻断VEGF的血管生成活性。相比之下,全长TrpRS不抑制血管生成。因此,移除前48个氨基酸残基可以暴露TrpRS的抗血管生成的活性。因此,与TyrRS一样,某些形式的TrpRS具有除tRNA的氨酰化之外的活性。

[0011] 鉴于对于其他形式的TyrRS和TrpRS相关的非常规活性和治疗相关活性的这些发现,有必要鉴定其它氨酰tRNA合成酶蛋白的生物学相关的形式,从而开发出该蛋白家族的全部治疗潜能。因此,本发明满足这些需要并且提供其他相关的优势。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明源于下述发现:甘氨酸-tRNA合成酶(GlyRS)和衍生于GlyRS的某些多肽具有治疗相关的非常规生物活性。因此,一方面,本发明提供具有至少一种非常规生物活性的分离的GlyRS多肽,以及基本上保留所述非常规活性的所述多肽的活性片段和变体。本文使用的“非常规活性”通常是指本发明的GlyRS多肽所具有的、除了将甘氨酸添加至tRNA^{Gly}分子以外的活性。如本文详述,在某些实施方案中,本发明GlyRS多肽表现出的非常规生物活性可以包括,但不限于,细胞增殖的调节、凋亡的调节、细胞迁移的调节、细胞信号转导的调节和/或细胞因子产生和/或分泌的调节。在更具体的实施方案中,所述活性包括Akt介导的细胞信号转导的调节、Erk1/2介导的细胞信号转导的调节和GPCR介导的细胞信号转导的调节、内皮细胞成管的调节和细胞结合的调节。在其他的具体的实施方案中,所述活性包括CD71和/或CD80的调节。在其他的具体的实施方案中,所述活性包括细胞因子产生和/或释放的调节,其中所述细胞因子选自TNF- α 、IL1- β 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p40、MIP1- α 、MIP-1 β 、GRO- α 、MCP-1和IL-1ra。

[0014] 在某些实施方案中,本发明的GlyRS多肽是全长哺乳动物GlyRS蛋白的连续片段。在更具体的实施方案中,GlyRS多肽是SEQ ID NO:1所示的人GlyRS蛋白序列的连续片段。作为说明,所述片段基本上可以为任何长度,只要其保留至少一种目的非常规生物活性。在某些示例性实施方案中,本发明GlyRS多肽的大小在长度上为约50-100、50-200、50-300、50-400、50-500或50-600个氨基酸。在其他的实施方案中,本发明GlyRS多肽的大小在长度上为约100-200、100-300、100-400、100-500或100-600个氨基酸。在其他的示例性实施方案中,本发明GlyRS多肽的大小在长度上为约200-300、200-400、200-500或200-600个氨基酸。

[0015] 在本发明的其他实施方案中,GlyRS多肽包含GlyRS蛋白序列的片段的活性变体(即,保留至少一种目的非常规生物活性),所述GlyRS蛋白序列例如SEQ ID NO:1所示的人GlyRS蛋白序列。在更具体的实施方案中,所述活性变体是这样的多肽,该多肽沿其长度与SEQ ID NO:1所示的人甘氨酸-tRNA合成酶序列具有至少70%、80%、90%、95%或99%同一性。

[0016] 本发明的其他实施方案提供了天然存在的或非天然存在的GlyRS剪接变体和突变体,其具有如本文所描述的一种或多种非常规活性。

[0017] 在本发明更具体的实施方案中,GlyRS多肽包含GlyRS序列(例如,SEQ ID NO:1)的片段,所述片段基本上由氨基酸残基57-685、214-685、239-685、311-685、439-685、511-658、214-438、367-438、214-420、214-338、85-127或25-56、1-213、1-61、85-214、333-685、128-685、265-685或483-685、或以上的活性片段或变体组成,所述活性片段或变体基本上保留至少一种目的非常规生物活性。

[0018] 在其他具体的实施方案中,所述GlyRS多肽不是NCBI#CR594947、U09587和/或

U09510任一项所示的多肽。

[0019] 按照本发明的另一方面,提供了包含至少一种如本文所述的GlyRS多肽和异源融合伴侣的融合蛋白。

[0020] 按照本发明的另一方面,提供了编码本文所述的多肽和融合蛋白的分离的多核苷酸、以及包含这些多核苷酸的表达载体和包含这些表达载体的宿主细胞。

[0021] 按照本发明的另一方面,提供了组合物,例如药学组合物,其包含生理可接受的载体和至少一种本文所述的本发明的分离的多肽、融合蛋白、抗体、分离的多核苷酸、表达载体、宿主细胞等。

[0022] 在其它方面,本发明还提供了通过将细胞或组织与本文所述的本发明的组合物接触而调节细胞活性的方法,其中所述待调节的细胞活性选自细胞增殖、凋亡的调节、细胞迁移的调节、细胞信号转导的调节和/或细胞因子产生和/或分泌的调节。在更具体的实施方案中,所述细胞活性选自Akt介导的细胞信号转导的调节、Erk1/2介导的细胞信号转导的调节、GPCR介导的细胞信号转导的调节、内皮细胞成管的调节、和细胞结合的调节。在其他具体的实施方案中,所述细胞活性选自CD71和/或CD80的调节。在其他具体的实施方案中,所述细胞活性选自细胞因子产生和/或释放的调节,例如,其中所述细胞因子选自TNF- α 、IL1- β 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p40、MIP1- α 、MIP-1 β 、GRO- α 、MCP-1和IL-1ra。

[0023] 另一方面,本发明提供了通过给予本发明的组合物来治疗需要治疗的个体的疾病、病症或其他的疾病状态。作为示例,所述疾病、病症或疾病状态可以包括,但不限于,癌症、炎症性疾病、免疫疾病(包括自身免疫性疾病)、异常造血活性相关的疾病、需要神经形成或神经保护的疾病、代谢性病症和/或异常血管生成相关的疾病状态。

[0024] 另一方面,所述多核苷酸、多肽、抗体和/或本发明的其他组合物基本上可以用于本领域内已知的并且可用的任何类型的筛查分析。例如,本发明的组合物(例如,多肽、多核苷酸和/或抗体)可以与已知的筛查方法联合使用,从而鉴定出适合于本发明的治疗的合适的细胞类型和/或疾病状态。在其他的实例中,本发明的组合物(例如,多肽、多核苷酸和/或抗体)可以与已知的筛查方法联合使用,从而鉴定出直接或间接地介导或调节本文组合物的非常规活性的激动剂、拮抗剂、结合伴侣、竞争性抑制剂、细胞效应物等。例如,在具体的实施方案中,提供了鉴定受试化合物作为非常规活性的抑制剂或增强剂或作为本发明的组合物与一种或多种受调节的该组合物的结合伴侣、细胞效应物和/或细胞类型之间的相互作用的抑制剂或增强剂的筛查方法。例如,所述方法可以包括以下步骤:形成包括以下的反应混合物:(i)本发明的组合物,(ii)已知被所述组合物结合和/或调节的结合伴侣、细胞效应物和/或细胞类型,和(iii)受试化合物;并且检测在该受试化合物的存在下结合和/或调节是否增加或减少。相对于不存在受试化合物时的效应,受试化合物存在时的活性或调节的统计学显著的改变(增强或抑制)表明结合和/或活性的潜在激动剂(模拟剂或增强剂)或拮抗剂(抑制剂)。

[0025] 序列表简要说明

[0026] SEQ ID NO:1是人细胞质甘氨酸-tRNA合成酶(GlyRS)的全长氨基酸序列。

[0027] SEQ ID NO:2是编码SEQ ID NO:1的GlyRS多肽的核酸序列。

[0028] SEQ ID NOs:3-9代表在确定GlyRS片段边界中所分析的示例性肽序列(参见实施例4和表1)。

[0029] SEQ ID NOs:10和11是在鉴定LPS处理的小鼠巨噬细胞所分泌的片段中使用的GlyRS序列(参见实施例12和图16)。

[0030] 附图简要说明

[0031] 图1A-1D显示的是GlyRS蛋白的结构域结构和氨基酸序列(图1B;SEQ ID NO:1),以及通过使用人嗜中性粒细胞弹性蛋白酶进行的受控制的全长GlyRS蛋白水解而产生的GlyRS片段的SDS-PAGE分离。

[0032] 图2A-2B分别表明用本发明GlyRS片段处理的内皮细胞中Akt和Gi-GPCRs的激活。

[0033] 图3表明用本发明GlyRS片段处理的单核细胞中Erk1/2(促分裂原活化蛋白激酶Erk1和Erk2)的激活。

[0034] 图4A描述了为了确定GlyRS片段边界而进行的GlyRS肽(例如,SEQ ID NO:9)的分析过程的概况。图4B显示了在全长人GlyRS二聚体的晶体结构中,对应于氨基酸214-438的GlyRS片段G6的结构。

[0035] 图5表明对应于氨基酸214-438的GlyRS片段G6与内皮细胞结合。

[0036] 图6表明GlyRS片段G6调节单核细胞的迁移。图6(插入图)表明GlyRS片段G6通过选择趋化因子受体进行信号转导。

[0037] 图7A显示CD41+集落的代表性染色。图7B表明小集落、中集落和大集落的定量结果,并且表明GlyRS片段G6影响巨核细胞祖细胞的集落形成。

[0038] 图8显示用抗CD71-FITC抗体染色并通过流式细胞仪分析后,G6-3处理的单核细胞中CD71增殖标志物的上调。

[0039] 图9显示用抗CD80-FITC抗体染色并通过流式细胞仪分析后,G6-3处理的单核细胞中CD80活化标志物的上调。

[0040] 图10表明GlyRS和G6片段刺激多种细胞因子的分泌,所述细胞因子包括IL1- β 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p40、MIP1- α 、MIP-1 β 、GR α 、MCP-1和IL-1ra。

[0041] 图11A和11B表明GlyRS片段G6和G6-3诱导小鼠白血病巨噬细胞的迁移。

[0042] 图12表明GlyRS片段G6诱导HL-60早幼粒细胞性白血病细胞的迁移。

[0043] 图13表明在小鼠巨噬细胞的细胞裂解物和培养基中均可检测到GlyRS,这表明全长GlyRS的内源性分泌。

[0044] 图14表明用LPS处理小鼠巨噬细胞的情况下,在分泌的培养基中可以发现GlyRS的特异性片段,但在细胞裂解物中不能发现GlyRS的特异性片段,这表明GlyRS片段的产生和分泌。

[0045] 图15表示用LPS处理小鼠巨噬细胞以后,为了鉴定片段产生自哪部分的全长蛋白而进行的LC/MS/MS分析的结果。

[0046] 图16A显示了上清条带9的序列信息,所述上清条带9为分子量为约45-50kd的GRS片段,加粗部分显示相关的肽序列。图16B显示了上清条带18的序列信息,所述上清条带18为分子量为约15kd的GRS片段,加粗部分显示相关的肽序列。

[0047] 发明的详细描述

[0048] 除非文中有明确相反指示,本发明的实践可利用本技术领域内的常规分子生物学方法和重组DNA技术,为了说明的目的,其中很多方法和技术在下文进行了描述。这些技术在文献中有充分的讲解。参见,例如,Sambrook,et al.,Molecular Cloning:A Laboratory

Manual(分子克隆:实验手册)(第2版,1989);Maniatis et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(分子克隆:实验手册)(1982);DNA Cloning:A Practical Approach (DNA克隆:操作方法),vol.I&II(D.Glover,ed.);Oligonucleotide Synthesis(寡核苷酸合成)(N.Gait,ed.,1984);Nucleic Acid Hybridization(核酸杂交)(B.Hames&S.Higgins, eds.,1985);Transcription and Translation(转录和翻译)(B.Hames&S.Higgins, eds., 1984);Animal Cell Culture(动物细胞培养)(R.Freshney,ed.,1986);A Practical Guide to Molecular Cloning(分子克隆操作指南)(B.Perbal,ed.,1984)。

[0049] 本文引用的所有出版物、专利、专利申请通过引用的方式将其全部内容并入本文。

[0050] 在本说明书和附加的权利要求中所用的单数形式“a”、“an”、“the”包括复数形式,除非文中明确指示不包括复数。

[0051] 本文所用的术语“多肽”和“蛋白”以常规含义使用,即氨基酸序列。多肽不被限制为特定的长度,但是,在本发明的背景下,其通常代表全长蛋白的片段,并且可以包括诸如糖基化、乙酰化、磷酸化等的翻译后修饰以及本领域内已知的其他修饰,并且包括天然存在的或非天然存在的修饰。可以使用多种公知的重组技术和/或合成技术来制备本发明的多肽和蛋白,这些技术的示例性实例将在下文进一步讨论。

[0052] 甘氨酸tRNA合成酶多肽

[0053] 本发明通常涉及分离的GlyRS多肽、编码该多肽的多核苷酸、与该多肽结合的结合剂、该多肽的类似物、变体和片段等,以及使用上述任何物质的组合物和方法。

[0054] 因此,按照本发明的一方面,提供了具有治疗相关的非常规活性的GlyRS多肽,以及包含所述GlyRS多肽的组合物。在某些实施方案中,GlyRS多肽是GlyRS蛋白的截短的形式。本文所用的“截短的”GlyRS是指短于其对应的全长GlyRS蛋白的甘氨酸-tRNA合成酶蛋白,例如,由于从所述全长GlyRS蛋白N末端和/或C末端移除氨基酸。截短的程度,即从全长GlyRS蛋白移除的N末端和/或C末端氨基酸残基的数量,可以明显不同,但是如本文所述,当给予细胞、组织或个体时,仍然提供所需的细胞效应。在某些实施方案中,从全长GlyRS蛋白的N末端和/或C末端截去至少约5、10、15、20、25、50、75、100、150、200、250、300、350个氨基酸或更多,包括所有中间的长度。中间的长度意图包括之间的所有整数,例如,6、7、8等,51、52、53等,201、202、203等。

[0055] 在某些示例性的实施方案中,可以使用本领域内已知的和可得到的技术、使用多种蛋白水解酶中的任何一种来产生截短的GlyRS多肽。示例性的蛋白酶包括,例如,无色肽酶、氨肽酶、安克洛酶、血管紧张素转换酶、菠萝蛋白酶、钙蛋白酶、钙蛋白酶I、钙蛋白酶II、羧肽酶A、羧肽酶B、羧肽酶G、羧肽酶P、羧肽酶W、羧肽酶Y、半胱天冬酶1、半胱天冬酶2、半胱天冬酶3、半胱天冬酶4、半胱天冬酶5、半胱天冬酶6、半胱天冬酶7、半胱天冬酶8、半胱天冬酶9、半胱天冬酶10、半胱天冬酶11、半胱天冬酶12、半胱天冬酶13、组织蛋白酶B、组织蛋白酶C、组织蛋白酶D、组织蛋白酶E、组织蛋白酶G、组织蛋白酶H、组织蛋白酶L、木瓜凝乳蛋白酶、胃促胰酶、胰凝乳蛋白酶、梭菌蛋白酶、胶原酶、补体C1r、补体C1s、补体因子D、补体因子I、黄瓜素、二肽基肽酶IV、弹性蛋白酶(白细胞)、弹性蛋白酶(胰腺)、内蛋白酶Arg-C、内蛋白酶Asp-N、内蛋白酶Glu-C、内蛋白酶Lys-C、肠激酶、因子Xa、无花果蛋白酶、弗林蛋白酶、粒酶A、粒酶B、HIV蛋白酶、IGase、组织激肽释放酶、亮氨酸氨基肽酶(总的)、亮氨酸氨基肽酶(细胞溶质的)、亮氨酸氨基肽酶(微粒体的)、基质金属蛋白酶、蛋氨酸氨基肽酶、中性蛋

白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、纤维蛋白溶酶、氨酰基脯氨酸二肽酶、链酶蛋白酶E、前列腺特异性抗原、来自灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)的碱性蛋白酶、来自曲霉属(*Aspergillus*)的蛋白酶、来自佐氏曲霉(*Aspergillus saitoi*)的蛋白酶、来自酱油曲霉(*Aspergillus sojae*)的蛋白酶、蛋白酶(地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*))(碱性的或碱性蛋白酶)、来自多黏芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)的蛋白酶、来自芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)的蛋白酶、来自根霉菌(*Rhizopus* sp.)的蛋白酶、蛋白酶S、蛋白酶体、来自米曲霉(*Aspergillus oryzae*)的蛋白酶、蛋白酶3、蛋白酶A、蛋白酶K、蛋白C、焦谷氨酸氨基肽酶、凝乳酶、链激酶、枯草杆菌蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、凝血酶、组织纤维蛋白溶酶原激活剂、胰蛋白酶、类胰蛋白酶和尿激酶。

[0056] 在某些实施方案中,本发明提供了本文所述的GlyRS多肽的变体。本发明某些示例性实施方案所包括的多肽变体通常沿其长度表现出与野生型GlyRS蛋白的对应的区的至少约70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性(按照下文所述测定),所述野生型GlyRS蛋白例如SEQ ID NO:1。

[0057] 多肽变体与天然存在的GlyRS多肽的区别可以是一个或多个取代、缺失、添加和/或插入。这些变体可以是天然存在的或可以是合成产生的,例如,通过修饰一个或多个本发明的上述多肽序列并按照本文所述用本领域内公知的多种技术中的任何一种评估其生物活性。

[0058] 在其他的示例性实施方案中,GlyRS变体可以是天然存在的或非天然存在的剪接变体,其中所述剪接变体具有至少一种非常规活性,例如本文所述的非常规活性。

[0059] 在其他的示例性实施方案中,相对于野生型GlyRS多肽序列,所述变体包含一个或多个天然存在的或非天然存在的点突变,其中所述变体多肽具有至少一种非常规活性,例如本文所述的非常规活性。

[0060] 在某些实施方案中,变体包含保守型取代。“保守型取代”是指氨基酸被具有相似性质的另一个氨基酸所取代,这样本领域技术人员会预测到基本上未改变的多肽的二级结构和亲水性。可以在本发明的多核苷酸和多肽的结构内进行修饰,并且仍可获得编码具有所需特性的变体或衍生多肽的功能分子。当希望改变多肽的氨基酸序列来产生等同的甚至改进的本发明的GlyRS多肽的变体时,例如,本领域技术人员可以根据表1改变编码DNA序列的一个或多个密码子。

[0061] 例如,在蛋白结构中,某些氨基酸可以被其他的氨基酸取代,而不会造成与诸如受体、抗体的抗原结合区或底物分子的结合位点的结构的相互作用结合能力的明显损失。因为通常是蛋白的相互作用能力和性质限定该蛋白的生物功能活性,所以可以在蛋白序列中进行某些氨基酸序列取代,也当然可以在其基本的DNA编码序列中进行取代,而仍然获得具有相似性质的蛋白。因此,已考虑到可以在所公开的组物的多肽序列或编码所述多肽的相应DNA序列中进行各种改变,而不会造成所需的功效或活性的明显损失。

[0062] 表1

氨基酸			密码子						
丙氨酸	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU			
半胱氨酸	Cys	C	UGC	UGU					
天冬氨酸	Asp	D	GAC	GAU					
谷氨酸	Glu	E	GAA	GAG					
苯丙氨酸	Phe	F	UUC	UUU					
甘氨酸	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU			
组氨酸	His	H	CAC	CAU					
异亮氨酸	Ile	I	AUA	AUC	AUU				
赖氨酸	Lys	K	AAA	AAG					
[0063] 亮氨酸	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU	
蛋氨酸	Met	M	AUG						
天冬氨酸	Asn	N	AAC	AAU					
脯氨酸	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU			
谷氨酰胺	Gln	Q	CAA	CAG					
精氨酸	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU	
丝氨酸	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU	
苏氨酸	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU			
缬氨酸	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU			
色氨酸	Trp	W	UGG						
酪氨酸	Tyr	Y	UAC	UAU					

[0064] 在进行这些改变时,还应当考虑氨基酸的亲水指数。本领域内普遍理解亲水氨基酸指数在赋予蛋白相互作用的生物学功能中的重要性(Kyte and Doolittle, 1982, 通过引用并入本文)。例如, 已知氨基酸的相对亲水特性与得到的蛋白的二级结构有关, 而该二级结构随之限定了该蛋白与诸如酶、底物、受体、DNA、抗体、抗原等其他分子的相互作用。基于氨基酸的疏水性和电荷特性, 每种氨基酸具有指定的亲水指数(Kyte and Doolittle, 1982)。这些值是: 异亮氨酸(+4.5)、缬氨酸(+4.2)、亮氨酸(+3.8)、苯丙氨酸(+2.8)、半胱氨酸/胱氨酸(+2.5)、蛋氨酸(+1.9)、丙氨酸(+1.8)、甘氨酸(-0.4)、苏氨酸(-0.7)、丝氨酸(-0.8)、色氨酸(-0.9)、酪氨酸(-1.3)、脯氨酸(-1.6)、组氨酸(-3.2)、谷氨酸(-3.5)、谷氨酰胺(-3.5)、天冬氨酸(-3.5)、天冬酰胺(-3.5)、赖氨酸(-3.9)和精氨酸(-4.5)。

[0065] 本领域内已知, 某些氨基酸可以被具有相似亲水指数或评分的其他氨基酸取代, 而仍产生具有相似生物活性的蛋白, 即仍获得生物学功能等同的蛋白。在进行这些改变时, 亲水指数在 ± 2 以内的氨基酸的取代是优选的, 特别优选的是在 ± 1 以内的氨基酸的取代, 并且更特别优选的是在 ± 0.5 以内的那些氨基酸的取代。

[0066] 本领域内还应当理解, 可以基于亲水性有效地进行相似氨基酸的取代。如美国专利第4,554,101号详述, 已将下述亲水性值指定给氨基酸残基: 精氨酸(+3.0)、赖氨酸(+3.0)、天冬氨酸(+3.0 ± 1)、谷氨酸(+3.0 ± 1)、丝氨酸(+0.3)、天冬酰胺(+0.2)、谷氨酰胺(+0.2)、甘氨酸(0)、苏氨酸(-0.4)、脯氨酸(-0.5 ± 1)、丙氨酸(-0.5)、组氨酸(-0.5)、半胱氨酸(-1.0)、蛋氨酸(-1.3)、缬氨酸(-1.5)、亮氨酸(-1.8)、异亮氨酸(-1.8)、酪氨酸(-2.3)、苯丙氨酸(-2.5)、色氨酸(-3.4)。应当理解, 氨基酸可以被具有相似亲水性值的另一氨基酸取代, 且仍获得生物学上等同的蛋白。在这类改变中, 亲水性值在 ± 2 以内的氨基酸的取代

是优选的,特别优选的是在 ± 1 以内的氨基酸的取代,并且更特别优选的是在 ± 0.5 以内的那些氨基酸的取代。

[0067] 如上文所述,氨基酸取代可以基于氨基酸侧链取代基的相对的相似性,例如,它们的疏水性、亲水性、电荷、大小等。综合考虑了上述各种特性的示例性取代是本领域技术人员所公知的,并且包括:精氨酸与赖氨酸、谷氨酸与天冬氨酸、丝氨酸与苏氨酸、谷氨酰胺与天冬酰胺、以及缬氨酸、亮氨酸与异亮氨酸。

[0068] 还可以基于残基的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和/或两性性质的相似性进行氨基酸取代。例如,带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸,带正电荷的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸,以及带有具有相似亲水性值的不带电荷极性头部基团的氨基酸包括:亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸,甘氨酸和丙氨酸,天冬酰胺和谷氨酰胺,以及丝氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。可以代表保守型改变的其他氨基酸组包括:(1)ala、pro、gly、glu、asp、gln、asn、ser、thr;(2)cys、ser、tyr、thr;(3)val、ile、leu、met、ala、phe;(4)lys、arg、his;和(5)phe、tyr、trp、his。变体还可以含有非保守型改变或可选择地含有非保守型改变。在优选的实施方案中,变体多肽与天然序列的区别在于5个或更少的氨基酸的取代、缺失或添加。还可以(或可选择地)通过例如对多肽的二级结构和亲水性质具有最小影响的氨基酸的缺失或添加来修饰变体。

[0069] 多肽在蛋白的N末端可以包含信号(或前导)序列,其在翻译的同时或在翻译后指导蛋白的转移。多肽还可以与连接物或其他序列缀合,以便于多肽的合成、纯化或鉴定(例如,多聚组氨酸),或用于增强多肽与固相载体的结合。例如,多肽可以与免疫球蛋白Fc区缀合。

[0070] 当比较多肽序列时,如果两个序列中的氨基酸序列在如下文所述进行最大对应比对时是相同的,则可以认为所述两个序列是“同一的”。通常通过在比较窗中比较序列来进行两个序列间的比较,从而鉴定和比较序列相似性的局部区域。本文所用的“比较窗”是指至少约20个连续位置、通常30-约75个、40-约50个连续位置的节段,其中在将序列与具有相同数量连续位置的参考序列最佳比对后,可以将所述序列与参考序列进行比较。

[0071] 例如,可以使用Lasergene生物信息学软件套装中的Megalign程序(DNASTAR, Inc., Madison, WI),使用默认参数,进行用于比较的序列的最佳比对。该程序包括以下参考文献中描述的数种比对方案:Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in Proteins-Matrices for detecting distant relationships(蛋白质的进化改变模型-用于检验远距离关系的矩阵); In Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure(蛋白质序列和结构图谱), National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenies(比对和系统发生的标准方法) pp. 626-645 Methods in Enzymology(酶学方法) vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. and Sharp, P.M. (1989) CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. and Muller W. (1988) CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D. (1971) Comb. Theor 11:105; Santou, N. Nes, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4: 406-425; Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. (1973) Numerical Taxonomy-the Principles and Practice of Numerical Taxonomy(数值分类法-数值分类法的原理和实践), Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. and Lipman, D.J. (1983) Proc. Nat'l Acad.,

Sci.USA 80:726-730。

[0072] 可选择地,可以通过以下来进行用于比较的序列的最佳比对:Smith and Waterman (1981) *Add. APL. Math.* 2:482的局部同一性算法、Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443的同一性比对算法、Pearson and Lipman (1988) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85:2444的相似性方法搜索、这些算法的计算机执行(Wisconsin遗传学软件包中的GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA和TFASTA, Genetics Computer Group(GCG), 575 Science Dr., Madison, WI)、或检查。

[0073] 适于测定序列同一性和序列相似性百分比的算法的实例是BLAST和BLAST 2.0算法,其分别描述于Altschul et al. (1977) *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402和Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410中。例如,可以按照本文所述的参数使用BLAST和BLAST 2.0,从而测定本发明多核苷酸和多肽的序列同一性百分比。通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)可以公开获得进行BLAST分析的软件。对于氨基酸序列而言,可以将评分矩阵用于计算累积评分。在以下情况时停止每个方向的字符命中延伸:当累积比对评分从其最大达到的值下降量X时;由于一个或多个负评分残基比对的累积而使累积评分达到0或低于0时;或达到任一序列的末端时。BLAST算法参数W、T和X决定了所述比对的灵敏度和速度。

[0074] 在一个示例性方法中,通过在至少20个位置的比较窗中比较两个最佳比对的序列来测定“序列同一性百分比”,其中,与用于两个序列最佳比对的参考序列(其不包含添加或缺失)相比,比较窗中的多肽序列的一部分可以包含20%或更少的、通常为5%-15%、或10%-12%的添加或缺失(即,空位)。通过以下来计算百分比:测定两个序列中都存在的相同氨基酸残基的位置数量来产生配对位置数,将配对位置数除以参考序列中(即窗的大小)的位置总数,并且将结果乘以100以产生序列同一性的百分比。

[0075] 在本发明的某些实施方案中,提供了融合多肽和编码融合多肽的多核苷酸。融合多肽是指直接地或间接地通过氨基酸连接物共价连接于一个或多个异源多肽序列(融合伴侣)的本发明的多肽。形成融合蛋白的多肽通常是将C末端连接至N末端,但是它们也可以是C末端连接至C末端、N末端连接至N末端、或N末端连接至C末端。融合蛋白的多肽可以为任何顺序。

[0076] 可以为了几乎任何所需目的设计并包括融合伴侣,只要它们对多肽所需的活性没有不利影响。例如,在一个实施方案中,融合伴侣包含有助于以高于天然重组蛋白的产量表达蛋白(表达增强子)的序列。可以选择其他的融合伴侣,以增加蛋白的溶解性或使蛋白能靶向于所需的细胞内部分。其他融合伴侣包括促进蛋白纯化的亲和性标签。

[0077] 通常可以用标准技术制备融合蛋白。例如,可以分别组装编码所需融合的多肽组分的DNA序列,并将其连入合适的表达载体中。使用或不使用肽连接物将编码一种多肽组分的DNA序列的3'端与编码第二多肽组分的DNA序列的5'端连接,这样序列的读码框是同相的。这允许翻译为同时保留两个组分多肽的生物活性的单一融合蛋白。

[0078] 如果需要,可以用肽连接物序列将第一和第二多肽组分隔开足以确保每种多肽折叠成其二级和三级结构的距离。用本领域内公知的标准技术将这类肽连接物序列并入融合蛋白。可以基于下列因素选择某些肽连接物序列:(1)它们采取柔韧的、伸展的构型的能力;(2)它们不会采取与第一和第二多肽上的功能表位相互作用的二级结构的能力;和(3)可以

与所述多肽功能表位反应的疏水或带电残基的缺乏。优选的肽连接物序列包含Gly、Asn和Ser残基。诸如Thr和Ala的其它接近中性的氨基酸也可以用于连接物序列中。可以有效地用作连接物的氨基酸序列包括公开于Maratea et al., Gene 40:3946(1985); Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:82588262(1986); 美国专利第4,935,233号和第4,751,180号中的那些氨基酸序列。通常,连接物序列的长度可以为1-约50个氨基酸。当第一和第二多肽具有可以用来隔开功能结构域和防止空间干扰的非必需N末端氨基酸区时,不需要连接物序列。

[0079] 将连接的DNA序列可操作地连接于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'。同样,终止翻译所需的终止密码子和转录终止信号位于编码第二多肽的DNA序列的3'。

[0080] 通常,多肽和融合多肽(以及它们的编码多核苷酸)是分离的。“分离的”多肽或多核苷酸是从其原来的环境中移出的多肽或多核苷酸。例如,如果将天然存在的蛋白与天然系统中的部分或所有的共存物质分开,则该天然存在的蛋白是分离的。优选地,这类多肽是至少约90%纯的,更优选为至少约95%纯的和最优选为至少约99%纯的。例如,如果多核苷酸被克隆入不是天然环境的一部分的载体中,则认为所述多核苷酸是分离的。

[0081] 在其他的实施方案中,本发明的GlyRS多肽可以是二聚体的一部分。二聚体可以包括,例如,两个相同GlyRS多肽之间的同二聚体、两个不同GlyRS多肽之间的异二聚体(例如,全长GlyRS多肽和截短的GlyRS多肽或两个不同的截短的GlyRS多肽)、和/或GlyRS多肽和异源多肽之间的异二聚体。单体和/或二聚体可以是可溶的,并且可以被分离为或纯化为同质性。诸如GlyRS多肽和异源多肽之间的异二聚体的某些异二聚体可以是双功能的。

[0082] 在其他的实施方案中,本发明的GlyRS多肽可以是多单元复合物的一部分。本发明的多单元复合物可以包括,例如,至少2、3、4、或5或更多的单体。所述单体和/或多单元复合物可以是可溶的,并且可以被分离为或纯化为同质性。多单元复合物的单体单元彼此之间可以是不同的、同源的、基本上同源的或相同的。然而,本发明的多单元复合物包括至少1个单体,所述单体包含如本发明所述的一种GlyRS多肽或在其他的实施方案中,包含至少两种或更多种如本文所述的GlyRS多肽。

[0083] 共价连接的单体可以是直接(通过键)连接的或间接(例如,通过连接物)连接的。为了直接连接本文的多肽单体,修饰本文的多肽以增强二聚化或多聚化可能是有益的。例如,可以通过一个或多个半胱氨酸的添加或取代来修饰GlyRS多肽的一个或多个氨基酸残基。产生诸如半胱氨酸取代的氨基酸取代或其他修饰来促进连接的方法是本领域技术人员所公知的。

[0084] 如本文所述,本发明的某些实施方案还考虑修饰的GlyRS多肽的用途,包括改善GlyRS所需特性的修饰。本发明GlyRS多肽的示例性修饰包括,但不限于,一个或多个组成氨基酸的化学和/或酶促衍生作用,包括侧链修饰、主链修饰和N末端与C末端修饰,这些修饰包括乙酰化、羟基化、甲基化、酰胺化;和碳水化合物或脂质部分、辅因子等的连接。示例性的修饰还包括GlyRS多肽的聚乙二醇化(参见,例如,Veronese and Harris, Advanced Drug Delivery Reviews(药物递送发展综述)54:453-456,2002,通过引用并入本文)。

[0085] 在某些方面中,化学选择性连接技术可以用于修饰本发明截短的GlyRS多肽,例如通过以位点特异性或受控制的方式连接聚合物。通常,这类技术依赖于通过化学或重组手

段将化学选择性锚合并入蛋白主链,并且随后用携带互补连接物的聚合物进行修饰。因此,可以控制组装过程和产生的蛋白-聚合物缀合物的共价结构,这使得诸如功效和药物代谢动力学特性的药物性质的合理优化成为可能(参见,例如,Kochendoerfer,Current Opinion in Chemical Biology 9:555-560,2005)。

[0086] 多核苷酸组合物

[0087] 本发明还提供了编码本发明GlyRS多肽的分离的多核苷酸,以及包含这些多核苷酸的组合物。

[0088] 如本文所用的术语“DNA”和“多核苷酸”和“核酸”是指从具体物种的总基因组DNA分离出来的DNA分子。因此,编码多肽的DNA片段是指这样的DNA片段,其含有一种或多种编码序列,而基本上从获得所述DNA片段的物种的总基因组DNA分离出来的或纯化出来。术语“DNA片段”和“多核苷酸”包括DNA片段和这些片段的较小片段,并且还包括重组载体,包括例如,质粒、粘粒、噬菌粒、噬菌体、病毒等。

[0089] 如本领域技术人员所理解的,本发明的多核苷酸序列包括基因组序列、基因组外序列和质粒编码的序列以及表达或被改造来表达蛋白、多肽、肽等的较小的工程基因片段。这类片段可以是天然分离的,或人工合成修饰的。

[0090] 如本领域技术人员所公认的,多核苷酸可以是单链的(编码或反义)或双链的,并且可以是DNA(基因组、cDNA或合成物)或RNA分子。其他编码或非编码序列可以,但不需要,存在于本发明的多核苷酸中,并且多核苷酸可以,但不需要,与其他的分子和/或支持物质连接。

[0091] 多核苷酸可以包含天然序列(即,编码GlyRS或其部分的内源序列),或可以包含变体,或该序列的生物学功能等同物。如下面进一步论述,多核苷酸变体可以包含一个或多个取代、添加、缺失和/或插入,优选使得所编码的多肽的所需活性相对于未修饰的多肽没有显著减弱。通常,可以按本文所述来评价对于所编码的多肽的活性的影响。

[0092] 在其他的实施方案中,本发明提供了分离的多核苷酸,其包含与甘氨酸-tRNA合成酶相同或互补的序列的不同长度的连续区段,其中所述分离的多核苷酸编码如本文所述的GlyRS。

[0093] 例如,本发明提供的多核苷酸编码至少约5、10、15、20、25、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450或500或更多个本发明GlyRS多肽的连续氨基酸残基,以及所有的中间长度。应当容易理解,此处的“中间长度”表示所提到的值之间的任何长度,例如101、102、103等;151、152、153等;201、202、203等。

[0094] 在其他的实施方案中,本发明涉及能够在中度严谨条件下与本文提供的多核苷酸序列杂交的多核苷酸,或该多核苷酸的片段,或该多核苷酸的互补序列。杂交技术是分子生物学领域内公知的。为了说明的目的,适于测试本发明的多核苷酸与其他多核苷酸杂交的中度严谨条件包括:在 $5\times$ SSC、0.5%SDS、1.0mM EDTA(pH8.0)的溶液中预先洗涤;在 $5\times$ SSC中、于 50°C - 65°C 杂交过夜;然后,用含有0.1%SDS的 $2\times$ SSC、 $0.5\times$ SSC和 $0.2\times$ SSC中的每一种、于 65°C 洗涤20分钟,洗涤两次。

[0095] 不考虑编码序列自身的长度,本发明的多核苷酸可以与其他的DNA序列组合,所述其他的DNA序列例如启动子、聚腺苷酸化信号、其他的限制性酶切位点、多克隆位点、其他的编码片段等,从而它们的总长度可以有相当大的变化。因此,应当考虑到,可以使用几乎任

何长度的多核苷酸片段,总长度优选地受在计划的重组DNA流程中制备和使用的便利性的限制。

[0096] 此外,本领域技术人员应当理解,由于遗传密码的简并性,有很多核苷酸序列编码如本文所述的多肽。这些多核苷酸中的某些与任何天然基因的核苷酸序列具有低的同源性。虽然如此,本发明特别考虑到由于密码子使用中的差异而不同的多核苷酸,例如,为人和/或灵长类动物密码子选择而优化的多核苷酸。此外,包含本文提供的多核苷酸序列的基因的等位基因包括在本发明范围内。等位基因是由于一个或多个诸如核苷酸的缺失、添加和/或取代的突变而改变的内源基因。所得到的mRNA和蛋白可以,但不需要,具有改变的结构或功能。可以用标准技术鉴定等位基因(例如杂交、扩增和/或数据库序列比较)。

[0097] 可以利用本领域内已知的和可获得的各种公认的技术中的任何一种来制备、操控和/或表达多核苷酸及其融合。例如,编码本发明多肽或其融合蛋白或功能等同物的多核苷酸序列可以用于重组DNA分子中,从而控制GlyRS多肽在合适的宿主细胞中的表达。由于遗传密码内在的简并性,可以产生编码基本上相同的或功能上等同氨基酸序列的其他DNA序列,并且这些序列可以用来克隆和表达给定的多肽。

[0098] 如本领域技术人员所理解地,在一些情况下,产生具有非天然存在的密码子的编码多肽的核苷酸序列是有利的。例如,可以选择特定原核生物或真核生物宿主所偏好的密码子来增加蛋白表达率或产生具有所需特性的重组RNA转录物,所述所需特性例如比天然存在的序列所产生的转录物更长的半寿期。

[0099] 此外,可以使用本领域内公知的方法改造本发明的多核苷酸序列,从而为了多种原因改变多肽编码序列的多核苷酸,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。

[0100] 为了表达所需的多肽,可以将编码多肽的核苷酸序列或功能等同物插入合适的表达载体中,即包含插入的编码序列的转录和翻译所必需的元件的载体。可以用本领域技术人员公知的方法构建含有编码目的多肽的序列和合适的转录和翻译控制元件的表达载体。这些方法包括:体外重组DNA技术、合成技术和体内遗传重组。这些技术描述于Sambrook et al.,*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*(分子克隆,实验手册)(1989)和Ausubel et al.,*Current Protocols in Molecular Biology*(现代分子生物学技术)(1989)中。

[0101] 多种表达载体/宿主系统是已知的,并且可以用来包含和表达多核苷酸序列。这些表达载体/宿主系统包括但不限于,诸如用重组噬菌体、质粒、或粘粒DNA表达载体转化的细菌的微生物;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)感染的昆虫细胞系统;用病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒,CaMV;烟草花叶病毒TMV)或用细菌表达载体(例如,Ti或pBR322质粒)转化的植物细胞系统;或动物细胞系统。

[0102] 表达载体中存在的“控制元件”或“调节序列”是与宿主细胞蛋白相互作用来进行转录和翻译的载体的那些非翻译区(增强子、启动子、5'和3'非翻译区)。这些元件在它们的强度和特异性上可以不同。根据所用的载体系统和宿主,可以使用任何数量的合适的转录和翻译元件,包括组成型启动子和诱导型启动子。例如,当克隆入细菌系统时,可以使用诱导型启动子,诸如PBLUESCRIPT噬菌粒(Stratagene, La Jolla, Calif.)或PSPORT1质粒(Gibco BRL, Gaithersburg, Md.)的杂合lacZ启动子等。在哺乳动物细胞系统中,通常优选来自哺乳动物基因或来自哺乳动物病毒的启动子。如果有必要产生含有编码多肽的序列的

多拷贝的细胞系,则可以优选地使用基于SV40或EBV的、带有合适的选择标记的载体。

[0103] 在细菌系统中,根据表达的多肽的希望用途,可以选择多种表达载体。例如,当大量需要时,可以使用指导容易纯化的融合蛋白的高水平表达的载体。这类载体包括但不限于,诸如BLUESCRIPT(Stratagene)的多功能大肠杆菌克隆和表达载体,其中将编码目的多肽的序列与载体连接,与氨基末端Met和随后的 β -半乳糖苷酶的7个残基在同一读码框中,以便产生杂交蛋白;pIN载体(Van Heeke&Schuster, J. Biol. Chem. 264:5503-5509 (1989))等。pGEX载体(Promega, Madison, Wis.)也可以用来将外源多肽表达为具有谷胱甘肽巯基转移酶(GST)的融合蛋白。通常,这类融合蛋白是可溶的,并且可以通过谷胱甘肽琼脂糖珠的吸附并随后在游离谷胱甘肽的存在下洗脱来容易地从裂解的细胞中纯化。这些系统中产生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,以便任意地从GST部分释放克隆的目的多肽。

[0104] 在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中,可以使用多种含有诸如 α 因子、醇氧化酶和PGH的组成型或诱导型启动子的载体。对于综述而言,可以参见Ausubel et al. (同上)和Grant et al., Methods Enzymol (酶学方法) 153:516-544 (1987)。

[0105] 如果使用植物表达载体,编码多肽的序列的表达可以由多种启动子中的任何一种所驱动。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与来自TMV的 Ω 前导序列联合使用(Takamatsu, EMBO J. 6:307-311 (1987))。可选择地,可以使用诸如RUBISCO的小亚基或热休克启动子的植物启动子(Coruzzi et al., EMBO J. 3:1671-1680 (1984); Broglie et al., Science 224:838-843 (1984); 和Winter et al., Results Probl. Cell Differ. 17:85-105 (1991))。可以通过直接的DNA转化或病原体介导的转染将这些构建体引入植物细胞。这类技术描述于很多可普遍获得的综述中(参见,例如, Hobbs in McGraw Hill, Yearbook of Science and Technology, pp. 191-196 (1992))。

[0106] 还可以用昆虫系统来表达目的多肽。例如,在一种这类系统中,将苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcNPV)被用作载体在草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞或粉纹夜蛾(*Trichoplusia*)幼虫中表达外来基因。可以将编码多肽的序列克隆入病毒的非必需区,例如多角体蛋白基因,并置于多角体蛋白启动子的控制下。编码多肽的序列的成功插入会使多角体蛋白基因失活,并产生缺少衣壳蛋白的重组病毒。随后,可以将所述重组病毒用于感染例如草地贪夜蛾细胞或粉纹夜蛾幼虫,其中目的多肽可以表达(Engelhard et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:3224-3227 (1994))。

[0107] 在哺乳动物宿主细胞中,通常可以使用多种基于病毒的表达系统。例如,如果将腺病毒用作表达载体,则可以将编码目的多肽的序列连入由晚期启动子和三联前导序列组成的腺病毒转录/翻译复合物中。病毒基因组的非必需E1或E3区中的插入可以用来获得能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. 87:3655-3659 (1984))。此外,可以使用诸如鲁斯氏肉瘤病毒(RSV)增强子的转录增强子来增强哺乳动物宿主细胞中的表达。

[0108] 也可以使用特异性起始信号来实现编码目的多肽的序列的更高效的翻译。这些信号包括ATG起始密码子和邻近的序列。如果将编码多肽的序列、其起始密码子和上游序列插入合适的表达载体中,则不需要其他的转录或翻译控制信号。然而,如果仅将编码序列或其一部分插入,则应该提供包括ATG起始密码子在内的外源翻译控制信号。此外,起始密

码子应该在正确的读码框中以确保全部插入物的翻译。外源翻译元件和起始密码子可以是不同来源的,可以是天然的或合成的。可以通过包含适于所用的特定细胞系统的增强子来增强表达效率,诸如文献中描述的那些增强子(Scharf et al., *Results Probl. Cell Differ.* 20:125-162(1994))。

[0109] 此外,可以基于宿主细胞株调节插入的序列的表达或以所需的方式加工所表达的蛋白的能力来选择宿主细胞株。多肽的这些修饰包括但不限于,乙酰化、羧基化、糖基化、磷酸化、脂质化和酰基化。切割蛋白的“前原”形式的翻译后加工也可以用来促进正确的插入、折叠和/或功能。可以选择诸如CHO、HeLa、MDCK、HEK293和W138的、对于这类翻译后活性具有特异性的细胞体系和特征机制的不同宿主细胞,以确保外源蛋白的正确修饰和加工。

[0110] 为了长期、高产量地产生重组蛋白,通常优选稳定的表达。例如,可以用表达载体转化稳定表达目的多核苷酸的细胞系,所述表达载体可以在同一载体或分别的载体上含有病毒复制起点和/或内源表达元件以及选择标记基因。引入载体后,在将细胞转至选择培养基之前,可以允许细胞在富集培养基中生长1-2天。选择标记的目的是赋予对于选择的抗性,并且选择标记的存在允许成功表达引入的序列的细胞的生长和恢复。可以用适合细胞类型的组织培养技术增殖稳定转化的细胞的抗性克隆。

[0111] 可以用任何数量的选择系统来恢复转化的细胞系。这些选择系统包括但不限于,可以分别在 tk^- 细胞或 $aprt^-$ 细胞中使用的单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler et al., *Cell* 11:223-232(1977))和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(Lowy et al., *Cell* 22:817-823(1990))基因。此外,抗代谢物、抗生素或除草剂抗性可以被用作选择的基础;例如,赋予对氨基喋呤的抗性的 $dhfr$ (Wigler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:3567-70(1980));赋予对氨基糖苷类、新霉素和G-418的抗性的 npt (Colbere-Garapin et al., *J. Mol. Biol.* 150:1-14(1981));以及分别赋予对氯磺隆和草胺磷乙酰转移酶的抗性的 als 或 pat (Murry, 同上)。其它选择基因已有描述,例如,允许细胞利用吡啶来代替色氨酸的 $trpB$,或允许细胞利用组胺醇来代替组氨酸的 $hisD$ (Hartman&Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:8047-51(1988))。可视标记已获得普遍应用,这类标记如花青素、 β -葡萄糖苷酸酶及其底物GUS、以及荧光素酶及其底物荧光素,这类标记不仅广泛用于鉴定转化株,而且用于对归因于特异性载体系统的瞬时或稳定蛋白表达进行定量(Rhodes et al., *Methods Mol. Biol.* 55:121-131(1995))。

[0112] 使用对产物特异性的多克隆或单克隆抗体检测和测量多核苷酸编码的产物的表达的多种方法在本领域内是已知的。实例包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射性免疫测定(RIA)和荧光活化细胞分选(FACS)。这些测定和其他测定描述于Hampton et al., *Serological Methods, a Laboratory Manual*(血清学方法:实验手册)(1990)和Maddox et al., *J. Exp. Med.* 158:1211-1216(1983)等中。

[0113] 广泛多种的标记和缀合技术是本领域技术人员已知的并且可以用于各种核酸和氨基酸测定中。产生用于检测多核苷酸相关序列的标记的杂交或PCR探针的手段包括寡核苷酸标记、缺口平移、末端标记或使用标记的核苷酸的PCR扩增。可选择地,可以将序列或其任何部分克隆入载体中,用于产生mRNA探针。这类载体在本领域内是已知的并且是可商业购得的,并且可以通过添加诸如T7、T3或SP6的合适的RNA聚合酶和标记的核苷酸来体外合成RNA探针。可以使用多种可商业购得的试剂盒进行这些步骤。可以使用的合适的报告分子

或标记包括放射性核素、酶、荧光剂、化学发光剂或产色剂以及底物、辅因子、抑制剂、磁性颗粒等。

[0114] 可以在适合蛋白从细胞培养物中表达和回收的条件下,培养用目的多核苷酸序列转化的宿主细胞。根据序列和/或所用的载体,重组细胞产生的蛋白可以是分泌的或包含在细胞内。如本领域技术人员所理解地,可以将包含本发明多核苷酸的表达载体设计为包含指导编码的多肽通过原核生物或真核生物细胞膜的分泌的信号序列。可以用其他的重组构造将编码目的多肽的序列连接至编码促进可溶蛋白纯化的多肽结构域的核苷酸序列。

[0115] 除了重组产生方法,可以通过使用固相技术的直接肽合成来产生本发明的多肽及其片段(Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154 (1963))。可以用手动技术或通过自动化来进行蛋白合成。例如,可以用Applied Biosystems的431A肽合成仪(Perkin Elmer)实现自动化合成。可选择地,可以分别地化学合成不同片段并使用化学方法将片段组合来产生全长分子。

[0116] 按照本发明的另一方面,可以例如使用基因治疗技术将编码本发明多肽的多核苷酸体内递送至个体。基因治疗通常是指将异源核酸转移至患有该治疗所针对的病症或疾病状态的哺乳动物,尤其是人的某些细胞、靶细胞。以下述方式将核酸引入选择的靶细胞,使得异源DNA表达并从而产生所编码的治疗产物。

[0117] 如本文所教导的能用于基因治疗的各种病毒载体包括腺病毒、疱疹病毒、牛痘病毒、腺相关病毒(AAV),或优选地诸如逆转录病毒的RNA病毒。优选地,所述逆转录病毒载体是鼠或鸟逆转录病毒的衍生物或是慢病毒载体。优选的逆转录病毒载体是慢病毒载体。可以插入单一外源基因的逆转录病毒载体的实例包括但不限于:莫洛尼鼠白血病毒(MoMuLV)、哈维鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠乳腺肿瘤病毒(MuMTV)、SIV、BIV、HIV和劳氏肉瘤病毒(RSV)。多种其他的逆转录病毒载体可以并入多个基因。所有的这些载体能转移或并入用于选择性标记的基因,以便鉴定和产生转染的细胞。例如,通过将来源于锌指的DNA结合目的多肽序列以及编码对于特异性靶细胞上的受体的配体的另一基因插入病毒载体,可以使所述载体成为靶标特异性的。例如,通过插入编码蛋白(二聚体)的多核苷酸,可以使逆转录病毒载体成为靶标特异性的。通过使用抗体来靶向于逆转录病毒载体可以实现示例性的靶向。本领域技术人员应当指导或利用有限的实验就能容易确定特异性多核苷酸序列,所述特异性多核苷酸序列能被插入逆转录病毒基因组中,从而允许含有锌指-核苷酸结合蛋白多核苷酸的逆转录病毒载体的靶向特异性递送。

[0118] 由于重组逆转录病毒是缺陷型的,所以它们需要辅助以产生感染性载体颗粒。例如,可以通过使用辅助细胞系来提供该辅助,所述辅助细胞系含有编码在LTR中的调节序列控制下的所有逆转录病毒结构基因的质粒。这些质粒缺少能使包装机制识别用于封装的RNA转录物的核苷酸序列。缺失包装信号的辅助细胞系包括但不限于,例如PSI.2、PA317和PA12。由于未包装基因组,所以这些细胞系产生空的病毒体。如果将逆转录病毒载体引入包装信号完整的这类细胞中,而用其他目的基因替代结构基因,则所述载体可以被包装并可以产生载体病毒体。通过该方法产生的载体病毒体随后可以用来感染诸如NIH 3T3细胞的组织细胞系,以产生大量嵌合逆转录病毒体。

[0119] 也能使用用于基因治疗的“非病毒”递送技术,包括,例如,DNA-配体复合物、腺病毒-配体-DNA复合物、DNA的直接注射、CaPO₄沉淀、基因枪技术、电穿孔、脂质体、脂转染等。

这些方法中的任何一种对于本领域技术人员而言是可广泛获得的,并适于用在本发明中。其他合适的方法对于本领域技术人员而言是可获得的,并且应当理解,可以使用可获得的任何转染方法来实现本发明。通过将分离的DNA分子封装于脂质体颗粒中并将该脂质体颗粒与靶细胞的细胞膜接触,能实现脂转染。脂质体是自我组装的胶体颗粒,其中由诸如磷脂酰丝氨酸或磷脂酰胆碱的两性分子组成的脂质双分子层封装了周围介质的一部分,这样所述脂质双分子层包围了亲水内部。可以这样构建单层或多层脂质体,使得内部含有所需的化学品、药物或如本发明中的分离的DNA分子。

[0120] 结合剂和调节剂

[0121] 按照另一方面,本发明还提供了表现出对于本文公开的GlyRS多核苷酸(包括剪接变体种类)或多肽、或其一部分、变体或衍生物的结合特异性的结合剂和调节剂和使用所述结合剂和调节剂的方法,所述结合剂和调节剂例如抗体及其抗原结合片段、可溶性受体、显性负性多肽、干扰RNA等。优选地,这些结合剂有效地调节一种或多种本发明GlyRS多核苷酸或多肽所介导的非常规活性,并且因此提供了所需的细胞和/或治疗效应。

[0122] 在某些实施方案中,例如,所述结合剂与本发明GlyRS多核苷酸或多肽结合并调节(例如,抑制或增强)所述GlyRS多核苷酸或多肽介导一种或多种目的非常规活性的能力。例如,在一些实施方案中,所述结合剂与GlyRS多核苷酸或多肽结合并调节所述GlyRS多核苷酸或多肽与一种或多种它的细胞结合伴侣结合的能力。在其他的实施方案中,所述结合剂与本发明GlyRS多核苷酸或多肽结合并调节所述GlyRS多核苷酸或多肽的表达和/或活性。因此,这些结合剂通过调节GlyRS多核苷酸或多肽的活性可以用来治疗或预防疾病、病症或由本发明GlyRS多核苷酸或多肽介导的或相关的其他疾病状态。

[0123] 在某些示例性实施方案中,所述结合剂是与本发明的GlyRS多肽特异性结合的抗体或其抗原结合片段。如果抗体或其抗原结合片段与多肽以可检测的水平(例如,在ELISA测定中)反应,并且在相似条件下不与无关的多肽可检测地反应,则认为所述抗体或其抗原结合片段与本发明多肽“特异性结合”、“免疫结合”和/或是“免疫反应性的”。

[0124] 在本文背景下所用的免疫结合等通常是指免疫球蛋白分子和该免疫球蛋白特异性针对的抗原之间发生的非共价型相互作用。可以用相互作用的解离常数(K_d)来表示免疫结合相互作用的强度或亲和力,其中 K_d 越小表示亲和力越高。可以用本领域内公知的方法对所选多肽的免疫结合特性进行定量。一种这类方法需要检测抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速率,其中那些速率取决于复合物伴侣的浓度、相互作用的亲和力和等同影响双向速率的几何参数。因此,可以通过计算浓度和结合与解离的实际速率来确定“结合速率常数”(k_{on})和“解离速率常数”(k_{off})。 k_{off}/k_{on} 的比值可以消去与亲和力无关的所有参数,并且因此等于解离常数 K_d 。通常,参见,Davies et al.(1990)Annual Rev.Biochem.59:439-473。

[0125] 抗体的“抗原结合位点”或“结合部分”是指参与抗原结合的免疫球蛋白分子的部分。重链(“H”)和轻链(“L”)的N末端可变区(“V”)的氨基酸残基形成抗原结合位点。重链和轻链的V区中的三个高度不同的区段被称为“高变区”,其插在称为“框架区”或“FR”的较保守的侧翼区段之间。因此,术语“FR”是指天然见于免疫球蛋白中高变区之间并邻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中彼此相对排布形成抗原结合表面。所述抗原结合表面与结合的抗原的三维表面互补,并且每条

重链和轻链的三个高变区被称为“互补决定区”或“CDR”。

[0126] 例如,结合剂可以是具有或不具有肽组分的核糖体、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。可以通过本领域技术人员已知的任何技术来制备抗体。参见,例如,Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (抗体:实验手册), Cold Spring Harbor Laboratory, 1988。通常,可以通过细胞培养技术产生抗体,包括如本文所述产生单克隆抗体,或通过将抗体基因转染入合适的细菌或哺乳动物细胞宿主,以允许产生重组抗体。在一种技术中,首先将包含多肽的免疫原注射入任何的多种哺乳动物中(例如,小鼠、大鼠、兔、绵羊或山羊)。在该步骤中,未经修饰的本发明的多肽可以作为免疫原。可选择地,尤其是对于相对短的多肽而言,如果将多肽连接至诸如牛血清白蛋白或钥孔虫戚血兰素的载体蛋白,则可以引起较强的免疫应答。优选按照合并了一次或多次加强免疫的预定安排将免疫原注射进动物宿主,并定期地对动物取血。然后,例如,通过使用与适合的固相载体偶联的多肽的亲合层析从该抗血清中纯化对所述多肽特异性的多克隆抗体。

[0127] 例如,使用Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6:511-519, 1976的技术和对其的改进可以制备对目的多肽特异性的单克隆抗体。简单而言,这些方法涉及制备能产生具有所需特异性(即,与目的多肽的反应性)的抗体的永生化细胞系。例如,可以从如上述免疫的动物获得的脾细胞中产生这类细胞系。然后,例如,通过与骨髓瘤细胞融合伴侣,优选与和免疫的动物同基因的骨髓瘤细胞融合伴侣进行融合而使所述脾细胞永生化。可以用多种融合技术。例如,可以用非离子去垢剂使脾细胞和骨髓瘤细胞结合几分钟,然后以低密度接种于支持杂交细胞生长而不支持骨髓瘤细胞生长的选择培养基上。优选的选择技术利用HAT(次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸腺嘧啶脱氧核苷)选择。足够的时间后,通常约1-2周,观察到杂交的集落。选择单一集落,并用它们的培养上清检测与多肽的结合活性。优选具有高反应性和特异性的杂交瘤。

[0128] 可以从生长的杂交瘤集落的上清分离单克隆抗体。此外,可以利用各种技术提高产量,例如将杂交瘤细胞系注射进诸如小鼠的合适的脊椎动物宿主的腹腔中。随后,可以从腹水或血液中收获单克隆抗体。通过诸如层析法、凝胶过滤法、沉淀法和提取法的常规技术可以从抗体中除去污染物。本发明的多肽可以用于例如亲和层析步骤的纯化过程中。

[0129] 多种包含抗原结合位点的、能表现出抗体分子的免疫结合特性的、治疗上有用的分子在本领域内是已知的。蛋白水解酶木瓜蛋白酶优先切割IgG分子,产生数个片段,所述片段中的2个(“F(ab)”片段)各包含共价异二聚体,所述共价异二聚体包含完整的抗原结合位点。胃蛋白酶能切割IgG分子,提供数个片段,所述片段包括含有两个抗原结合位点的“F(ab')₂”片段。通过优先蛋白水解切割IgM可以产生“Fv”片段,但是蛋白水解切割IgG或IgA免疫球蛋白分子很少产生“Fv”片段。然而,使用本领域内已知的重组技术更通常衍生出Fv片段。Fv片段包括非共价V_H:V_L异二聚体,该异二聚体包括保留了天然抗体分子的大部分抗原识别和结合能力的抗原结合位点。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。

[0130] 单链Fv(“sFv”)多肽是从融合基因表达的共价连接的V_H:V_L异二聚体,所述融合基因包括通过肽编码连接物连接的V_H和V_L编码基因。Huston et al. (1988)

Proc.Nat.Acad.Sci.USA 85(16):5879-5883。已有多种方法描述了分辨化学结构,用于将来自抗体V区的天然聚集的但化学分离的轻多肽链和重多肽链转换成sFv分子,所述sFv分子会折叠成基本上相似于抗原结合位点的结构的三维结构。参见,例如,Huston等的美国专利第5,091,513号和第5,132,405号;和Ladner等的美国专利第4,946,778号。

[0131] 每个上述分子包括分别插在重链和轻链FR组之间的重链和轻链CDR组,所述FR组为CDR提供支持并且限定了CDR相对于彼此的空间关系。如本文所用的术语“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,将这些区分别表示为“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”。因此,抗原结合位点包括6个CDR,包含来自每条重链和轻链V区的CDR组。在本文中,包含单一CDR(例如,CDR1、CDR2或CDR3)的多肽被称为“分子识别单元”。多个抗原抗体复合物的晶体分析已经证实,CDR的氨基酸残基与结合的抗原形成广泛接触,其中最广泛的抗原接触是与重链CDR3。因此,所述分子识别单元主要负责抗原结合位点的特异性。

[0132] 如本文所用的术语“FR组”是指为重链或轻链V区的CDR组的CDR提供框架的四个侧翼氨基酸序列。一些FR残基可以接触结合的抗原;然而,FR主要负责将V区折叠为抗原结合位点,尤其是直接邻近CDR的FR残基。在FR中,某些氨基酸残基和某些结构特征是高度保守的。在这点上,所有的V区序列包含约90个氨基酸残基的内部二硫环。当V区折叠成结合位点时,CDR表现为突出的环状基序,该环状基序形成抗原结合表面。普遍公认的是,FR的保守结构区影响CDR环到某些“常规”结构的折叠形状,与具体的CDR氨基酸序列无关。而且,已知某些FR残基参与非共价的结构域间接触,该结构域间接触使抗体重链和轻链的相互作用稳定。

[0133] 很多包含来自非人免疫球蛋白的抗原结合位点的“人源化”抗体分子已有描述,包括以下嵌合抗体:具有与人恒定结构域融合的啮齿动物V区及其相关CDR(Winter et al.(1991)Nature 349:293-299;Lobuglio et al.(1989)Proc.Nat.Acad.Sci.USA 86:4220-4224;Shaw et al.(1987)JImmunol.138:4534-4538;和Brown et al.(1987)Cancer Res.47:3577-3583),在与合适的人抗体恒定结构域融合之前移植进人支持FR中的啮齿动物CDR(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),以及由重组相嵌的(veneered)啮齿动物FR支持的啮齿动物CDR(欧洲专利公开第519,596号,于1992年12月23日公布)。这些“人源化”分子被设计为对于啮齿动物抗体分子的不希望的免疫应答降至最低,该免疫应答限制了那些部分在人接受体中的治疗应用的持续时间和功效。

[0134] 如本文所用的“相嵌的FR”和“重组相嵌的FR”是指用人FR残基选择性地替换来自例如啮齿动物重链或轻链V区的FR残基,目的是提供包含基本上保留了所有天然FR多肽折叠结构的抗原结合位点的异基因分子。相嵌技术基于下述理解,抗原结合位点的配体结合特性主要由抗原结合表面中重链和轻链CDR组的结构和相对排布决定。Davies et al.(1990)Ann.Rev.Biochem.59:439-473。因此,只要仔细保持CDR结构、它们彼此的相互作用和它们与其余的V区结构域的相互作用,就可以在人源化抗体中保留抗原结合特异性。通过使用相嵌技术,用人残基选择性地替代了容易被免疫系统遇到的外部(例如,可接触到溶剂)FR残基,从而提供包含弱免疫原性或基本上无免疫原性相嵌表面的杂合分子。

[0135] 在本发明的另一个实施方案中,可以将本发明的单克隆抗体与一种或多种目的试剂结合。例如,可以将治疗剂直接地或间接地(例如,通过连接物基团)与合适的单克隆抗体

结合(例如,共价键合)。当试剂和抗体中的每一个都具有能与另一个反应的取代基时,试剂和抗体之间的直接反应是可能的。例如,一个上的诸如氨基或巯基的亲核基团能与另一个上的诸如酸酐或酸卤化物的含有羧基的基团反应或与含有良好离去基团(例如,卤化物)的烃基反应。

[0136] 可选择地,通过连接物基团将治疗剂和抗体结合是可取的。连接物基团的功能可以是间隔物来使抗体与试剂保持距离,从而避免结合能力的干扰。连接物基团也可以增加试剂或抗体上的取代基的化学反应性,并因此增强结合效率。化学反应性的增强也可以促进试剂、或试剂上的官能团的效用,否则将无法实现这点。

[0137] 对本领域技术人员显而易见的是,包括同功能的和异功能的在内的多种双功能或多功能试剂(例如描述于Pierce Chemical Co.,Rockford,IL目录中的那些)可以用作连接物基团。例如,可以通过氨基、羧基、巯基或氧化的碳水化合物残基而实现结合。有多个参考文献描述了这类方法,例如,Rodwell等的美国专利第4,671,958号。

[0138] 如果当治疗剂脱离本发明免疫缀合物的抗体部分时,其更有效,则可能需要使用在细胞内化过程中或细胞内化时可切割的连接物基团。多种不同的可切割的连接物基团已有描述。试剂从这些连接物基团的细胞内释放机制包括通过以下的切割:二硫键的还原(例如,Spitler的美国专利第4,489,710号)、光不稳定的键的照射(例如,Senter等的美国专利第4,625,014号)、衍生氨基酸侧链的水解(例如,Kohn等的美国专利第4,638,045号)、血清补体介导的水解(例如,Rodwell等的美国专利第4,671,958号)、和酸催化的水解(例如,Blattler等的美国专利第4,569,789号)。

[0139] 将多于一种的试剂与抗体结合是可取的。在一个实施方案中,多个试剂分子与一个抗体分子结合。在另一个实施方案中,可以将多于一种的试剂与一个抗体结合。不考虑特定实施方案,可以用很多方法制备具有多于一种的试剂的免疫缀合物。例如,可以将多于一种的试剂直接与抗体分子结合,或可以使用提供多个连接位点的连接物。

[0140] 在本发明的其他方面,本发明的调节剂/结合剂可以包含一个或多个对GlyRS多核苷酸特异性的干扰RNA(RNAi)序列。可以将使用干扰RNAi分子的RNA干扰方法用来扰乱诸如GlyRS基因或剪接变体的所需目的基因或多核苷酸的表达,从而实现所需的细胞和/或治疗效应。

[0141] 在具体的实施方案中,干扰RNA是小干扰RNA(siRNA)。siRNA是长度通常为19-30个核苷酸的RNA双螺旋,其与被称为RNAi诱导的沉默复合物(RISC)的胞质多蛋白复合物相关联。装载了siRNA的RISC介导同源mRNA转录物的降解。因此,siRNA能被设计为高特异性地敲除蛋白表达。尽管最初描述的RNAi分子是包含RNA有义链和RNA反义链的RNA:RNA杂合体,但目前已经证实,DNA有义:RNA反义杂合体、RNA有义:DNA反义杂合体和DNA:DNA杂合体能介导RNAi(Lamberton,J.S.and Christian,AT.,(2003)Molecular Biotechnology(分子生物技术)24:111-119)。因此,本发明包括使用含有任何这些不同类型双链分子的RNAi分子。此外,应当理解,可以以多种形式使用RNAi分子并将其引入细胞。因此,如本文所用的RNAi分子包括能诱导细胞中RNAi反应的任何分子和所有分子,包括但不限于,包含两条分别的链(即有义链和反义链)的双链多核苷酸,例如,小干扰RNA(siRNA);包含形成双链区的互补序列发夹环的多核苷酸,例如,小发夹RNA(shRNA)分子和表达一种或多种能单独形成双链多核苷酸或与另一个多核苷酸联合形成双链多核苷酸的多核苷酸的表达载体。

[0142] 按照本领域内已知的方法,能容易地制备特异性靶向于GlyRS多核苷酸的RNAi分子。已经鉴定出有效siRNA分子的结构特性。Elshabir,S.M.et al.(2001)Nature 411:494-498和Elshabir,S.M.et al.(2001),EMBO20:6877-6888。因此,本领域技术人员应当理解,多种不同的siRNA分子可以用来靶向于特定基因或转录物。在某些实施方案中,本发明的siRNA分子通常是双链的并且长度为16-30或18-25个核苷酸,所述长度包括之间的每个整数。在一个实施方案中,siRNA长度约21个核苷酸。在某些实施方案中,siRNA具有0-7个核苷酸的3'悬突(overhang)或0-4个核苷酸的5'悬突。在一个实施方案中,siRNA分子具有2个核苷酸的3'悬突。在一个实施方案中,siRNA长度为21个核苷酸,具有2个核苷酸的3'悬突(即,它们在有义链和反义链之间包含19个核苷酸的互补区)。在某些实施方案中,所述悬突是UU或dTdT 3'悬突。

[0143] 在一个实施方案中,通过扫描靶mRNA转录物序列出现的AA双核苷酸序列来选择siRNA靶位点。每个AA双核苷酸序列与3'邻近的约19个核苷酸的组合是潜在的siRNA靶位点。在一个实施方案中,siRNA靶位点优选不位于5'和3'非翻译区(UTR)或起始密码子附近的区(约75个碱基内)内,因为与调节区结合的蛋白可能干扰siRNP核酸内切酶复合物的结合(Elshabir,S.et al.Nature 411:494-498(2001);Elshabir,S.et al.EMBOJ.20:6877-6888(2001))。此外,可以将潜在靶位点与合适的基因组数据库进行比较,例如www.ncbi.nlm的NCBI服务器上可获得的BLASTN 2.0.5,以及可以将潜在靶位点与和其他排除的编码序列具有显著同源性的潜在靶序列进行比较。

[0144] 在具体的实施方案中,干扰RNA是短发夹RNA。ShRNA包含茎环结构。在某些实施方案中,它们可以含有可变的茎长度,长度通常为19-29个核苷酸或之间的任何数量。在某些实施方案中,发夹含有19-21个核苷酸的茎,而在其他的实施方案中,发夹含有27-29个核苷酸的茎。在某些实施方案中,环长度大小为4-23个核苷酸,但是环的大小可以大于23个核苷酸,而不会显著影响沉默活性。ShRNA分子可以含有错配,例如shRNA茎的双链之间的G-U错配,而不会降低功效。事实上,在某些实施方案中,例如,将shRNA设计为在发夹茎中包括一个或数个G-U配对,从而使发夹在细菌中增殖期间稳定。然而,与靶mRNA(反义链)结合的茎的部分与mRNA之间的互补性通常是需要的,并且即使是该区内的单一碱基对错配都可能废除沉默。5'和3'悬突不是需要的,但它们可以存在。

[0145] 在某些方面中,干扰RNA或siRNA包含一种或多种修饰,例如修饰的核苷或修饰的磷酸连接。在一个实施方案中,siRNA在双链区包含至少一个修饰的核苷酸。在一些实施方案中,修饰的siRNA含有至少一个2' OMe嘌呤或嘧啶核苷酸,例如2' OMe鸟嘌呤核苷、2' OMe尿嘧啶核苷、2' OMe-腺嘌呤核苷和/或2' OMe胞嘧啶核苷酸。适用于本发明的修饰的核苷酸的实例包括但不限于,具有2'-O-甲基(2' OMe)、2'-脱氧-2'-氟代(2' F)、2'-脱氧-5-C-甲基、'-O-(2-甲氧乙基)(MOE)、4'-S代、2'-氨基或2'-C-丙烯基基团的核糖核苷酸。

[0146] 可以存在于本发明干扰RNA中的磷酸主链修饰(即,产生修饰的核苷酸间连接)的非限制性实例包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、甲基膦酸酯、磷酸三酯、吗啉代、酰胺化物、氨基甲酸酯、羧甲基、乙酰酰胺化物(acetamidate)、聚酰胺、磺酸酯、磺酰胺、氨基磺酸酯、甲缩醛、硫甲缩醛和烷基甲硅烷基(alkylsilyl)取代(参见,例如,Hunziker et al, Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties(核酸类似物:合成和特性),于Modern Synthetic Methods(现代合成方法)中,VCH,331-417(1995);Mesmaeker et al,

Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides(寡核苷酸的新的主链替换),于 Carbohydrate Modifications in Antisense Research(反义研究中的碳水化合物修饰)中,ACS,24-39(1994)).这类化学修饰可以发生在siRNA的有义链、反义链或两条链的5'端和3'端。

[0147] 在具体的实施方案中,干扰RNA靶向于细胞中表达的特定GlyRSmRNA。因此,干扰RNA造成与干扰RNA接触的细胞中的靶基因表达的下降。在具体的实施方案中,在足以使RNA干扰发生的条件和接触时间下,与干扰RNA接触的细胞表达的靶基因的量少于未与干扰RNA接触的相同细胞类型所表达的靶基因的量的90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%或10%。可以以蛋白表达或mRNA表达、或微RNA表达来检测表达。用诸如Western印迹或FACS的常规方法可以容易地测定靶基因所表达的蛋白的水平。用诸如RT-PCR的常规方法可以容易地测定靶基因所表达的RNA的水平。

[0148] 本发明中使用的干扰RNA包括与靶GlyRS基因的区对应的区或互补的区。在优选的实施方案中,该互补区是完全互补的,而在其他的实施方案中,它可以包含一个或多个错配。在某些实施方案中,互补区长度为19-25个碱基或长度为19-21个碱基。

[0149] 本发明中的调节剂/结合剂也包括例如显性负性形式的GlyRS多肽,诸如可以与本发明的GlyRS多肽结合并且干扰或对抗一种或多种本发明的GlyRS多肽的非常规活性的突变体和/或截短的GlyRS多肽。

[0150] 制剂和给药

[0151] 通常将本发明的组合物(例如,多肽、多核苷酸、抗体等)配制于药学可接受的或生理可接受的溶液中,用于单独给予细胞、组织或动物或与一种或多种其他治疗形式联合给予细胞、组织或动物。还应当理解,如果需要,本发明的组合物也可以与其他试剂联合给药,例如,其他的蛋白或多肽或各种药物活性剂。对所述组合物中还包括的其他组分几乎没有限制,只要其他试剂对本发明的GlyRS多肽的特性没有不利影响。

[0152] 在本发明的药物组合物中,药学可接受的赋形剂和载体溶液的配制是本领域技术人员所公知的,在多个治疗方案中使用本文所描述的具体组合物的合适的剂量和治疗方案的开发也是本领域技术人员所公知的,包括例如,口服、胃肠外、静脉内、鼻内、颅内以及肌肉内给药和制剂。

[0153] 在某些应用中,可以将本文所公开的药物组合物通过口服给药递送至个体。因此,可以将这些组合物与惰性稀释液或与可吸收可食用的载体一起配制、或可以将它们封装于硬壳或软壳的明胶胶囊中、或可以将它们压成片剂、或可以将它们直接合并到饮食食物中。

[0154] 在某些情况下,例如按照美国专利第5,543,158号;美国专利第5,641,515号和美国专利第5,399,363号(通过引用将以上每个的全部特别并入本文)所述,将本文所公开的药物组合物胃肠外递送、静脉内递送、肌肉内递送、或甚至是腹膜内递送是可取的。可以在适当混合了诸如羟丙纤维素的表面活性剂水中制备作为游离碱或药学可接受的盐的活性化合物的溶液。也可以在甘油、液态聚乙二醇及其混合物中和在油中制备分散液。在通常的保存和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物生长。

[0155] 适于注射使用的药物形式包括无菌水性溶液或分散液和用于无菌可注射溶液或分散液的临时制备无菌粉末(美国专利第5,466,468号,通过引用将其全部特别并入本文)。在任何情况下,所述形式应该是无菌的,并且流动性应达到易于注射的程度。在制备和保存

的条件下,它应该是稳定的,并且应该针对诸如细菌和真菌的微生物的污染作用而进行防腐。所述载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如,丙三醇、丙二醇和液态聚乙二醇等)、以上合适的混合物和/或植物油的溶剂或分散介质。通过以下可以保持合适的流动性:例如,使用诸如卵磷脂的包被、对于分散液保持所需的颗粒大小和使用表面活性剂。各种抗菌剂和抗真菌剂可以促进预防微生物作用,例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫汞撒等。在多数情况下,优选包括等渗剂,例如,糖或氯化钠。通过在组合物中使用诸如单硬脂酸铝和明胶的延迟吸收的试剂可以实现注射组合物的延长吸收。

[0156] 对于水性溶液的胃肠外给药,例如,如果需要,应当使溶液适当缓冲,并且首先用足够的盐溶液或葡萄糖使液体稀释剂成为等渗的。这些特定的水性溶液尤其适于静脉内给药、肌肉内给药、皮下给药和腹膜内给药。在该方面,根据本公开,可以利用的无菌水性介质是本领域技术人员已知的。例如,可将1个剂量溶于1ml等渗NaCl溶液中,并且或者加至1000ml的皮下注射液或者在计划的输注部位进行注射(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明顿制药科学),第15版,pp.1035-1038 and 1570-1580)。根据待治疗个体的疾病状况,剂量必然会发生某些变化。在任何情况下,负责给药的人应当确定对于单独个体的合适剂量。此外,对于人类给药而言,制剂应该满足FDA生物制品标准部门所要求的无菌性、致热原性以及常规安全性和纯度标准。

[0157] 可以通过以下制备无菌的可注射溶液:将合适的溶剂中的所需量的活性化合物与上面列举的各种其他成分合并,如果需要,随后进行过滤灭菌。通常,通过将各种灭菌的活性成分合并入无菌媒介中来制备分散液,所述无菌媒介含有基本的分散介质和来自那些上文列举的所需的成分。对于用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末而言,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,这些技术可以从事先的无菌过滤溶液产生活性成分外加任何其他所需成分的粉末。

[0158] 可以将本文所公开的组合物配制为中性形式或盐形式。药学可接受的盐包括酸加成盐(与蛋白的自由氨基基团形成的),并且所述酸加成盐可以与诸如盐酸或磷酸的无机酸形成或与诸如醋酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等的有机酸形成。与自由羧基基团形成的盐也可以来源于诸如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁的无机碱和诸如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等的有机碱。通过配制后,按照与剂型相容的方式和治疗有效量给予溶液。可以以多种剂型容易地给予制剂,例如可注射溶液、药物释放胶囊等。

[0159] 如本文所用的“载体”包括任何和所有的溶剂、分散介质、媒介、包被、稀释剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、缓冲液、载体溶液、悬浮液、胶体等。用于药学活性物质的这些介质和试剂的用途在本领域内是已知的。除非任何常规介质或试剂与活性成分不相容,否则考虑在治疗组合物中使用它。补充的活性成分也能合并入组合物中。

[0160] 短语“药学可接受的”是指这样的分子实体和组合物,当将其给予人时,不会产生过敏性或相似的不良反应。含有作为活性成分的蛋白的水性组合物的制剂在本领域内是公知的。通常,将这类组合物制备成或为液体溶液或为悬浮液的注射液;还可以制备成在注射前适于溶解或悬浮于液体中的固体形式。也可以将制剂乳化。

[0161] 在某些实施方案中,可以通过鼻内喷雾、吸入和/或其他气溶胶递送媒介递送药物组合物。通过鼻内气溶胶喷雾将基因、多核苷酸和肽组合物直接递送至肺的方法已有描述,例如,美国专利第5,756,353号和美国专利第5,804,212号(通过引用将每一篇的全部特别

并入本文)。同样,使用鼻内微粒树脂(Takenaga et al.,1998)和溶血磷脂酰甘油化合物(美国专利第5,725,871号,通过引用将其全部特别并入本文)的药物递送在制药行业内也是公知的。同样,聚四氟乙烯支持基质的形式的跨粘膜的药物递送描述于美国专利第5,780,045号(通过引用将其全部特别并入本文)。

[0162] 在某些实施方案中,可以通过使用脂质体、纳米胶囊、微颗粒、微球、脂质颗粒、囊泡等进行递送,用于将本发明组合物引入合适的宿主细胞中。特别是,可以配制本发明组合物用于封装在脂质颗粒、脂质体、囊泡、纳米球、纳米颗粒等中的递送。可以用已知的和常规的技术进行这类递送媒介的配制和使用。

[0163] 包含本发明组合物的试剂盒

[0164] 在其他方面,本发明提供了包含一个或多个容器的试剂盒,所述容器填充了如本文所述的本发明的一种或多种多肽、多核苷酸、抗体、多单元复合物、以上的组合物等。所述试剂盒包括如何使用这些组合物的书面说明(例如,调节细胞信号转导、血管生成、癌症、炎性条件等)。

[0165] 本文的试剂盒还可以包括一种或多种其他的治疗剂或待治疗的适应症所适用的或所需要的其他组分。如果需要,其他的治疗剂可以容纳在第二容器中。其他治疗剂的实例包括但不限于,抗肿瘤剂、抗炎剂、抗细菌剂、抗病毒剂、血管生成剂等。

[0166] 本文的试剂盒还可以包括一种或多种注射器或实施计划递送方式所必需或所需要的其他组分(例如,支架、可植入的贮库等)。

[0167] 使用方法

[0168] 另一方面,本发明涉及使用本发明组合物(例如,多核苷酸、多肽等)、或这些组合物的结合剂或其他调节剂(例如,抗体、干扰RNA、反义RNA、显性负性多肽、小分子调节剂等)治疗细胞、组织或个体,从而实现所需的细胞和/或治疗效应的方法。本发明可以调节的细胞或组织优选为哺乳动物细胞或组织,或更优选为人细胞或组织。这些细胞或组织可以是健康状态或疾病状态的细胞或组织。

[0169] 在某些实施方案中,例如,提供了通过将本文所述的GlyRS组合物与细胞接触来调节治疗相关的细胞活性的方法。这些细胞活性可以包括但不限于,细胞代谢、细胞分化、细胞增殖、细胞死亡、细胞运动、细胞迁移、细胞信号转导、细胞因子产生和/或分泌的调节、基因转录、mRNA翻译、细胞阻抑等。在更具体的实施方案中,按照本发明,待调节的细胞活性包括,例如,Akt介导的细胞信号转导、Erk1/2介导的细胞信号转导、GPCR介导的细胞信号转导、内皮细胞成管和细胞结合。在其他具体的实施方案中,细胞活性包括,例如,CD71和/或CD80的调节。在其他具体的实施方案中,细胞活性包括,例如,细胞因子产生和/或释放的调节,其中所述细胞因子选自TNF- α 、IL1- β 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p40、MIP1- α 、MIP-1 β 、GRO- α 、MCP-1和IL-1ra。在其他具体的实施方案中,细胞活性包括,例如,通过调节细胞的葡萄糖、胰高血糖素、丙三醇和/或游离脂肪酸的代谢调节。在其他具体的实施方案中,细胞活性包括,例如,神经形成或神经保护的调节。因此,GlyRS组合物可以用来治疗基本上任何可以获益于一种或多种这些活性的调节的细胞或组织或个体。

[0170] GlyRS组合物还可以用于多种治疗环境中的任何一种,包括例如,肿瘤疾病、免疫系统疾病(例如,自身免疫性疾病和炎症)、感染性疾病、代谢疾病、神经元/神经病学疾病、肌肉/心血管疾病、异常造血作用相关的疾病、异常血管生成相关的疾病、异常细胞存活相

关的疾病等的治疗或预防相关的那些治疗环境。

[0171] 例如,在某些示例性实施方案中,本发明的GlyRS组合物可以用于调节血管生成,例如,通过内皮细胞增殖和/或信号转导的调节。可以使用合适的细胞系(例如,人微脉管内皮肺细胞(HMVEC-L)和人脐带静脉内皮细胞(HUVEC))和使用合适的测定(例如,内皮细胞迁移测定、内皮细胞增殖测定、成管测定、基质胶塞测定等)来监测内皮细胞的增殖和/或信号转导,所述测定中的多数在本领域内是已知的并且是可以获得的。

[0172] 因此,在相关的实施方案中,本发明的组合物可以用来治疗基本上任何可以获益于血管生成调节的细胞或组织或个体。例如,在一些实施方案中,可以将经历或易感于血管生成的细胞或组织或个体(例如,血管生成疾病状态)与本发明合适的组合物接触,从而抑制血管生成疾病状态。在其他的实施方案中,可以将经历或易感于不足的血管生成的细胞或组织(例如,血管生成抑制的疾病状态)与本发明合适的组合物接触,从而干扰血管生成抑制活性和/或促进血管生成。

[0173] 血管生成疾病状态的示例性实例包括但不限于,年龄相关的黄斑部退变(AMD)、癌症(实体的和血液学的)、发育异常(器官发生)、糖尿病致盲、子宫内膜异位、眼部新血管生成、银屑病、风湿性关节炎(RA)和皮肤变色(例如,血管瘤、鲜红斑痣或单纯痣)。抗血管生成疾病状态的实例包括但不限于,心血管疾病、再狭窄、缺血性组织或心力衰竭再灌注后的组织损伤、慢性炎症和伤口愈合。

[0174] 本发明的组合物还可以用作免疫调节剂,用于通过调节直接或间接介导自身免疫性和/或炎症疾病、疾病状态和病症的细胞来治疗抗炎症或促炎症的适应症。可以使用本领域内已知和可获得的任何技术来监测本发明组合物作为免疫调节剂的功效,所述技术包括例如,迁移测定(例如,使用白细胞或淋巴细胞)或细胞活力测定(例如,使用B细胞、T细胞、单核细胞或NK细胞)。

[0175] 可以按照本发明治疗的示例性免疫系统疾病、病症或疾病状态包括但不限于,原发性免疫缺陷、免疫介导的血小板减少症、川崎综合征、骨髓移植(例如,成年人或儿童的新近骨髓移植)、慢性B细胞淋巴细胞性白血病、HIV感染(例如,成年人或儿童的HIV感染)、慢性炎症性脱髓鞘性多神经病、输血后紫癜等。

[0176] 此外,其他的疾病、病症和疾病状态包括格林巴利综合征、贫血症(例如,细小病毒B19相关的贫血症、具有高感染风险的患有稳定多发性骨髓瘤的患者(例如,复发性感染)、自身免疫性溶血性贫血(例如,温型自身免疫性溶血性贫血)、血小板减少症(例如,新生儿血小板减少症)和免疫介导的嗜中性白细胞减少症、移植(例如,巨细胞病毒(CMV)阳性器官的CMV阴性接受体)、低丙球蛋白血症(例如,具有感染或发病风险因素的低丙球蛋白血症新生儿)、癫痫(例如,难治性癫痫)、系统性血管炎综合征、重症肌无力(例如,重症肌无力的代偿失调)、皮炎和多肌炎。

[0177] 其他的自身免疫性疾病、病症和疾病状态包括但不限于,自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性新生儿血小板减少症、特发性血小板减少性紫癜、自身免疫性血细胞减少、溶血性贫血、抗磷脂综合征、皮炎、变态反应性脑脊髓炎、心肌炎、复发性多软骨炎、风湿性心脏病、肾小球性肾炎(例如,IgA肾病)、多发性硬化、神经炎、葡萄膜炎性眼炎、多内分泌腺病、紫癜(例如,过敏性紫癜(Henloch-Schoenlein purpura))、莱特尔氏病、僵人综合征、自身免疫性肺部炎症、吉兰-巴雷综合征、胰岛素依赖性糖尿病和自身免疫炎症性眼病。

[0178] 其他的自身免疫性疾病、病症和疾病状态包括但不限于,自身免疫性甲状腺炎;甲状腺机能减退,包括桥本氏甲状腺炎和特征例如为细胞介导和体液甲状腺细胞毒性的甲状腺炎;SLE(其特征通常为例如循环和局部产生的免疫复合物);库德帕斯彻氏综合征(其特征通常为例如抗基底膜抗体);天疱疮(其特征通常为例如表皮棘层松解抗体);受体自身免疫,例如,葛瑞夫兹氏病(其特征通常为例如促甲状腺激素受体抗体)、重症肌无力(其特征通常为例如乙酰胆碱受体抗体);胰岛素抗性(其特征通常为例如胰岛素受体抗体);自身免疫性溶血性贫血(其特征通常为例如抗体致敏的红细胞的吞噬作用);和自身免疫性血小板减少性紫癜(其特征通常为例如抗体致敏的血小板的吞噬作用)。

[0179] 其他的自身免疫性疾病、病症和疾病状态包括但不限于,风湿性关节炎(其特征通常为例如关节中的免疫复合物);伴随抗胶原蛋白抗体的硬皮病(其特征通常为例如核仁和其他的核抗体);混合性结缔组织病(其特征通常为例如诸如核糖核蛋白的可提取性核抗原的抗体);多炎症/皮炎(其特征通常为例如非组蛋白抗核抗体);恶性贫血(其特征通常为例如抗壁细胞、抗微粒体和抗内因子抗体);特发性阿狄森病(其特征通常为例如体液和细胞介导的肾上腺细胞毒性);不育症(其特征通常为例如antispennatozoal抗体);肾小球性肾炎(其特征通常为例如小球基底膜抗体或免疫复合物);原发性肾小球性肾炎、IgA肾病;大疱性类天疱疮(其特征通常为例如基底膜中的IgG和补体);舍格伦综合征(其特征通常为例如多组织抗体和/或特异性非组蛋白抗核抗体(SS-B));糖尿病(其特征通常为例如细胞介导的和体液胰岛细胞抗体);和肾上腺素抗药性,包括伴有哮喘或囊性纤维化的肾上腺素抗药性(其特征通常为例如 β 肾上腺素受体抗体)。

[0180] 其他的自身免疫性疾病、病症和疾病状态包括但不限于,慢性活动型肝炎(其特征通常为例如平滑肌抗体);原发性胆汁性肝硬化(其特征通常为例如抗线粒体抗体);其他的内分泌腺衰竭(其特征通常为例如部分病例中的特异性组织抗体);白癜风(其特征通常为例如抗黑色素细胞抗体);脉管炎(其特征通常为例如血管壁中的免疫球蛋白和补体和/或低血清补体);心肌梗塞后疾病状态(其特征通常为例如抗心肌抗体);心切开术综合征(其特征通常为例如抗心肌抗体);风疹(其特征通常为例如对IgE的IgG和IgM抗体);特应性皮炎(其特征通常为例如抗IgE的IgG和IgM抗体);哮喘(其特征通常为例如对IgE的IgG和IgM抗体);炎性肌病;和其他炎性病症、肉芽肿性病症、退行性病症和萎缩性病症。

[0181] 在其他的实施方案中,本发明的GlyRS组合物可以用于调节细胞增殖和/或存活,并且因此,用于治疗或预防特征为细胞增殖和/或存活异常的疾病、病症或疾病状态。例如,在某些实施方案中,GlyRS组合物可以用于调节凋亡和/或治疗异常凋亡相关的疾病或疾病状态。凋亡是用于描述被称为程序性细胞死亡的细胞信号转导级联的术语。对于诱导凋亡的分子(例如癌症),以及抑制凋亡的分子(例如中风、心肌梗塞、脓毒症等)存在各种治疗指征。可以使用本领域内已知的和可获得的任何技术监测凋亡,包括例如,检测DNA断裂、膜不对称性改变、凋亡半胱天冬酶活化和/或细胞色素C和AIF释放的分析。

[0182] 增加的细胞存活或抑制凋亡相关的示例性疾病包括但不限于,癌症(诸如滤泡性淋巴瘤、癌和激素依赖性肿瘤,包括但不限于结肠癌、心脏肿瘤、胰腺癌、黑素瘤、视网膜母细胞瘤、成胶质细胞瘤、肺癌、肠癌、睾丸癌、胃癌、成神经细胞瘤、黏液瘤、肌瘤、淋巴瘤、内皮瘤、成骨细胞瘤、破骨细胞瘤、骨肉瘤、软骨肉瘤、腺瘤、乳腺癌、前列腺癌、卡波济氏肉瘤和卵巢癌);自身免疫性病症(诸如,多发性硬化、舍格伦综合征、葛瑞夫兹氏病、桥本氏甲状

腺炎、自身免疫性糖尿病、胆汁性肝硬化、贝切特氏病、克罗恩氏病、多肌炎、系统性红斑狼疮和免疫相关的肾小球性肾炎、自身免疫性胃炎、自身免疫性血小板减少性紫癜和风湿性关节炎),病毒感染(诸如疱疹病毒、痘病毒和腺病毒)、炎症、移植物抗宿主病(急性和/或慢性)、急性移植排斥和慢性移植排斥。

[0183] 增加的细胞存活相关的示例性疾病或疾病状态包括但不限于,恶性肿瘤和相关病症的发展和/或转移,诸如白血病(包括急性白血病(例如,急性淋巴细胞性白血病;包括髓细胞性白血病、早幼粒细胞性白血病、骨髓单核细胞性白血病、单核细胞性白血病和红白血病在内的急性髓细胞性白血病)和慢性白血病(例如,慢性髓细胞性(粒细胞性)白血病和慢性淋巴细胞性白血病))、骨髓增生异常综合征、真性红细胞增多症、淋巴瘤(例如,何杰金氏病和非何杰金氏病)、多发性骨髓瘤、瓦氏巨球蛋白血症、重链病、和实体肿瘤,所述实体肿瘤包括但不限于,肉瘤和癌,例如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺瘤、汗腺瘤、皮脂腺瘤、乳头状癌、乳头状腺瘤、囊腺瘤、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞瘤、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、威姆氏瘤、宫颈癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑素瘤、成神经细胞瘤和视网膜母细胞瘤。

[0184] 增加的凋亡相关的示例性疾病包括但不限于,AIDS(诸如HIV诱导的肾病和HIV脑炎)、神经退行性病症(诸如阿耳茨海默氏病、帕金森氏症、肌萎缩性侧束硬化症、色素性视网膜炎、小脑退变和脑瘤或与之之前相关疾病),自身免疫性病症(例如多发性硬化、舍格伦综合征、葛瑞夫兹氏病、桥本氏甲状腺炎、自身免疫性糖尿病、胆汁性肝硬化、贝切特氏病、克罗恩氏病、多肌炎、系统性红斑狼疮、免疫相关的肾小球性肾炎、自身免疫性胃炎、血小板减少性紫癜、风湿性关节炎)、骨髓增生异常综合征(例如再生障碍性贫血)、移植物抗宿主病(急性和/或慢性)、缺血性损伤(诸如由心肌梗塞、中风和再灌注性损伤引起的损伤)、肝损伤或疾病(例如,肝炎相关的肝损伤、肝硬化、缺血/再灌注性损伤、胆汁淤积症(胆管损伤)和肝癌)、毒素诱导的肝疾病(诸如由酒精引起)、脓毒性休克、溃疡性结肠炎、恶病质和厌食症。

[0185] 在其他的实施方案中,本发明组合物可以用于神经元/神经病学疾病或病症的治疗中,其示例性实例包括,帕金森氏症、阿耳茨海默氏病、皮克氏病、克罗伊茨费尔特雅各布氏病、亨廷顿氏舞蹈病、交叉性肢体瘫痪、肌萎缩性侧束硬化症、共济失调、大脑性瘫痪、慢性疲劳综合征、慢性疼痛综合征、先天性神经异常、脑神经疾病、谵妄、痴呆、脱髓鞘病、家族性自主神经异常、癫痫、头痛、亨廷顿氏舞蹈病、脑积水、脑膜炎、运动障碍、肌病、神经系统瘤、神经皮肤综合征、神经退行性疾病、神经毒性综合征、眼球运动障碍、周围神经系统病症、垂体病症、脑穿通畸形、瑞特综合征、睡眠障碍、脊髓病症、中风、西登哈姆氏舞蹈病、图雷特综合征、神经系统创伤和损伤等。

[0186] 此外,其他的实施方案涉及使用本发明组合物治疗代谢性病症,所述代谢性病症例如糖尿病、肥胖症、胆固醇水平调节、肾上腺脑白质营养不良、克利伯病(球形细胞脑白质营养不良)、异染性脑白质营养不良、亚历山大病、Canavan氏病(海绵样脑白质营养不良)、

佩利措伊斯-梅茨巴赫病、科凯恩综合征、贺勒氏疾病、勒韦氏综合征、利氏病、威尔逊氏病、哈勒沃登-施帕茨病、泰-萨克斯病等。可以使用本领域内已知的和可获得的任何技术来监测本发明组合物在调节代谢过程中的功效,包括例如,检测脂肪细胞脂肪生成或脂肪细胞脂解的测定。

[0187] 在本发明更具体的实施方案中,本发明的GlyRS组合物用来调节G蛋白偶联受体(GPCR)。GPCR受体家族由基于与该受体偶联的G蛋白的三个主要组构成(Gs、Gi和Gq)。Gs组与环AMP(cAMP)的腺苷酸环化酶产生的活化偶联,Gi组与cAMP的腺苷酸环化酶产生的抑制偶联。因此,监测用本发明GlyRS组合物处理的细胞中cAMP的积累的分析可以用来监测G蛋白受体的2个主要组的活化。

[0188] 在其他具体的实施方案中,本发明的GlyRS组合物可以用来调节细胞信号转导,例如,通过激酶途径(例如,Akt、Erk1/2等)。可以用任何已知的分析监测细胞信号转导。例如,可以通过多种靶蛋白的改变的磷酸化模式来监测总体细胞信号转导事件的发生。因此,响应于细胞的GlyRS片段处理的细胞信号转导活性的检测可以作为不同生物效应的指示。可以这样选择用于该分析的靶蛋白,使其包括主要细胞信号转导级联的关键组分,从而提供细胞信号转导情况及其治疗相关性的广泛描述。通常,这类分析涉及用GlyRS多肽处理细胞,随后是使用特异性检测靶蛋白的磷酸化(活化)形式的抗体的免疫检测。

[0189] 用来监测治疗相关性细胞信号转导事件的示例性靶蛋白可以包括但不限于:p38MAPK(促分裂原活化蛋白激酶,其由细胞应激和炎性细胞因子激活,参与细胞分化和凋亡);SAPK/JNK(应激激活的蛋白激酶/Jun氨基末端激酶,其由细胞应激和炎性细胞因子激活);Erk1/2、p44/42MAPK(促分裂原活化蛋白激酶Erk1和Erk2,其由广泛的细胞外信号激活,参与细胞生长和分化的调节);和Akt(由胰岛素和各种生长或存活因子激活,参与凋亡的抑制、糖原合成调节、细胞周期调节和细胞生长)。也可以监测酪氨酸残基的总体磷酸化,作为磷酸化介导的细胞信号转导改变的一般指示。

[0190] 当然,应当理解,也可以分析诸如细胞粘附分子(例如,钙粘蛋白、整联蛋白、闭合蛋白、连环蛋白、选择蛋白等)和/或离子通道蛋白的其他蛋白种类,用于监测本发明组合物调节的细胞事件或活性。

[0191] 通过引用将本说明书所引用的所有出版物和专利申请并入本文,如同特别和单独指出通过引用并入每一个单独的出版物或专利申请。

[0192] 尽管出于清楚理解的目的,以说明和举例的方式详细地描述了上述发明,但是对于本领域技术人员是显而易见的是,根据本发明的教导,在不脱离附加的权利要求的实质和范围的情况下可以进行某些改变和修改。提供下述实施例仅为说明而并非限制。本领域技术人员会容易意识到,可以改变和修改多种非关键参数而产生本质上相似的结果。

实施例

[0193] 实施例1:人甘氨酸-tRNA合成酶(GlyRS)片段的产生

[0194] 表达具有如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的全长重组人GlyRS,并使用镍IMAC层析从大肠杆菌中纯化所述全长重组人GlyRS。为了通过受控制的蛋白水解产生GlyRS片段,用167nM人嗜中性弹性蛋白酶处理所述全长蛋白30分钟,然后通过SDS-PAGE(图1A-D)分离片段。

[0195] 实施例2:GlyRS片段激活内皮细胞中的AKT和Gi-PCR

[0196] 通过将25ng嗜中性弹性蛋白酶添加至4μg全长重组GlyRS中并37℃下持续30分钟来产生GlyRS片段库。通过添加超过蛋白酶10倍的量的α1抗胰蛋白酶(丝氨酸蛋白酶抑制蛋白A1)来终止反应。用50nM未切割的或用嗜中性弹性蛋白酶切割的全长GlyRS蛋白的库来处理牛大动脉内皮细胞(bAEC)。将细胞与GlyRS片段孵育10分钟,收获细胞并用抗体进行western印迹,该抗体仅特异性识别信号分子Akt的磷酸化(活化)形式。该处理通过磷酸化作用导致Akt强的可重复的活化(图2A)。由于Akt在抑制凋亡、调节糖原合成、细胞周期调节和细胞生长中的作用,所以该效应是有意义的。

[0197] 还评估了通过嗜中性弹性蛋白酶切割产生的GlyRS片段库激活内皮细胞上G蛋白偶联受体的能力。GPCR受体家族由基于与该受体偶联的G蛋白的三个主要组构成(Gs、Gi和Gq)。Gs组与环AMP(cAMP)的腺苷酸环化酶产生的活化偶联,Gi组与cAMP的腺苷酸环化酶产生的抑制偶联。因此,评估了响应于GlyRS片段处理的内皮细胞中cAMP的累积(Gs-GPCR信号转导),以及所述片段抑制福斯高林诱导的cAMP增加的能力(Gi-GPCR)。用25和100nM切割的GlyRS片段处理内皮细胞后,与超出单独PBS的用25和100nM未切割的GlyRS处理(约10%)相比,观察到对福斯高林刺激的cAMP产生的抑制的显著增加(图2B,分别为约35%和约40%),这表明Gi-GPCR的活化。用未切割的或切割的GlyRS处理内皮细胞时,不存在cAMP产生的刺激。

[0198] 实施例3:GlyRS片段激活单核细胞中的ERK1/2(p44/42MAPK)信号转导

[0199] 通过将25ng嗜中性弹性蛋白酶添加至4μg全长重组GlyRS中并于37℃下持续30分钟来产生GlyRS片段库。通过添加超过蛋白酶10倍的量的α1抗胰蛋白酶(丝氨酸蛋白酶抑制蛋白A1)来终止反应。用50nM未切割的或用嗜中性弹性蛋白酶切割的全长GlyRS蛋白的库处理单核细胞(THP-1)。将细胞与GlyRS片段孵育0.5、2、5、10、30和60分钟、收获细胞并用抗体进行western印迹,该抗体仅特异性识别信号分子Erk1/2(促分裂原活化蛋白激酶Erk1和Erk2)的磷酸化(活化)形式。该处理通过磷酸化作用导致Erk1/2强的可重复的活化(图3),所述活化在处理2分钟后最强。由于Erk1/2可被多种细胞外信号激活并且其在细胞生长和分化的调节中起重要作用,所以该效应是有意义的。

[0200] 实施例4:嗜中性弹性蛋白酶在GlyRS上的切割位点的鉴定

[0201] 用LC/MS/MS分析通过嗜中性弹性蛋白酶切割所产生的片段(图1D)以确定每个片段的准确的量。此外,从SDS-PAGE凝胶切下单独片段并进行凝胶内胰蛋白酶消化,随后用LC/MS/MS分析,从而鉴定片段产生自全长蛋白的哪个部分并鉴定归因于嗜中性弹性蛋白酶的非胰蛋白酶切割位点。

[0202] 这些肽边界的特征总结于表1;加粗的残基是非胰蛋白酶切割位点,这表明已经鉴定出所述片段的弹性蛋白酶的精确切割位点(从而得到精确的N末端或C末端)。

[0203] 表1-GlyRS肽边界

[0204]

	总量(Da)	使用的蛋白酶	N 末端边界	C 末端边界	发现的非胰蛋白酶肽
1	71384	无蛋白酶	A57	E685	
2	50782	无蛋白酶	P239	E685	PGYLRPETAQGIFLNFK (SEQ ID NO: 3)
3	53406	弹性蛋白酶	T214	E685	TGNDLSPPVSFNLMFK (SEQ ID NO: 4)
4	41000-43000	弹性蛋白酶	F311-L338	E685	
5	28096	弹性蛋白酶	N439	E685	439NVVQFEPSK (SEQ ID NO: 5)
6	25328	弹性蛋白酶	T214	V438	TGNDLSPPVSFNLMFK (SEQ ID NO: 4) 439NVVQFEPSK (SEQ ID NO: 5)
7	22398	弹性蛋白酶	T214	R420	TGNDLSPPVSFNLMFK (SEQ ID NO: 4)
8	19783	弹性蛋白酶	L511	E685	LYVEEVVPPNVIEPSFGLGR (SEQ ID NO: 6)
9		弹性蛋白酶	T214	325-338	TGNDLSPPVSFNLMFK (SEQ ID NO: 4)
10	4841	弹性蛋白酶	A85	T127	AIYGGVSGLYDFGPVGCALK (SEQ ID NO: 7) QHFIQEEQILEIDCT (SEQ ID NO: 8)
11	3675	弹性蛋白酶	R25	I56	

[0205] 图4A描述了鉴定GlyRS肽边界的以上过程的概述。图4B表示全长人GlyRS二聚体的晶体结构中的GlyRS片段G6的结构图示,其对应于氨基酸214-438。

[0206] 实施例5:GlyRS片段G6与内皮细胞结合

[0207] 全长GlyRS和GlyRS片段被用于bAEC细胞的结合测定中。将细胞以30,000细胞/孔分布于96孔板,过夜。第二天,弃去培养基并将50 μ l/孔的Z-Fix添加至每孔。于室温下孵育细胞15分钟。将孔吸干并用1 $\times$ PBST洗涤1次。于室温下,用50 μ l/孔的1%BSA/PBS封闭细胞1-2小时。从细胞移去封闭液并将在1%BSA/PBS中稀释的蛋白样品添加至孔中。样品于室温下孵育1小时。用1 $\times$ PBST将孔洗涤1次。以50 μ l/孔添加以1:500稀释于1%BSA/PBS中的抗6 $\times$ His HRP(R&D#MAB050H)。于室温下孵育抗体,持续30分钟。用1 $\times$ PBST将孔洗涤3次。用50 μ l/孔的1:1稀释的TMB溶液(Thermo#34021)检测蛋白结合。通过添加50 μ l/孔的2M硫酸终止该反应并在酶标仪上于405nm下读吸收值。

[0208] 如图5所示,该研究的结果表明:对应于氨基酸214-438的GlyRS片段G6与内皮细胞结合。

[0209] 实施例6

[0210] A.GlyRS片段G6迁移THP-1单核细胞并且被百日咳毒素抑制

[0211] 在完全培养基中以6 $\times 10^5$ 细胞/孔培养THP-1单核细胞。用无血清培养基洗涤细胞

并将细胞与终浓度为2 μ g/ml的钙黄绿素AM(1mg/ml)孵育。将细胞放回培养箱持续30分钟。再次洗涤细胞并将细胞以6 $\times 10^6$ 细胞/ml的浓度接种于培养皿的上室。将对照趋化因子以及片段G6(200nM)添加至下室,持续80分钟至2小时。通过上下吹打从下室收集细胞。在酶标仪上于Ex485/Em538读取荧光值,530nm截留(cutoff)。

[0212] 如图6所示,本研究的结果表明:G6影响单核细胞迁移。

[0213] B.GlyRS片段G6通过选择趋化因子受体进行信号转导。

[0214] 用PathHunter β -Arrestin测定(DiscoverX Corporation)进行趋化因子受体筛查,该测定使用称为互补的技术以同质、非成像分析模式监测GPCR的活化。该技术利用酶片段互补(EFC)测定,用 β -半乳糖苷酶(β -Gal)作为功能报告蛋白。将酶分为在细胞中表达为融合蛋白的两个互补部分。将酶受体(Enzyme Acceptor)(EA)与 β -Arrestin融合并将ProLink供体肽与目的GPCR融合。通过GPCR刺激, β -Arrestin被招募至脱敏作用的受体,将 β -Gal的两个片段带到一起并允许互补发生。该过程产生活性酶,该活性酶可以转化化学发光底物并产生了标准酶标仪可检测的输出信号。按照标准操作,在T25瓶中从冻存液扩增PathHunter细胞系并且在测定前,将细胞系保持在选择生长培养基中。一旦证实细胞健康并正常生长,用无胰蛋白酶离缓冲液从瓶中传代细胞并将细胞接种于白色壁透明底的384孔微板中,用于片段G6分析。为了分析,以5000细胞/孔的密度、20 μ l的总体积接种细胞并且在添加片段G6前,允许细胞贴壁和恢复过夜。在500nM片段G6的存在下,将细胞于37 $^{\circ}$ C孵育90分钟。以500nM的终浓度测试了15种趋化因子受体细胞系。对照孔包含1%介质,所述介质由50%丙三醇、2mM DTT、0.5 $\times$ PBS组成。

[0215] 如图6(内插图)所示,该研究的结果表明GlyRS片段G6通过选择趋化因子受体进行信号转导。

[0216] 实施例7:片段G6影响巨核细胞祖细胞的集落形成

[0217] 该研究评估了片段G6(500nM)对人巨核细胞祖细胞增殖的影响。在补充了专有最佳浓度的细胞因子的、基于胶原蛋白的无血清培养基MegaCult-**C**®4950中评估巨核细胞的产克隆祖细胞(CFU-Mk)谱系。将正常人骨髓低密度细胞(Lonza货号#07B21195)保存于-152 $^{\circ}$ C,直至测定需要。在实验当天,将细胞于37 $^{\circ}$ C快速解冻,将小瓶的内容物稀释于含2%胎牛血清(FBS)的10ml Iscove改良的Dulbecco培养基(IMDM)中并且通过离心进行洗涤(室温,1200rpm持续10分钟)。弃去上清,并将细胞团重悬于已知体积的含2%FBS的IMDM中。将片段G6添加至补充了专有最佳浓度的细胞因子rhTpo、rhIL-3和rhIL-6的、基于胶原蛋白的无血清培养基MegaCult-**C**®4950的管中。还准备了缓冲液对照培养物(不含受试蛋白,但含相同浓度的透析过的50%丙三醇/0.5 $\times$ PBS/2mM DTT缓冲液)。然后,将骨髓细胞添加至每管培养基,终浓度为1 $\times 10^5$ 细胞/载玻片。然后,添加牛胶原蛋白,将管涡旋振荡,并将内容物一式三份分配在双室载玻片中。将所有的培养物于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下孵育10-12天。孵育后,在将载玻片脱水和固定之前,在显微镜下评估培养物的集落形成。使用抗体染色方法检测GPIIb/IIIb(CD41)表达,用碱性磷酸酶检测系统对载玻片上的集落进行染色。对集落数进行评分和评估。基于大小和形态,将集落分成下述类别:小CFU-Mk(2-20)、中等CFU-Mk(21-49)、大CFU-Mk(>50)。

[0218] 图7A表示CD41⁺集落的代表性染色。图7B表示对小集落、中等集落和大集落的定量结果。该研究的结果表明:GlyRS片段G6影响巨噬细胞祖细胞的集落形成。

[0219] 实施例8:片段G6和G6-3活化单核细胞

[0220] A.GlyRS片段诱导单核细胞中CD71标记上调

[0221] 从正常血液供体分离外周血单核细胞(PBMC)。用200nM剂量的GlyRS片段G6-3(由残基367-438组成)处理 1.5×10^6 PBMC 24小时。用 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的植物凝集素植物血球凝集素(PHA)和 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 作为阳性对照的蛋白毒素葡萄球菌肠毒素B(SEB)处理PBMC。如图8所示,用来自Becton-Dickinson的抗CD71-FITC抗体染色并通过流式细胞仪分析后,在G6-3处理的单核细胞中可以看见CD71增殖标记的上调。在相同样品的门内的淋巴细胞群体中,未观察到CD71上调的显著增加。

[0222] 因此,我们证实:G6-3具有激活PBMC混合物中的单核细胞的细胞类型特异性能力。

[0223] B.GlyR片段诱导单核细胞中CD80标记上调

[0224] 从正常血液供体分离外周血单核细胞(PBMC)。用200nM剂量的GlyRS片段G6(由残基214-438组成)和G6-3(367-438)处理 1.5×10^6 PBMC 24小时。用 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的植物凝集素植物血球凝集素(PHA)和 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 作为阳性对照的蛋白毒素葡萄球菌肠毒素B(SEB)处理PBMC。如图9所示,用来自Becton-Dickinson的抗CD80-FITC抗体染色并通过流式细胞仪分析后,在G6-3处理的单核细胞中可以看见CD80活化标记的上调。在相同样品的门内的淋巴细胞群体中,未观察到CD80上调的显著增加。

[0225] 本研究的结果表明:两个GlyRS片段G6和G6-3以细胞类型特异性的方式活化PBMC混合物中的单核细胞。

[0226] 实施例9:全长GlyRS和GlyRS片段G6诱导PBMC的细胞因子分泌

[0227] 将全长GlyRS(100nM)或GlyRS片段G6(残基214-438)(100nM)与 1×10^6 外周血单核细胞(PBMC)孵育4小时。孵育4小时后,收获上清并将在液氮中快速冷冻。然后,通过多元细胞因子分析(MD Biosciences;St.Paul,MN)分析样品。检测上清的27种不同的细胞因子,并按照与缓冲液处理的PBMC上清相比的倍数改变来绘图。误差棒代表2次生物学重复。如图10所示,全长GlyRS和G6片段都表现出高于PBS处理的细胞的对多种细胞因子的强刺激(例如,TNF- α 、IL1- β 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p40、MIP1- α 、MIP-1 β 、GRO- α 、MCP-1和IL-1ra)。

[0228] 该研究的结果表明:本发明的GlyRS多肽可以诱导治疗相关的多种细胞因子的分泌。

[0229] 实施例10:GlyRS片段G6和G6-3诱导RAW264.7小鼠白血病巨噬细胞的迁移

[0230] 为了评价体外细胞迁移,用含 $0.5\text{mg}/\text{ml}$ 明胶的PBS包被具有聚碳酸酯膜($5\mu\text{m}$ 孔径, Costar)的24孔Transwell小室并使其风干。用新鲜的DMEM将分离的RAW264.7细胞(小鼠单核细胞/巨噬细胞细胞系)洗涤1次并以 2×10^7 细胞/ ml 悬浮于 0.1% BSA/DMEM中。如图11所标明,用 0.1% BSA/DMEM将GlyRS片段稀释为不同的浓度。将RAW细胞以 2×10^6 细胞/ $100\mu\text{l}$ /孔置于上室中。将GlyRS片段以 $500\mu\text{l}$ /孔添加于下室中。 37°C 下迁移24小时后,将钙黄绿素AM(Invitrogen)添加至下室作为细胞指示物,终浓度为 $8\mu\text{M}$ 。30分钟后,用棉签从Transwell膜的上表面移除未迁移的细胞。在荧光显微镜的高倍视野下,对膜的下表面上的迁移细胞进行计数。

[0231] 如图11所示,该研究结果表明:G6和G6-3可以诱导巨噬细胞迁移。

[0232] 实施例11:GlyRS片段G6诱导HL-60早幼粒细胞性白血病细胞的迁移

[0233] 用 0.1% BSA-RPMI将HL60细胞(人早幼粒细胞性白血病细胞系)洗涤2次。添加

0.1%BSA-RPMI中的8 μ M钙黄绿素AM(Invitrogen),于37°C孵育HL60细胞3小时。再一次洗涤后,将细胞以 1×10^7 细胞/ml悬于0.1%BSA-RPMI中。如图11所标明,用0.1%BSA-RPMI将GRS或其片段稀释成不同浓度。将HL60细胞以 1×10^6 细胞/100 μ l/孔置于具有聚碳酸酯膜(5 μ m孔径, Costar)的Transwell可透过支持物的上室中。将GRS或片段以500 μ l/孔添加于下室中。37°C下迁移30分钟后,通过在Ex485/Em538下读取荧光值来测定下室中迁移的细胞。

[0234] 如图12所示,该研究结果表明:G6可以诱导早幼粒细胞性白血病细胞迁移。

[0235] 实施例12:全长GlyRS和片段从RAW264.7小鼠白血病巨噬细胞的分泌

[0236] A. 全长GlyRS从RAW263.7细胞的内源性分泌

[0237] RAW细胞(小鼠单核细胞/巨噬细胞细胞系)生长于6孔组织培养皿中,直至汇合。用PBS洗涤2次后,将细胞在单独的无血清DMEM(2ml/瓶)中或补充了TNF α 或IFN- γ 的无血清DMEM中孵育48小时。收集条件培养基并于4°C下、以20,000 $\times$ G离心30分钟,去除细胞碎片。将上清与10%浓度的TCA沉淀20分钟。丙酮洗涤后,将蛋白团溶解于SDS样品缓冲液中用于SDS-PAGE。用抗人GRS的小鼠多克隆抗体(Abnova)检测细胞裂解液和培养基中的GlyRS,这表明全长GlyRS从小鼠巨噬细胞的内源性分泌(图13)。

[0238] B. 在脂多糖处理下,全长GlyRS和GlyRS片段从RAW264.7小鼠白血病巨噬细胞分泌

[0239] RAW264.7细胞(小鼠单核细胞/巨噬细胞细胞系)生长于6孔组织培养皿中,直至汇合。用PBS洗涤2次后,将细胞在添加了10ng/ml LPS的无血清DMEM(2ml/瓶)中孵育48小时。收集条件培养基并于4°C下、以20,000 $\times$ G离心30分钟,去除细胞碎片。将上清与10%浓度的TCA沉淀20分钟。丙酮洗涤后,将蛋白团溶解于SDS样品缓冲液中,用于SDS-PAGE。用抗人GRS的小鼠多克隆抗体(Abnova)检测细胞裂解液和培养基中的GlyRS。在LPS处理下,在分泌的培养基中观察到GlyRS的特异性片段,而在细胞裂解液中未观察到,这指示了在LPS处理下这些GlyRS片段的产生和分泌(图14)。

[0240] C. 通过LC/MS/MS鉴定从LPS处理的小鼠巨噬细胞分泌的GlyRS片段

[0241] RAW246.7细胞(小鼠单核细胞/巨噬细胞细胞系)生长于T25瓶中,直至汇合。用上面B中列出的条件,用LPS诱导细胞分泌GlyRS片段。收集条件培养基并于4°C下、以20,000 $\times$ G离心30分钟,去除细胞碎片。将上清(CM)与10%浓度的TCA沉淀20分钟。丙酮洗涤后,将蛋白团溶解于SDS样品缓冲液中,用于SDS-PAGE。从SDS-PAGE凝胶切下单独片段,并进行凝胶内胰蛋白酶消化,随后用LC/MS/MS进行分析,鉴定片段产生自全长蛋白的哪个部分(图15)。从约40-50kDa片段鉴定出的肽位于蛋白的催化结构域内(参见图15、16A)并且根据理论分子量计算,表明该片段可能代表在N末端截短的蛋白,其对应于GlyRS的氨基酸残基约265-685。从约15kDa片段鉴定出的肽位于蛋白的C末端(图15、16B)并且根据理论分子量计算,表明该片段可能代表蛋白的C末端部分,其对应于GlyRS的氨基酸残基约483-685。

[0242] 应当注意到,上述公开是描述性的、说明性的和示例性的,不应理解为对附加权利要求限定范围的限制。

[0243] 可以将上述各种实施方案组合以提供其他的实施方案。对于本说明书引用的和/或申请数据表列出的所有美国专利、美国专利申请公布、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利公布,通过引用将其全部内容并入本文。如果有必要,可以修改实施方案的各个方面来利用各个专利、申请和公布的构想以提供其他的实施方案。

[0244] 根据上文的详细描述,可以对实施方案进行这些和其他的改变。通常,在下面的权

利要求书中,所用的术语不应当解释为将权利要求限制于本说明书和权利要求书所公开的具体实施方案,而应当解释为包括所有可能的实施方案和这些权利要求所要求的等同物的全部范围。因此,本权利要求不受本公开限制。

序列表

<110> AYTR医药公司
 莱斯利·安·格林尼;
 赖安·安德鲁·亚当斯;
 洪非;
 赵基;
 伊娃·瑞比卡·斯蒂芬妮·阿莫尔
 克瑞斯迪·海伦·佩耶尔;

<120> 包含具有非常规生物活性的甘氨酸-tRNA合成酶的组合物和方法

<130> 120161.408PC

<140> PCT

<141> 2009-06-26

<150> US 61/095,548

<151> 2008-09-09

<150> US 61/076,098

<151> 2008-06-26

<160> 11

[0001] <170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 685

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

```

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

```

	Asp	His	Leu	Leu	Lys	Ala	His	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Ser	Asp	Lys	Lys
					165					170					175	
	Cys	Ser	Val	Glu	Lys	Lys	Ser	Glu	Met	Glu	Ser	Val	Leu	Ala	Gln	Leu
				180					185					190		
	Asp	Asn	Tyr	Gly	Gln	Gln	Glu	Leu	Ala	Asp	Leu	Phe	Val	Asn	Tyr	Asn
			195					200					205			
	Val	Lys	Ser	Pro	Ile	Thr	Gly	Asn	Asp	Leu	Ser	Pro	Pro	Val	Ser	Phe
		210					215					220				
	Asn	Leu	Met	Phe	Lys	Thr	Phe	Ile	Gly	Pro	Gly	Gly	Asn	Met	Pro	Gly
	225					230					235					240
	Tyr	Leu	Arg	Pro	Glu	Thr	Ala	Gln	Gly	Ile	Phe	Leu	Asn	Phe	Lys	Arg
					245					250					255	
	Leu	Leu	Glu	Phe	Asn	Gln	Gly	Lys	Leu	Pro	Phe	Ala	Ala	Ala	Gln	Ile
				260					265					270		
	Gly	Asn	Ser	Phe	Arg	Asn	Glu	Ile	Ser	Pro	Arg	Ser	Gly	Leu	Ile	Arg
		275						280					285			
	Val	Arg	Glu	Phe	Thr	Met	Ala	Glu	Ile	Glu	His	Phe	Val	Asp	Pro	Ser
		290					295					300				
	Glu	Lys	Asp	His	Pro	Lys	Phe	Gln	Asn	Val	Ala	Asp	Leu	His	Leu	Tyr
	305					310					315					320
	Leu	Tyr	Ser	Ala	Lys	Ala	Gln	Val	Ser	Gly	Gln	Ser	Ala	Arg	Lys	Met
					325					330					335	
	Arg	Leu	Gly	Asp	Ala	Val	Glu	Gln	Gly	Val	Ile	Asn	Asn	Thr	Val	Leu
				340					345					350		
	Gly	Tyr	Phe	Ile	Gly	Arg	Ile	Tyr	Leu	Tyr	Leu	Thr	Lys	Val	Gly	Ile
			355					360					365			
	Ser	Pro	Asp	Lys	Leu	Arg	Phe	Arg	Gln	His	Met	Glu	Asn	Glu	Met	Ala
		370					375					380				
[0002]	His	Tyr	Ala	Cys	Asp	Cys	Trp	Asp	Ala	Glu	Ser	Lys	Thr	Ser	Tyr	Gly
	385					390					395					400
	Trp	Ile	Glu	Ile	Val	Gly	Cys	Ala	Asp	Arg	Ser	Cys	Tyr	Asp	Leu	Ser
					405					410					415	
	Cys	His	Ala	Arg	Ala	Thr	Lys	Val	Pro	Leu	Val	Ala	Glu	Lys	Pro	Leu
				420					425					430		
	Lys	Glu	Pro	Lys	Thr	Val	Asn	Val	Val	Gln	Phe	Glu	Pro	Ser	Lys	Gly
			435					440					445			
	Ala	Ile	Gly	Lys	Ala	Tyr	Lys	Lys	Asp	Ala	Lys	Leu	Val	Met	Glu	Tyr
		450					455					460				
	Leu	Ala	Ile	Cys	Asp	Glu	Cys	Tyr	Ile	Thr	Glu	Met	Glu	Met	Leu	Leu
	465					470					475					480
	Asn	Glu	Lys	Gly	Glu	Phe	Thr	Ile	Glu	Thr	Glu	Gly	Lys	Thr	Phe	Gln
					485					490					495	
	Leu	Thr	Lys	Asp	Met	Ile	Asn	Val	Lys	Arg	Phe	Gln	Lys	Thr	Leu	Tyr
				500					505					510		
	Val	Glu	Glu	Val	Val	Pro	Asn	Val	Ile	Glu	Pro	Ser	Phe	Gly	Leu	Gly
			515					520					525			
	Arg	Ile	Met	Tyr	Thr	Val	Phe	Glu	His	Thr	Phe	His	Val	Arg	Glu	Gly
		530					535					540				
	Asp	Glu	Gln	Arg	Thr	Phe	Phe	Ser	Phe	Pro	Ala	Val	Val	Ala	Pro	Phe
	545					550					555					560
	Lys	Cys	Ser	Val	Leu	Pro	Leu	Ser	Gln	Asn	Gln	Glu	Phe	Met	Pro	Phe
					565					570					575	
	Val	Lys	Glu	Leu	Ser	Glu	Ala	Leu	Thr	Arg	His	Gly	Val	Ser	His	Lys
				580					585					590		
	Val	Asp	Asp	Ser	Ser	Gly	Ser	Ile	Gly	Arg	Arg	Tyr	Ala	Arg	Thr	Asp
			595					600					605			
	Glu	Ile	Gly	Val	Ala	Phe	Gly	Val	Thr	Ile	Asp	Phe	Asp	Thr	Val	Asn

610	615	620
Lys Thr Pro His Thr Ala Thr Leu Arg Asp Arg Asp Ser Met Arg Gln		
625	630	635
Ile Arg Ala Glu Ile Ser Glu Leu Pro Ser Ile Val Gln Asp Leu Ala		640
	645	650
Asn Gly Asn Ile Thr Trp Ala Asp Val Glu Ala Arg Tyr Pro Leu Phe		655
	660	665
Glu Gly Gln Glu Thr Gly Lys Lys Glu Thr Ile Glu Glu		670
	675	680
		685

<210> 2
 <211> 2759
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 2

[0003]

```

gtcactcgta taaaaacctg tgctttgaag gttctcgtgt gtctcggcct gcaggtctcg 60
ctcagagctg tgtccctgaa catccaccct gctggggtgg cttgacgcac ttctgtgcaa 120
atctgttcgc tcgcaaccct acctacctct ctcccgaacc ggagaaaacc ttcggcgggg 180
tccttcgggg ttttgtgtcg aatctgcggc ggcgaccggg cgccgcgtca cgcggtgggt 240
aatgtgcggc agcacgcgcg ccgcgtcggt tacgcggcga tttcatcatg ctccgagccg 300
ggcggcgcgc gccgcttcgg tcgccaccct ctctggacag cccaggggcg caggctcatg 360
ccctctccgc gtccagtgtt gcttagaggt gctcgcgcgc ctctgctgct gctgctgccg 420
ccccggctct tagcccgacc ctgcctcttg ctccgcgggt cctcagcgc gccctctgc 480
ccccgatct ccttgccgcg cgcgcctcc cggagcagca tggacggcgc gggggctgag 540
gaggtgctgg cacctctgag gctagcagtg cgcagcagg gagatcttgt gcgaaaactc 600
aaagaagata aagcacccca agtagacgta gacaaagcag tggctgagct caaagccgcg 660
aagagggttc tggaagcaaa ggagctggcg ttacagccca aagatgatat tgtagaccga 720
gcaaaaatgg aagataccct gaagaggagg tttttctatg atcaagcttt tgctatttat 780
ggaggtgtta gtggtctgta tgactttggg ccagttggct gtgctttgaa gaacaatatt 840
attcagacct ggaggcagca ctttatccaa gaggaacaga tcctggagat cgattgcacc 900
atgctcacc ctagccaggt tttaaagacc tctggccatg tagacaaatt tgctgacttc 960
atggtgaaag acgtaaaaaa tggagaatgt tttcgtgctg accatctatt aaaagctcat 1020
ttacagaaat tgatgtctga taagaagtgt tctgtcgaaa agaaatcaga aatggaaagt 1080
gttttgcccc agcttgataa ctatggacag caagaacttg cggatctttt tgtgaactat 1140
aatgtaaaat ctcccattac tggaaatgat ctatcccttc cagtgtcttt taacttaagt 1200
ttcaagactt tcattgggccc tggaggaaac atgcctgggt acttgagacc agaaactgca 1260
caggggattt tcttgaattt caaacgactt ttggagttca accaaggaaa gttgcctttt 1320
gctgctgccc agattggaat ttcttttaga aatgagatct cccctcgatc tggactgac 1380
agagtcagag aattcacaat ggcagaaatt gagcactttg tagatcccag tgagaaagac 1440
cacccaagt tccagaatgt ggcagacctt cacctttatt tgtattcagc aaaagcccag 1500
gtcagcggac agtccgctcg gaaaatgcgc ctgggagatg ctggttgaaca ggggtgtgatt 1560
aataacacag tattaggcta tttcattggc cgcattctacc tctacctcac gaagggtgga 1620
atatctccag ataaactccg cttccggcag cacatggaga atgagatggc ccattatgcc 1680
tgtgactgtt gggatgcaga atccaaaaca tcctacgggt ggattgagat tgttgatgt 1740
gctgactgtt cctgttatga cctctcctgt catgcacgag ccaccaaagt cccacttgta 1800
gctgagaaac ctctgaaaga acccaaaaca gtcaatgttg ttcagtttga acccagtaag 1860
ggagcaattg gtaaggcata taagaaggat gcaaaactgg tgatggagta tcttgccatt 1920
tgtgatgagt gctacattac agaaatggag atgctgctga atgagaaagg ggaattcaca 1980
attgaaactg aagggaacac atttcagtta acaaaagaca tgatcaatgt gaagagattc 2040
cagaaaacac tatatgtgga agaagttgtt ccgaatgtaa ttgaaccttc cttcggcctg 2100
ggttaggatca tgtatacggg atttgaacat acattccatg tacgagaagg agatgaacag 2160
agaacattct tcagtttccc tgctgtagtt gctccattca aatgttccgt cctccactg 2220

```

```

agccaaaacc aggagttcat gccatttgtc aaggaattat cggaagccct gaccaggcat 2280
ggagtatctc acaaagtaga cgattcctct gggtaaatcg gaaggcgcta tgccaggact 2340
gatgagattg gcgtggcttt tgggtgcacc attgactttg acacagtga caagaccccc 2400
cacactgcaa ctctgaggga ccgtgactca atgcggcaga taagagcaga gatctctgag 2460
ctgcccagca tagtccaaga cctagccaat ggcaacatca catgggctga tgtggaggcc 2520
aggtatcctc tgtttgaagg gcaagagact ggtaaaaaag agacaatcga ggaatgagga 2580
caattttgac aacttttgac cacttgcgct aataaaaaaa aaaaaaaact actcttatgt 2640
ccactttaca aaagaaaaca gcattgtgat tactcccagg gaccgtatct tctcttcagt 2700
ggctgcctga ttttaccccc acaattaaag ttgaaggaat cctgaacaaa aaaaaaaaaa 2759

```

<210> 3
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 3
 Pro Gly Tyr Leu Arg Pro Glu Thr Ala Gln Gly Ile Phe Leu Asn Phe
 1 5 10 15
 Lys

<210> 4
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 智人

[0004] <400> 4
 Thr Gly Asn Asp Leu Ser Pro Pro Val Ser Phe Asn Leu Met Phe Lys
 1 5 10 15

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 5
 Asn Val Val Gln Phe Glu Pro Ser Lys
 1 5

<210> 6
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 6
 Leu Tyr Val Glu Glu Val Val Pro Asn Val Ile Glu Pro Ser Phe Gly
 1 5 10 15
 Leu Gly Arg

<210> 7
 <211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<400> 7

Ala	Ile	Tyr	Gly	Gly	Val	Ser	Gly	Leu	Tyr	Asp	Phe	Gly	Pro	Val	Gly
1				5					10					15	
Cys	Ala	Leu	Lys												
			20												

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 8

Gln	His	Phe	Ile	Gln	Glu	Glu	Gln	Ile	Leu	Glu	Ile	Asp	Cys	Thr
1				5					10					15

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 9

Thr	Val	Asn	Val	Val	Gln	Phe	Glu	Pro	Ser	Lys
1				5					10	

[0005]

<210> 10

<211> 685

<212> PRT

<213> 智人

<400> 10

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

				165					170					175			
	Cys	Ser	Val	Glu	Lys	Lys	Ser	Glu	Met	Glu	Ser	Val	Leu	Ala	Gln	Leu	
				180					185					190			
	Asp	Asn	Tyr	Gly	Gln	Gln	Glu	Leu	Ala	Asp	Leu	Phe	Val	Asn	Tyr	Asn	
			195					200					205				
	Val	Lys	Ser	Pro	Ile	Thr	Gly	Asn	Asp	Leu	Ser	Pro	Pro	Val	Ser	Phe	
		210					215					220					
	Asn	Leu	Met	Phe	Lys	Thr	Phe	Ile	Gly	Pro	Gly	Gly	Asn	Met	Pro	Gly	
	225					230					235					240	
	Tyr	Leu	Arg	Pro	Glu	Thr	Ala	Gln	Gly	Ile	Phe	Leu	Asn	Phe	Lys	Arg	
				245						250					255		
	Leu	Leu	Glu	Phe	Asn	Gln	Gly	Lys	Leu	Pro	Phe	Ala	Ala	Ala	Gln	Ile	
			260						265					270			
	Gly	Asn	Ser	Phe	Arg	Asn	Glu	Ile	Ser	Pro	Arg	Ser	Gly	Leu	Ile	Arg	
		275						280					285				
	Val	Arg	Glu	Phe	Thr	Met	Ala	Glu	Ile	Glu	His	Phe	Val	Asp	Pro	Ser	
		290					295					300					
	Glu	Lys	Asp	His	Pro	Lys	Phe	Gln	Asn	Val	Ala	Asp	Leu	His	Leu	Tyr	
	305					310					315					320	
	Leu	Tyr	Ser	Ala	Lys	Ala	Gln	Val	Ser	Gly	Gln	Ser	Ala	Arg	Lys	Met	
				325						330					335		
	Arg	Leu	Gly	Asp	Ala	Val	Glu	Gln	Gly	Val	Ile	Asn	Asn	Thr	Val	Leu	
			340						345					350			
	Gly	Tyr	Phe	Ile	Gly	Arg	Ile	Tyr	Leu	Tyr	Leu	Thr	Lys	Val	Gly	Ile	
		355						360					365				
	Ser	Pro	Asp	Lys	Leu	Arg	Phe	Arg	Gln	His	Met	Glu	Asn	Glu	Met	Ala	
		370					375					380					
	His	Tyr	Ala	Cys	Asp	Cys	Trp	Asp	Ala	Glu	Ser	Lys	Thr	Ser	Tyr	Gly	
[0006]	385					390					395					400	
	Trp	Ile	Glu	Ile	Val	Gly	Cys	Ala	Asp	Arg	Ser	Cys	Tyr	Asp	Leu	Ser	
				405						410					415		
	Cys	His	Ala	Arg	Ala	Thr	Lys	Val	Pro	Leu	Val	Ala	Glu	Lys	Pro	Leu	
			420						425				430				
	Lys	Glu	Pro	Lys	Thr	Val	Asn	Val	Val	Gln	Phe	Glu	Pro	Ser	Lys	Gly	
		435						440					445				
	Ala	Ile	Gly	Lys	Ala	Tyr	Lys	Lys	Asp	Ala	Lys	Leu	Val	Met	Glu	Tyr	
		450					455					460					
	Leu	Ala	Ile	Cys	Asp	Glu	Cys	Tyr	Ile	Thr	Glu	Met	Glu	Met	Leu	Leu	
	465					470					475					480	
	Asn	Glu	Lys	Gly	Glu	Phe	Thr	Ile	Glu	Thr	Glu	Gly	Lys	Thr	Phe	Gln	
				485						490					495		
	Leu	Thr	Lys	Asp	Met	Ile	Asn	Val	Lys	Arg	Phe	Gln	Lys	Thr	Leu	Tyr	
			500						505					510			
	Val	Glu	Glu	Val	Val	Pro	Asn	Val	Ile	Glu	Pro	Ser	Phe	Gly	Leu	Gly	
		515						520					525				
	Arg	Ile	Met	Tyr	Thr	Val	Phe	Glu	His	Thr	Phe	His	Val	Arg	Glu	Gly	
		530					535					540					
	Asp	Glu	Gln	Arg	Thr	Phe	Phe	Ser	Phe	Pro	Ala	Val	Val	Ala	Pro	Phe	
	545					550					555					560	
	Lys	Cys	Ser	Val	Leu	Pro	Leu	Ser	Gln	Asn	Gln	Glu	Phe	Met	Pro	Phe	
				565						570					575		
	Val	Lys	Glu	Leu	Ser	Glu	Ala	Leu	Thr	Arg	His	Gly	Val	Ser	His	Lys	
			580						585					590			
	Val	Asp	Asp	Ser	Ser	Gly	Ser	Ile	Gly	Arg	Arg	Tyr	Ala	Arg	Thr	Asp	
		595						600					605				
	Glu	Ile	Gly	Val	Ala	Phe	Gly	Val	Thr	Ile	Asp	Phe	Asp	Thr	Val	Asn	
		610					615					620					

Lys	Thr	Pro	His	Thr	Ala	Thr	Leu	Arg	Asp	Arg	Asp	Ser	Met	Arg	Gln
625					630					635					640
Ile	Arg	Ala	Glu	Ile	Ser	Glu	Leu	Pro	Ser	Ile	Val	Gln	Asp	Leu	Ala
				645					650					655	
Asn	Gly	Asn	Ile	Thr	Trp	Ala	Asp	Val	Glu	Ala	Arg	Tyr	Pro	Leu	Phe
			660					665					670		
Glu	Gly	Gln	Glu	Thr	Gly	Lys	Lys	Glu	Thr	Ile	Glu	Glu			
		675					680					685			

<210> 11
 <211> 685
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 11

Met	Asp	Gly	Ala	Gly	Ala	Glu	Glu	Val	Leu	Ala	Pro	Leu	Arg	Leu	Ala
1				5					10					15	
Val	Arg	Gln	Gln	Gly	Asp	Leu	Val	Arg	Lys	Leu	Lys	Glu	Asp	Lys	Ala
		20						25					30		
Pro	Gln	Val	Asp	Val	Asp	Lys	Ala	Val	Ala	Glu	Leu	Lys	Ala	Arg	Lys
		35					40					45			
Arg	Val	Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Leu	Ala	Leu	Gln	Pro	Lys	Asp	Asp	Ile
	50					55					60				
Val	Asp	Arg	Ala	Lys	Met	Glu	Asp	Thr	Leu	Lys	Arg	Arg	Phe	Phe	Tyr
65					70					75					80
Asp	Gln	Ala	Phe	Ala	Ile	Tyr	Gly	Gly	Val	Ser	Gly	Leu	Tyr	Asp	Phe
				85					90					95	
[0007]	Gly	Pro	Val	Gly	Cys	Ala	Leu	Lys	Asn	Asn	Ile	Ile	Gln	Thr	Trp
			100						105					110	
	Gln	His	Phe	Ile	Gln	Glu	Glu	Gln	Ile	Leu	Glu	Ile	Asp	Cys	Thr
		115						120					125		
	Leu	Thr	Pro	Glu	Pro	Val	Leu	Lys	Thr	Ser	Gly	His	Val	Asp	Lys
		130					135					140			
	Ala	Asp	Phe	Met	Val	Lys	Asp	Val	Lys	Asn	Gly	Glu	Cys	Phe	Arg
145					150						155				160
	Asp	His	Leu	Leu	Lys	Ala	His	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Ser	Asp	Lys
				165						170				175	
	Cys	Ser	Val	Glu	Lys	Lys	Ser	Glu	Met	Glu	Ser	Val	Leu	Ala	Gln
		180							185				190		
	Asp	Asn	Tyr	Gly	Gln	Gln	Glu	Leu	Ala	Asp	Leu	Phe	Val	Asn	Tyr
		195						200					205		
	Val	Lys	Ser	Pro	Ile	Thr	Gly	Asn	Asp	Leu	Ser	Pro	Pro	Val	Ser
		210					215					220			
	Asn	Leu	Met	Phe	Lys	Thr	Phe	Ile	Gly	Pro	Gly	Gly	Asn	Met	Pro
225					230						235				240
	Tyr	Leu	Arg	Pro	Glu	Thr	Ala	Gln	Gly	Ile	Phe	Leu	Asn	Phe	Lys
				245						250					255
	Leu	Leu	Glu	Phe	Asn	Gln	Gly	Lys	Leu	Pro	Phe	Ala	Ala	Ala	Gln
			260						265					270	
	Gly	Asn	Ser	Phe	Arg	Asn	Glu	Ile	Ser	Pro	Arg	Ser	Gly	Leu	Ile
		275						280					285		
	Val	Arg	Glu	Phe	Thr	Met	Ala	Glu	Ile	Glu	His	Phe	Val	Asp	Pro
		290					295					300			
	Glu	Lys	Asp	His	Pro	Lys	Phe	Gln	Asn	Val	Ala	Asp	Leu	His	Leu
305					310						315				320
	Leu	Tyr	Ser	Ala	Lys	Ala	Gln	Val	Ser	Gly	Gln	Ser	Ala	Arg	Lys
															Met

[0008]	Arg	Leu	Gly	Asp	Ala	Val	Glu	Gln	Gly	Val	Ile	Asn	Asn	Thr	Val	Leu	
				340					345								
	Gly	Tyr	Phe	Ile	Gly	Arg	Ile	Tyr	Leu	Tyr	Leu	Thr	Lys	Val	Gly	Ile	
			355					360					365				
	Ser	Pro	Asp	Lys	Leu	Arg	Phe	Arg	Gln	His	Met	Glu	Asn	Glu	Met	Ala	
		370					375					380					
	His	Tyr	Ala	Cys	Asp	Cys	Trp	Asp	Ala	Glu	Ser	Lys	Thr	Ser	Tyr	Gly	
	385					390					395					400	
	Trp	Ile	Glu	Ile	Val	Gly	Cys	Ala	Asp	Arg	Ser	Cys	Tyr	Asp	Leu	Ser	
					405					410						415	
	Cys	His	Ala	Arg	Ala	Thr	Lys	Val	Pro	Leu	Val	Ala	Glu	Lys	Pro	Leu	
				420					425						430		
	Lys	Glu	Pro	Lys	Thr	Val	Asn	Val	Val	Gln	Phe	Glu	Pro	Ser	Lys	Gly	
			435					440					445				
	Ala	Ile	Gly	Lys	Ala	Tyr	Lys	Lys	Asp	Ala	Lys	Leu	Val	Met	Glu	Tyr	
		450					455					460					
	Leu	Ala	Ile	Cys	Asp	Glu	Cys	Tyr	Ile	Thr	Glu	Met	Glu	Met	Leu	Leu	
	465					470					475					480	
	Asn	Glu	Lys	Gly	Glu	Phe	Thr	Ile	Glu	Thr	Glu	Gly	Lys	Thr	Phe	Gln	
				485						490						495	
	Leu	Thr	Lys	Asp	Met	Ile	Asn	Val	Lys	Arg	Phe	Gln	Lys	Thr	Leu	Tyr	
				500					505								
	Val	Glu	Glu	Val	Val	Pro	Asn	Val	Ile	Glu	Pro	Ser	Phe	Gly	Leu	Gly	
			515					520					525				
	Arg	Ile	Met	Tyr	Thr	Val	Phe	Glu	His	Thr	Phe	His	Val	Arg	Glu	Gly	
		530					535					540					
	Asp	Glu	Gln	Arg	Thr	Phe	Phe	Ser	Phe	Pro	Ala	Val	Val	Ala	Pro	Phe	
	545					550				555						560	
	Lys	Cys	Ser	Val	Leu	Pro	Leu	Ser	Gln	Asn	Gln	Glu	Phe	Met	Pro	Phe	
				565					570						575		
	Val	Lys	Glu	Leu	Ser	Glu	Ala	Leu	Thr	Arg	His	Gly	Val	Ser	His	Lys	
				580					585					590			
	Val	Asp	Asp	Ser	Ser	Gly	Ser	Ile	Gly	Arg	Arg	Tyr	Ala	Arg	Thr	Asp	
		595						600					605				
	Glu	Ile	Gly	Val	Ala	Phe	Gly	Val	Thr	Ile	Asp	Phe	Asp	Thr	Val	Asn	
		610					615					620					
	Lys	Thr	Pro	His	Thr	Ala	Thr	Leu	Arg	Asp	Arg	Asp	Ser	Met	Arg	Gln	
	625					630				635						640	
	Ile	Arg	Ala	Glu	Ile	Ser	Glu	Leu	Pro	Ser	Ile	Val	Gln	Asp	Leu	Ala	
				645					650						655		
	Asn	Gly	Asn	Ile	Thr	Trp	Ala	Asp	Val	Glu	Ala	Arg	Tyr	Pro	Leu	Phe	
			660					665						670			
	Glu	Gly	Gln	Glu	Thr	Gly	Lys	Lys	Glu	Thr	Ile	Glu	Glu				
			675					680					685				

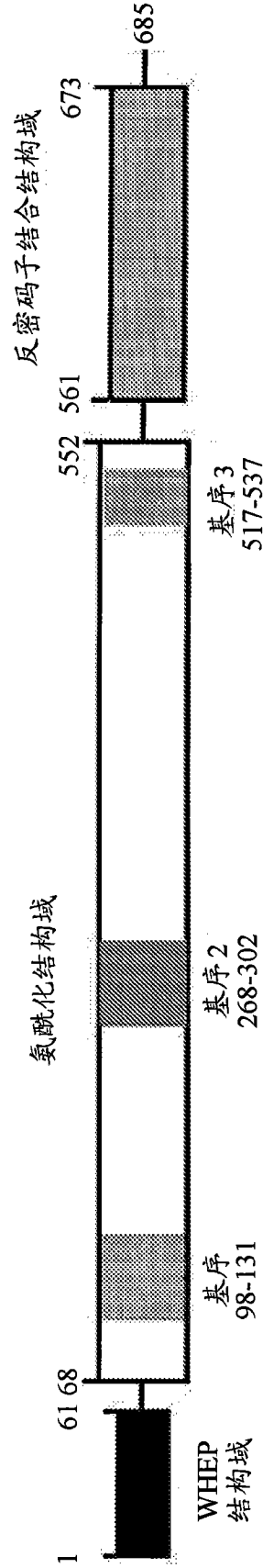


图 1: 人甘氨酸-tRNA合成酶蛋白 (A)结构域结构,(B)序列,(C)SDS-PAGE凝胶,(D)用PMN弹性蛋白酶消化

图1A

1MDGAGAEVLAPRLAVRQQGDLVRKLKEDKAPQVD
 VDKAVAELEKARKRVLEAKELALQPKDDIVDRAKMEDTL
 KRRFFYDQAFAYGGVSGLYDFGPVGCALKNNIIQTWR
 QHFIQEEQILEIDCTMLTPEPVLTSGHYDKFADFMYK
 DVKNGECEFRADHLLKAHLQKLMQSDKKCSVEKKSEMES
 VLAQLDNYGQQLADLFVNYNVKSPITGNDLSPPVSFN
 LMFKTFIGPGGNMPGYLRPETAGGIFLNFKRLLEFNQG
 KLPFAAQIGNSFRNEISPRSGLIRVREFDMAEIEHFVD
 PSEKDHPPKFNQVADLHLYLSAKAQVSGQSARKMRLG
 DAVEQGVINNTVLGYFIGRIYLYLTGVGISPDKLRFROH
 MENEMAHYACDCWDAESKTSYGVWIEVGCADRSCYD
 LSCHARATKVPLVAEKPLKEPKTVNVVQFEPKGAIGK
 AYKDAKLVMLEYLAICDECYITEMEMLLNEKGFTIETE
 GKTFQLTKDMINVKRFQKTLVVEEVVNPVIEPSFGLGRI
 MYTVFEHTFHVREGDEQRTFFSFPAWVAPFKCSVLPL
 SONQEFMPFVKELSEALTRHGVSHKVDSSSGSIGRRY
 ARTDEIGVAFGVTFIDFTVKNKTPHTATLDRDSDMRQIR
 AEISELPSIVQDLANGNITWADVEARYPLFEGQETGKK
 ETIEE⁵⁸⁵

图1B

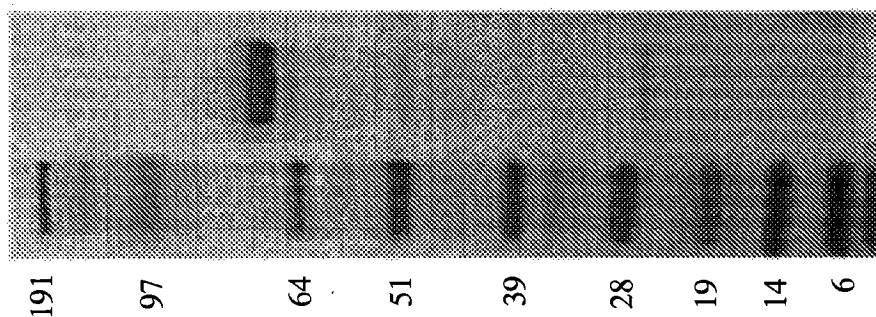


图1C

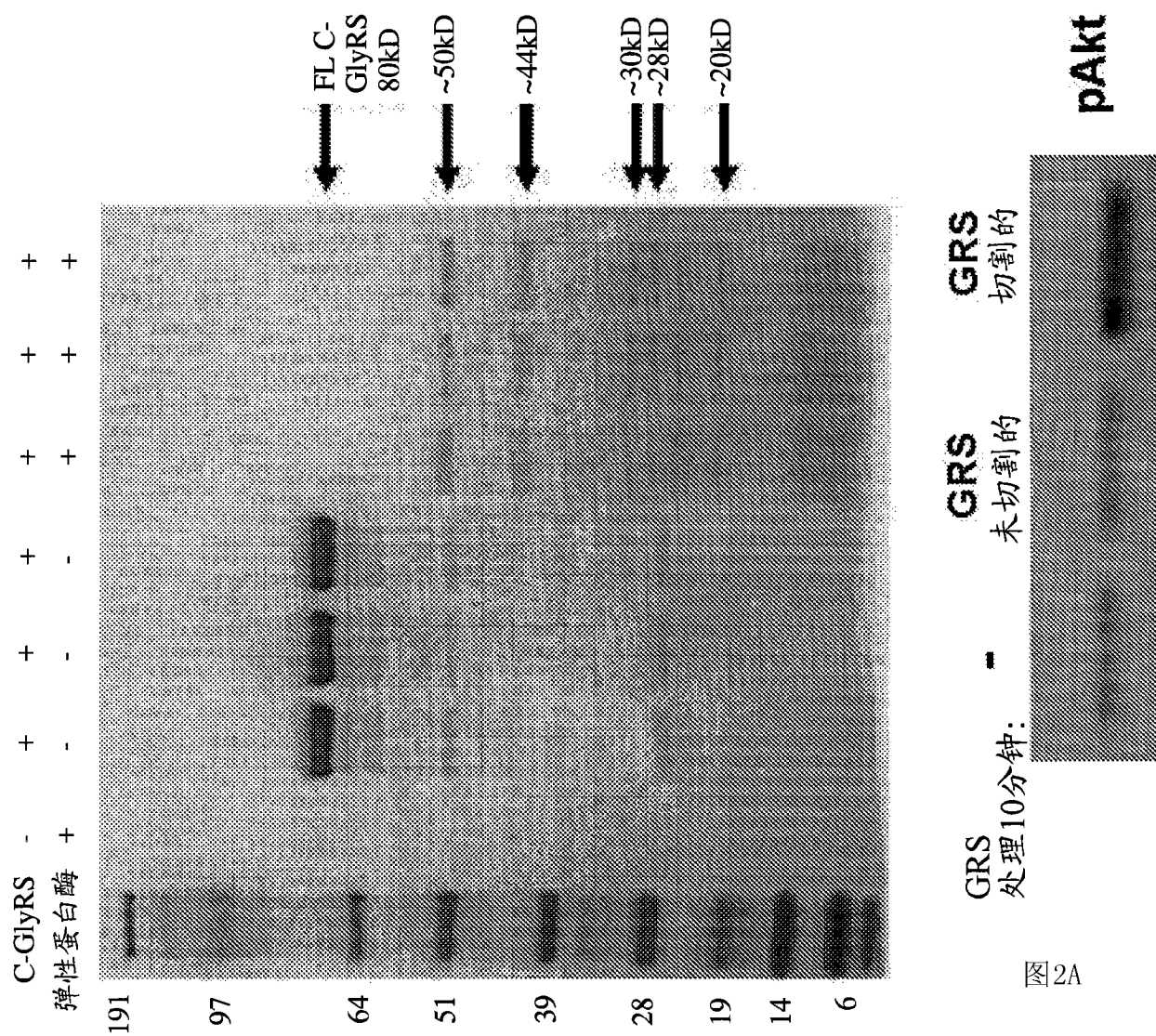


图1D

图2A

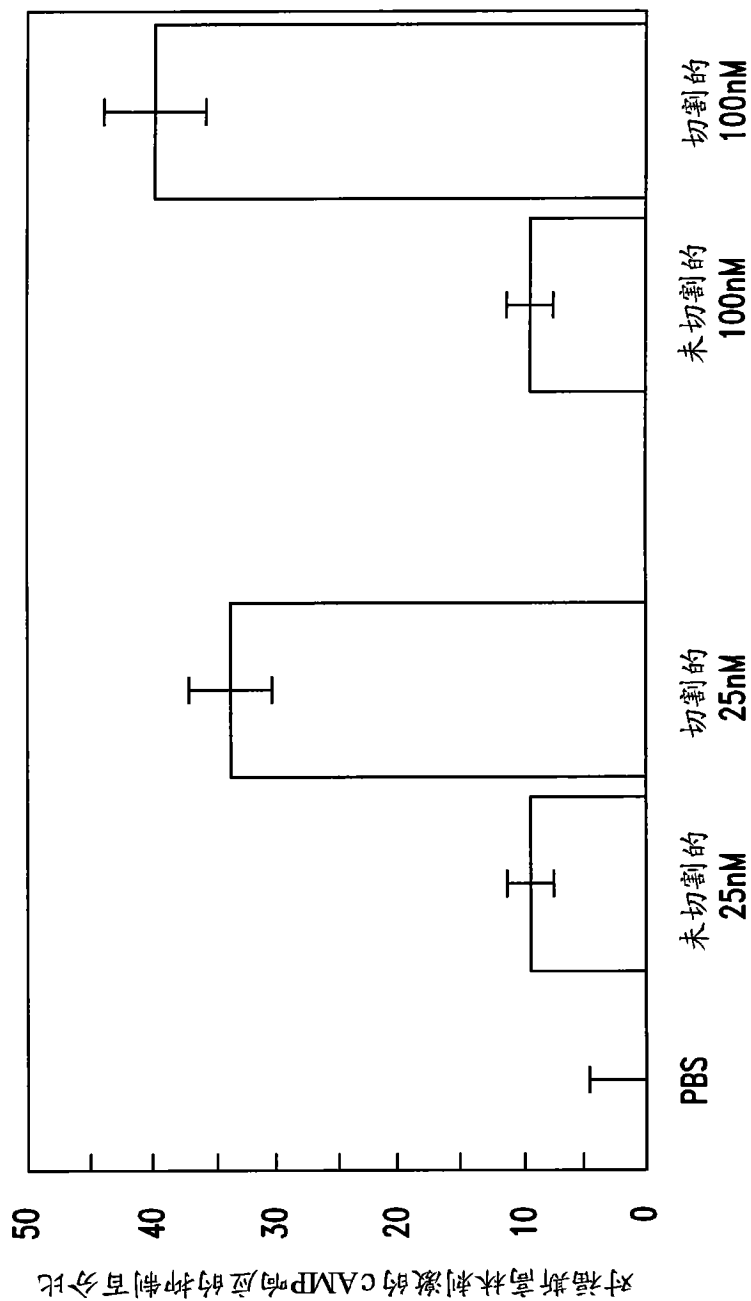


图 2: 切割的GRS片段诱导bAEC细胞中的信号转导
(A)AKt的激活,(B)对福斯高林刺激的cAMP响应的抑制

图2B

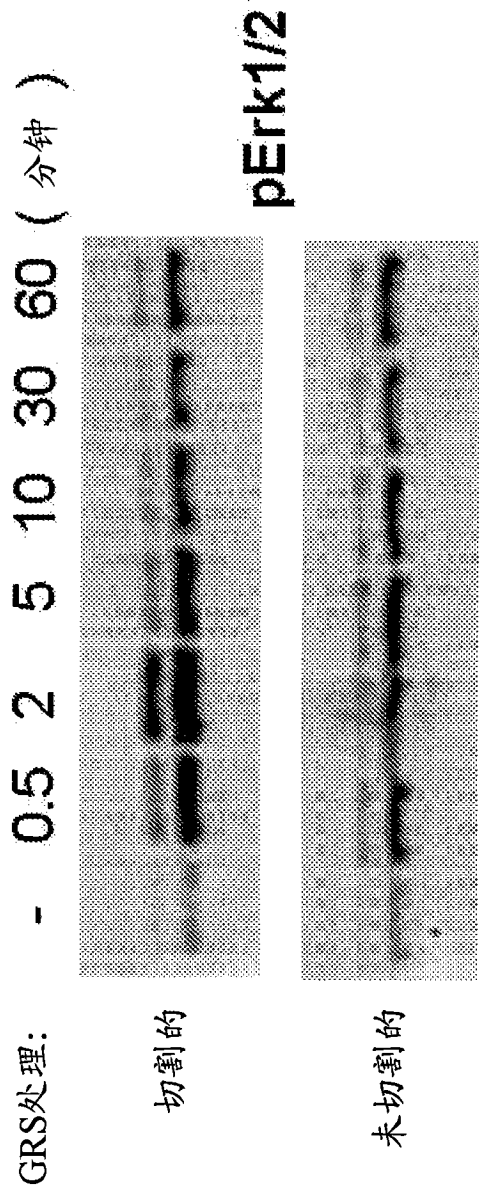
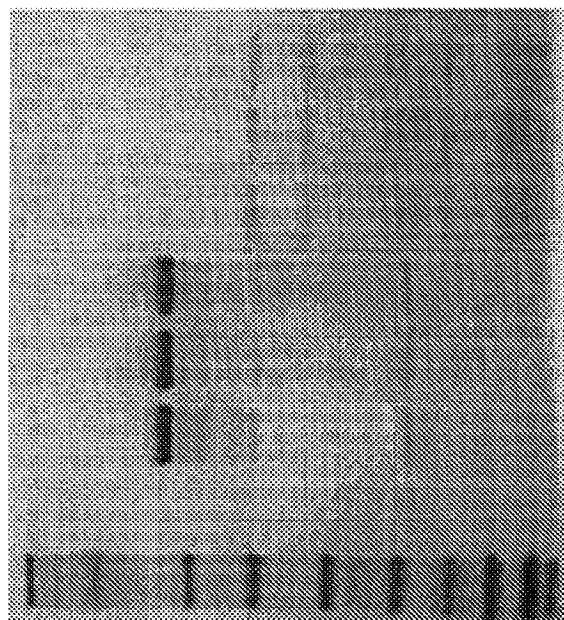


图3

图 3: 切割的GRS片段诱导THP-1单核细胞中的信号转导
(A)Erk1/2激活的时间过程



蛋白水解
从凝胶切除条带
消化



图4A



图 4: GRS 片段边界的质谱鉴定

(A) 通过 LC/MS/MS 确定蛋白酶切位点

(B) 在全长甘氨酸-tRNA 合成酶二聚体的上下文中的称为 G6 的 GRS 片段的结构

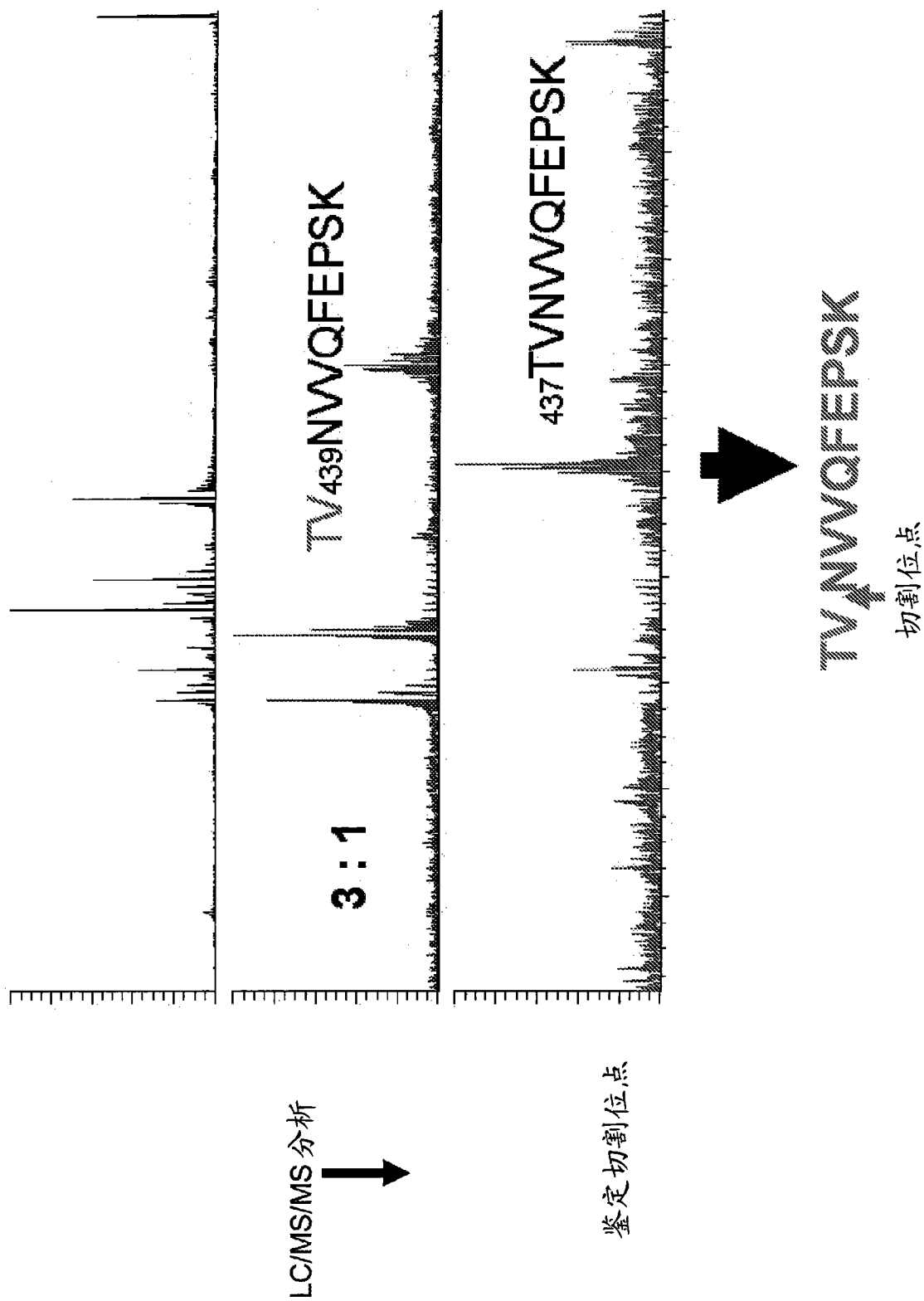


图4A(续)

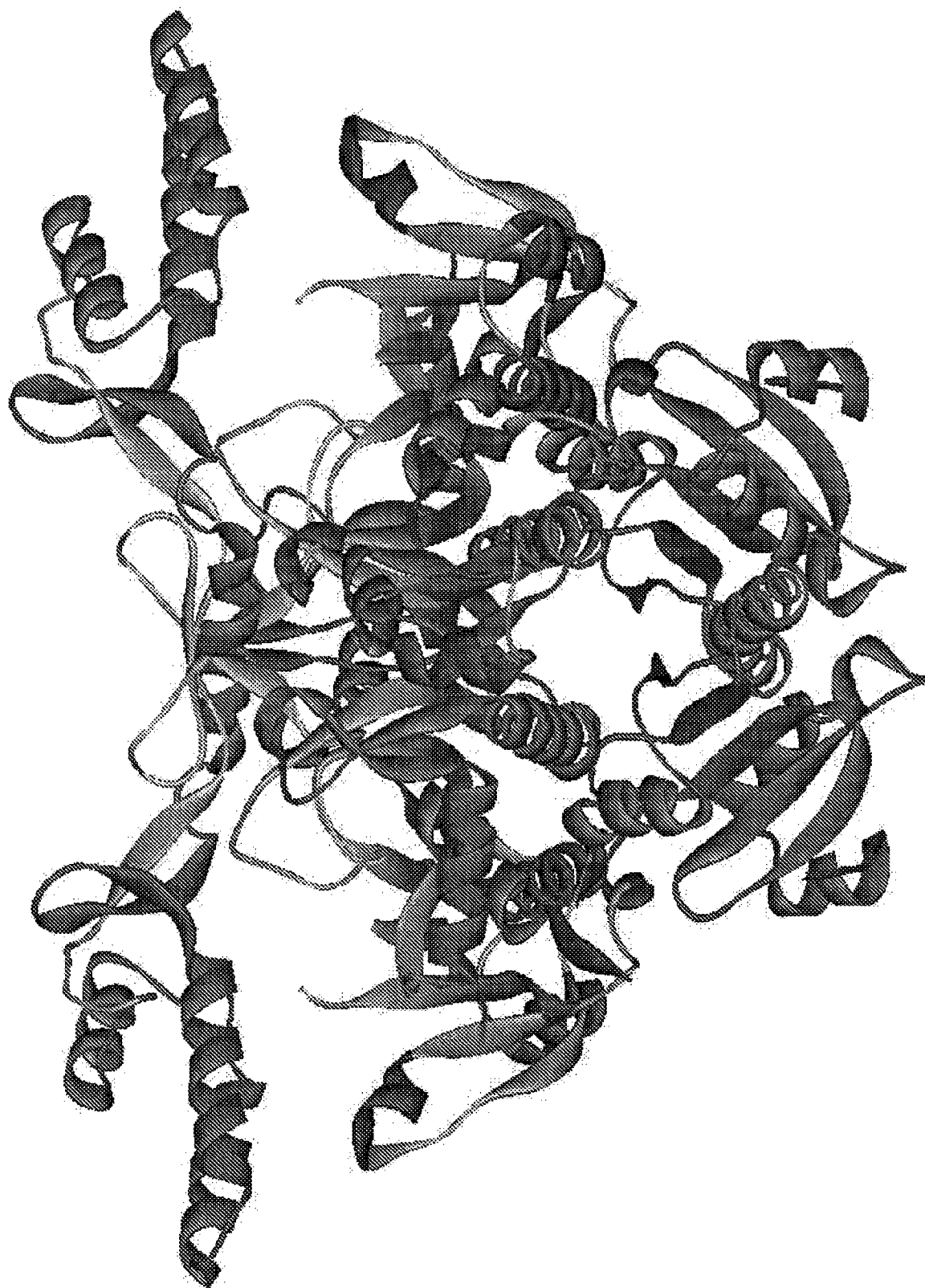


图4B

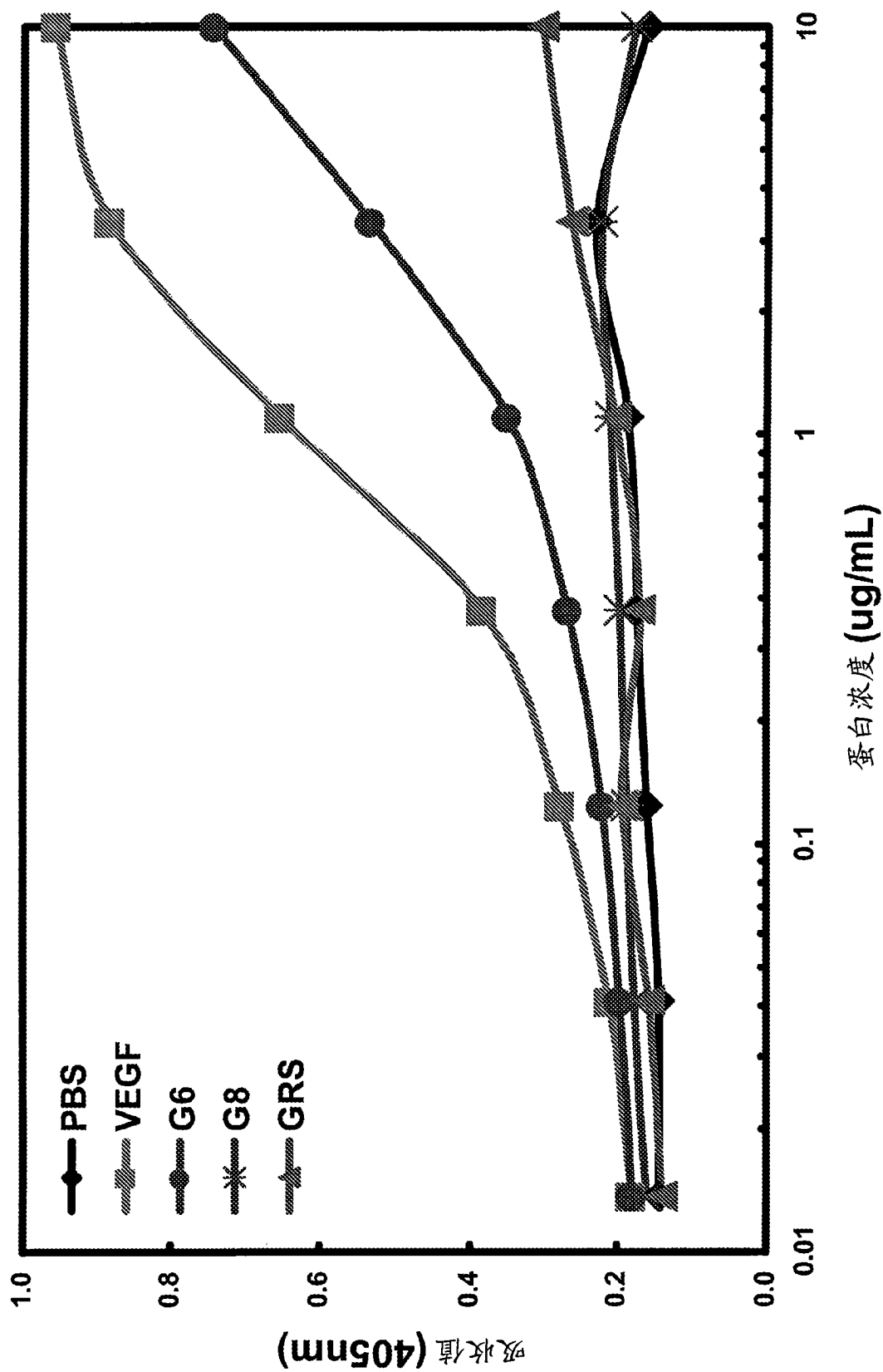


图 5: 片段G6与内皮细胞结合

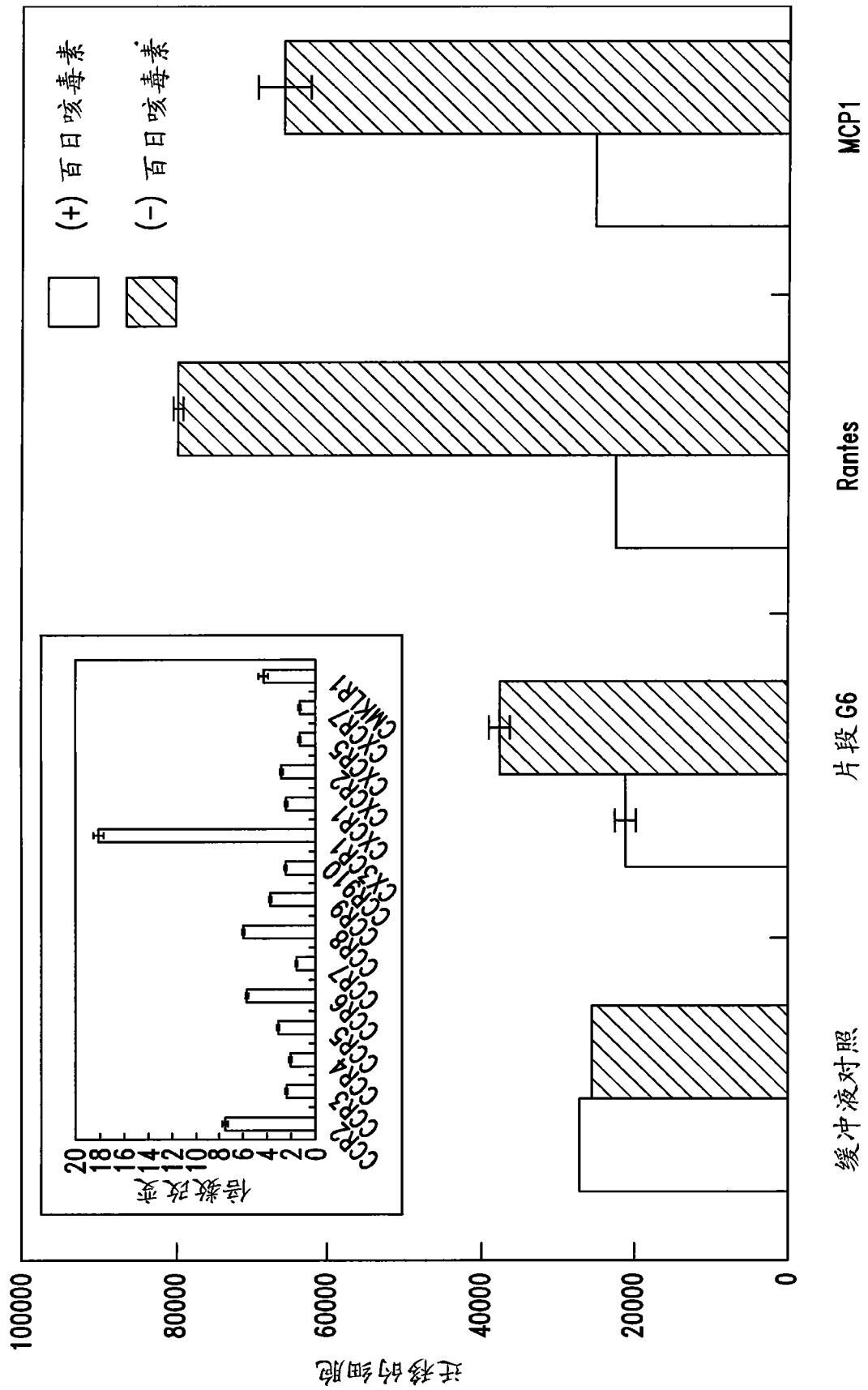


图6

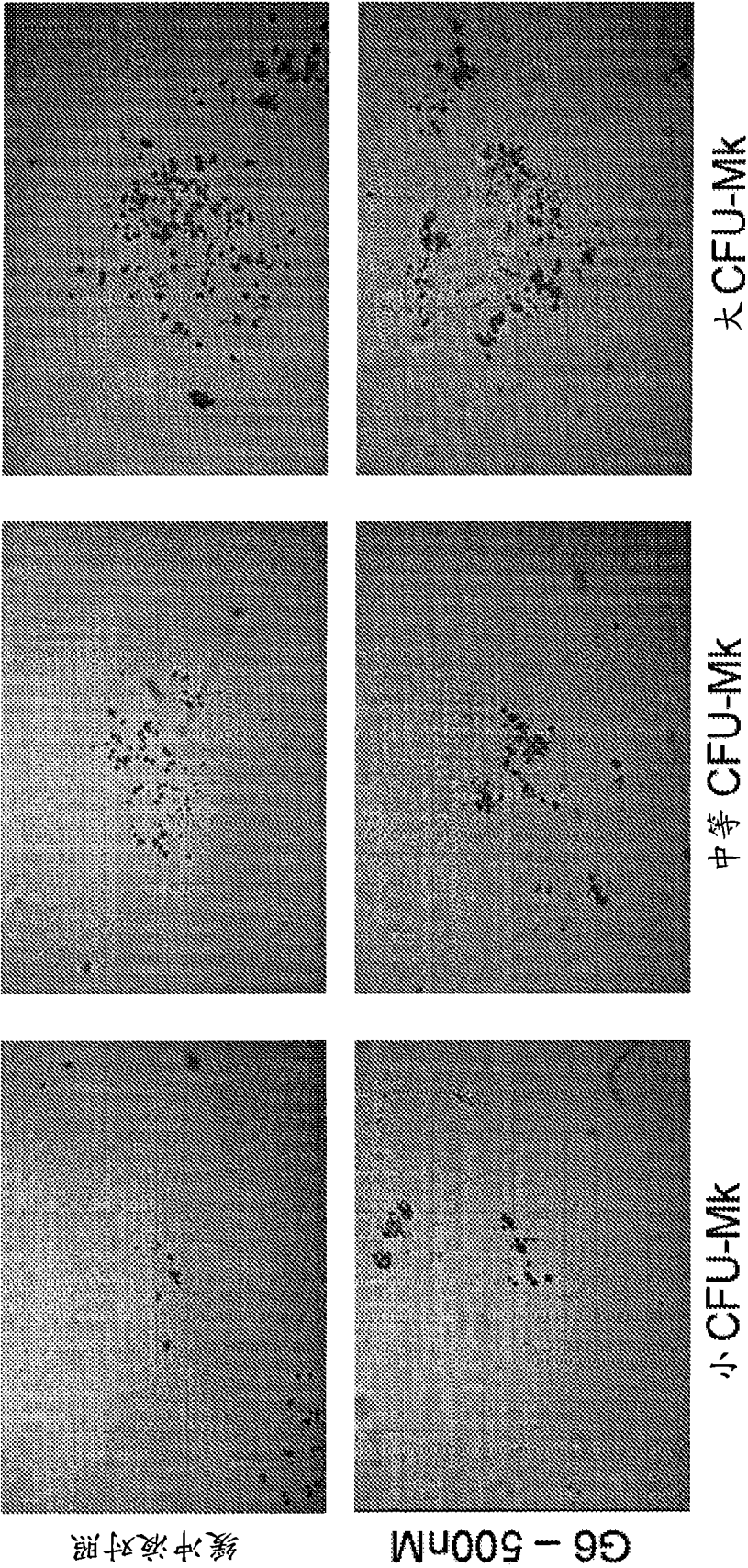


图7A

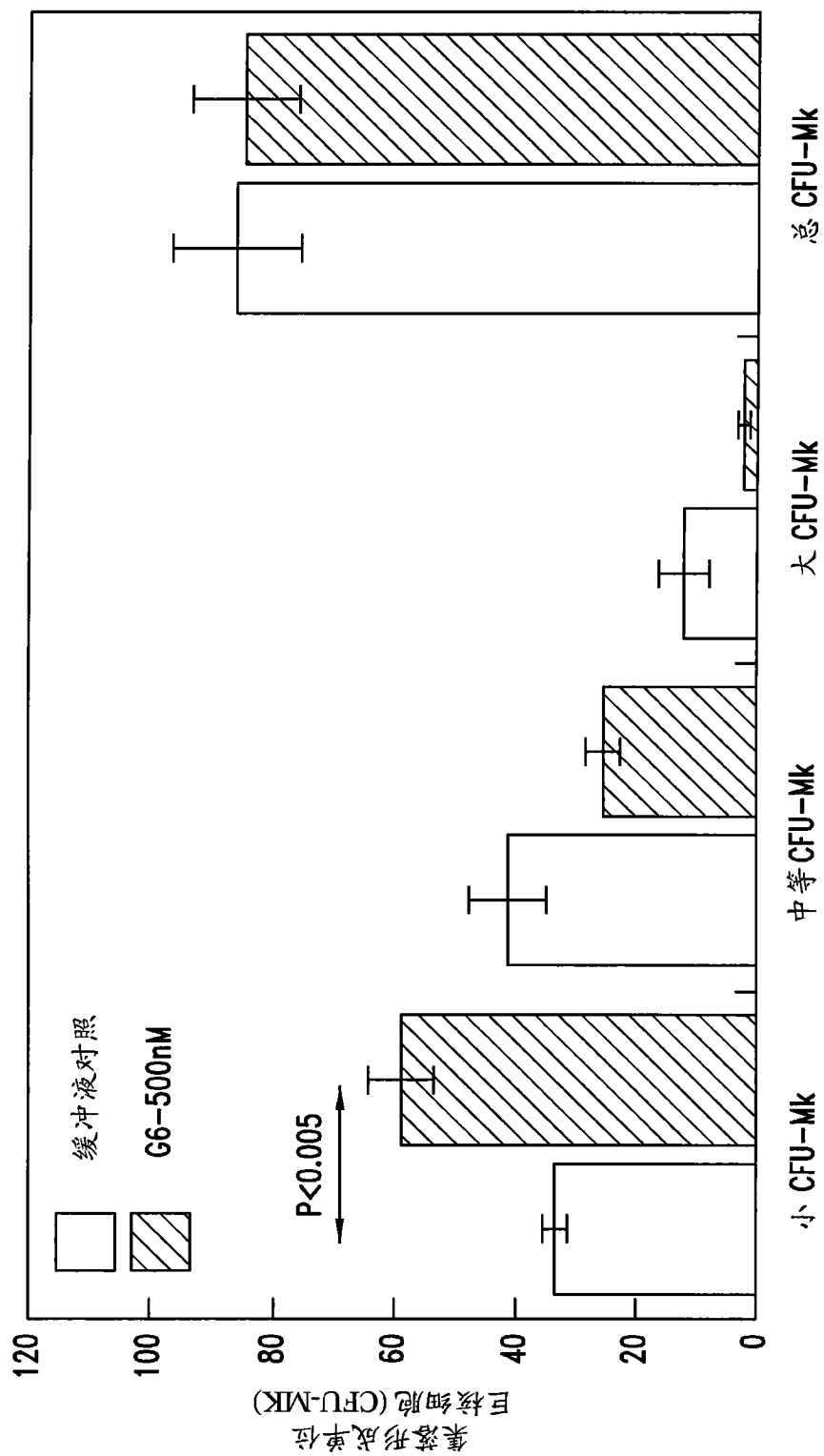


图7B

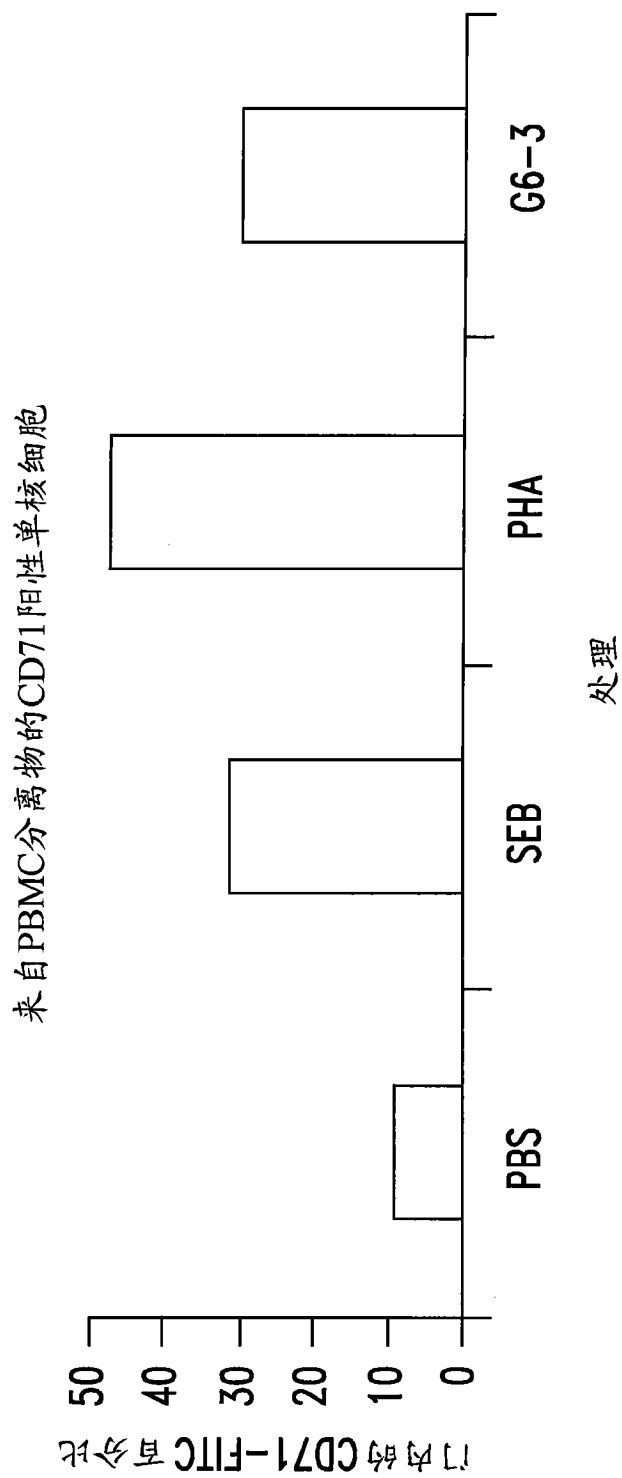


图8

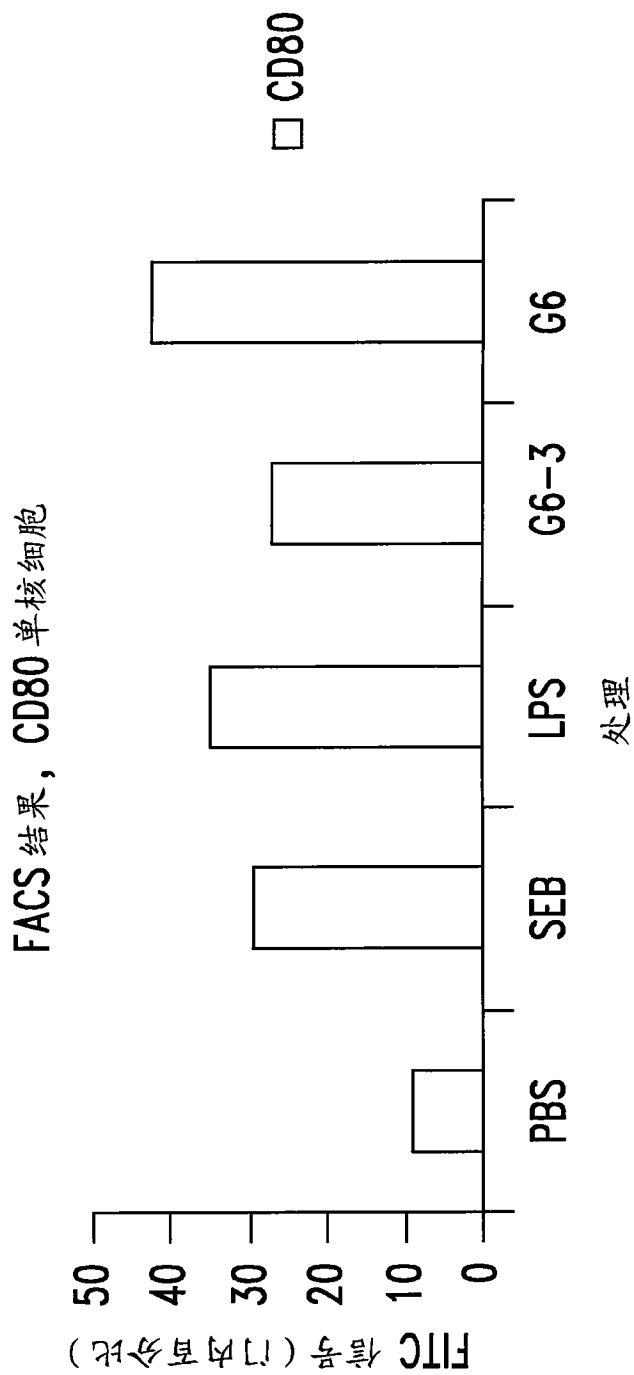


图9

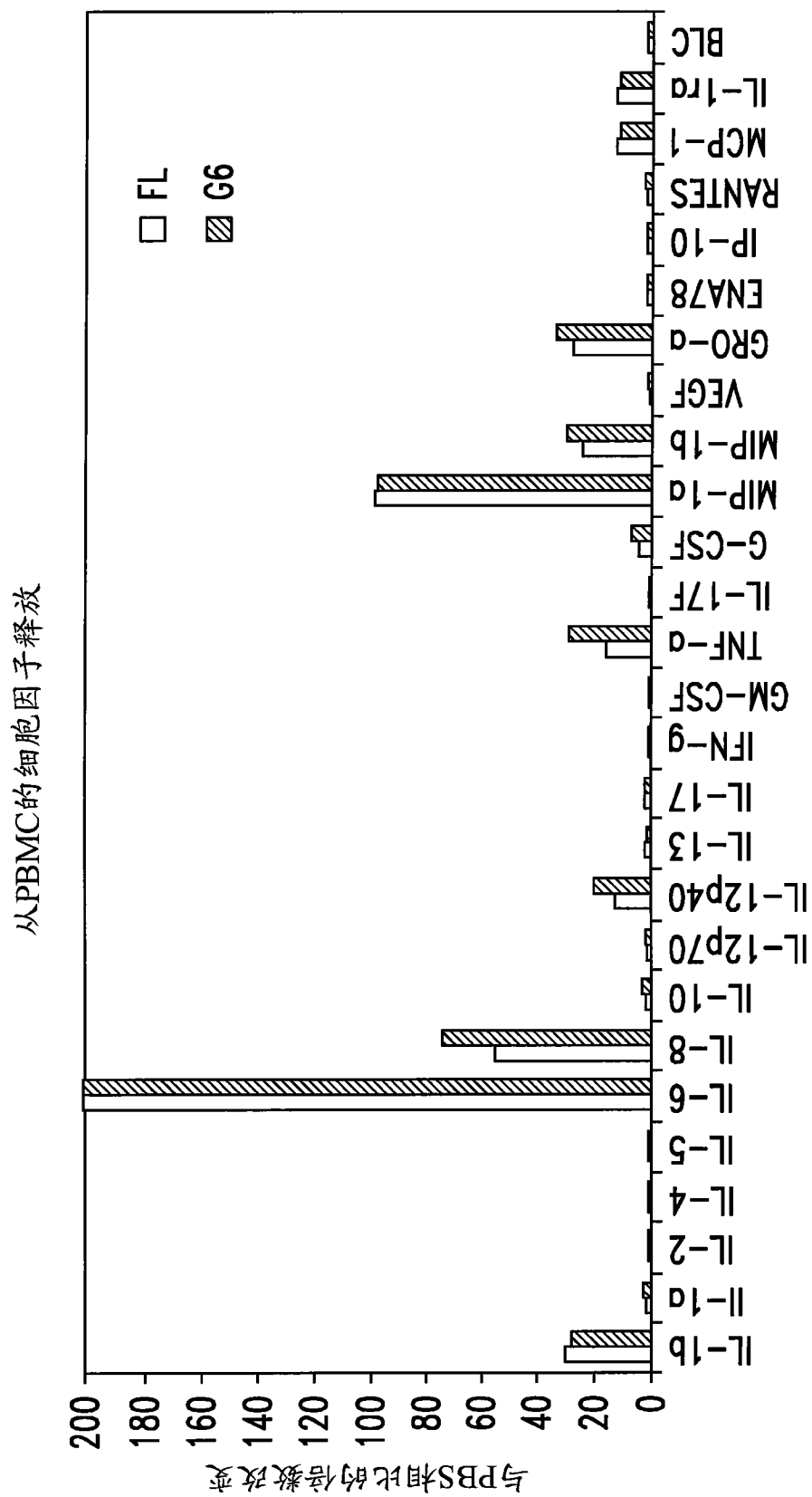


图10

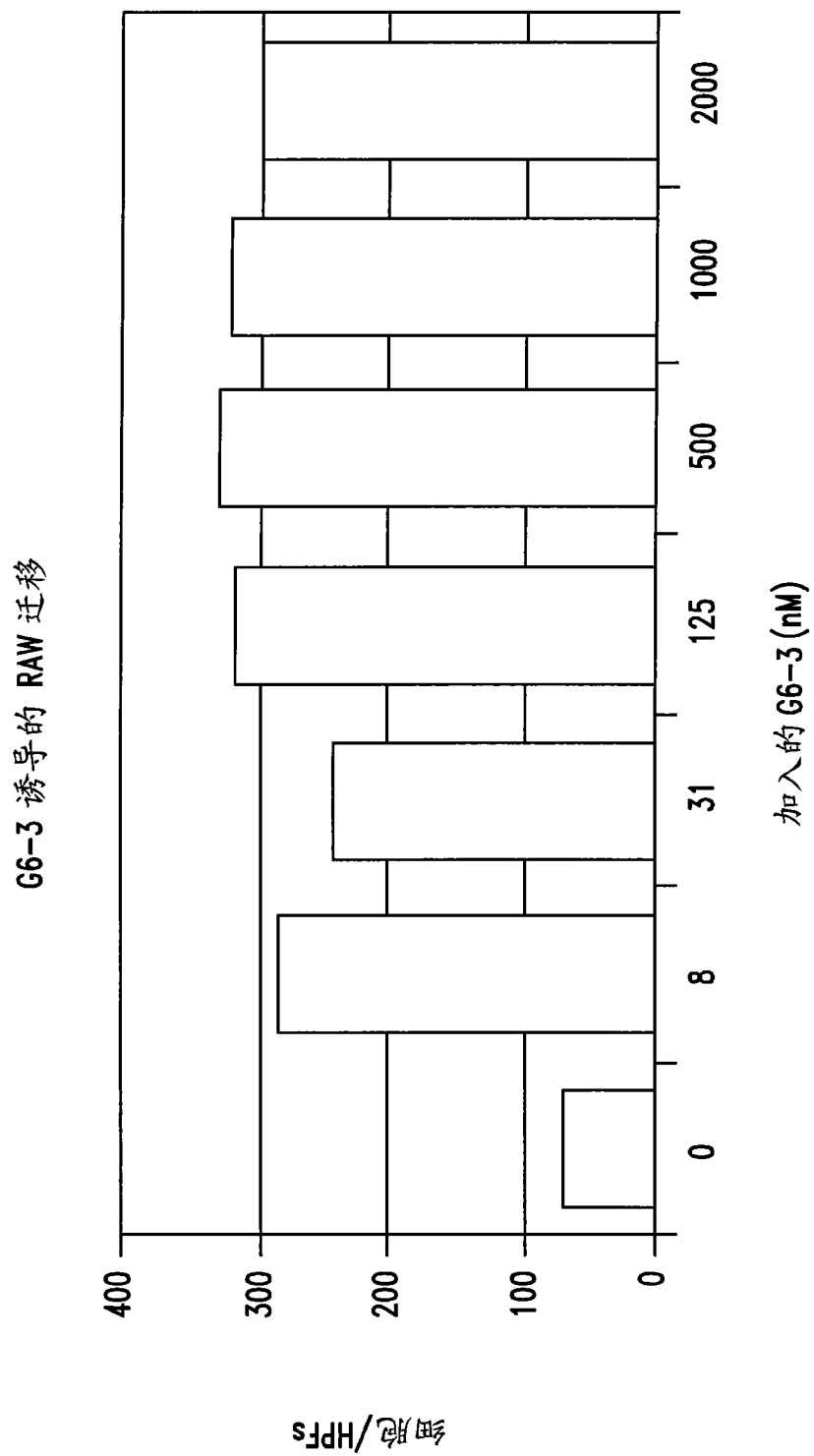


图11A

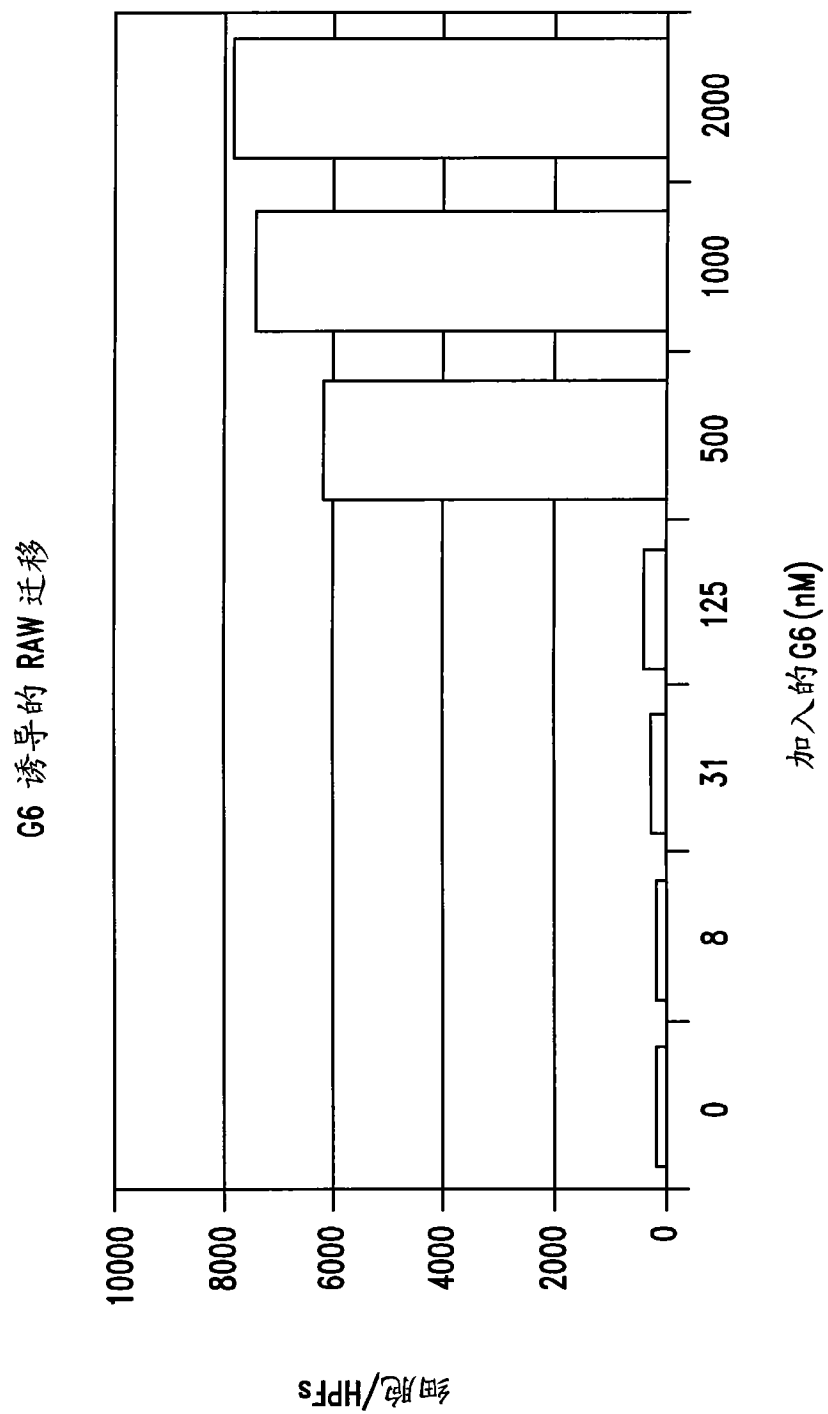


图11B

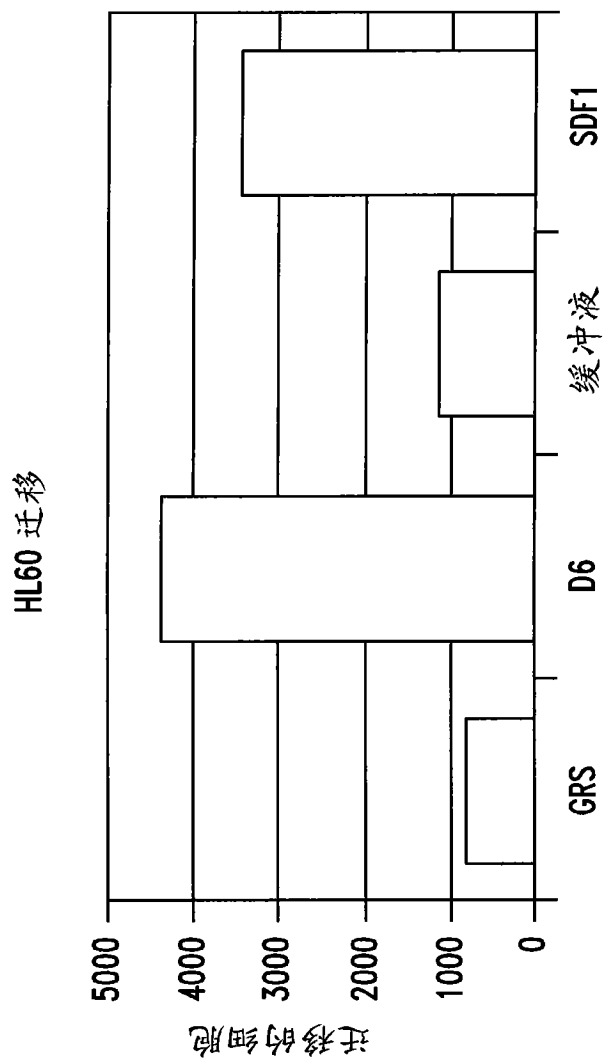


图12

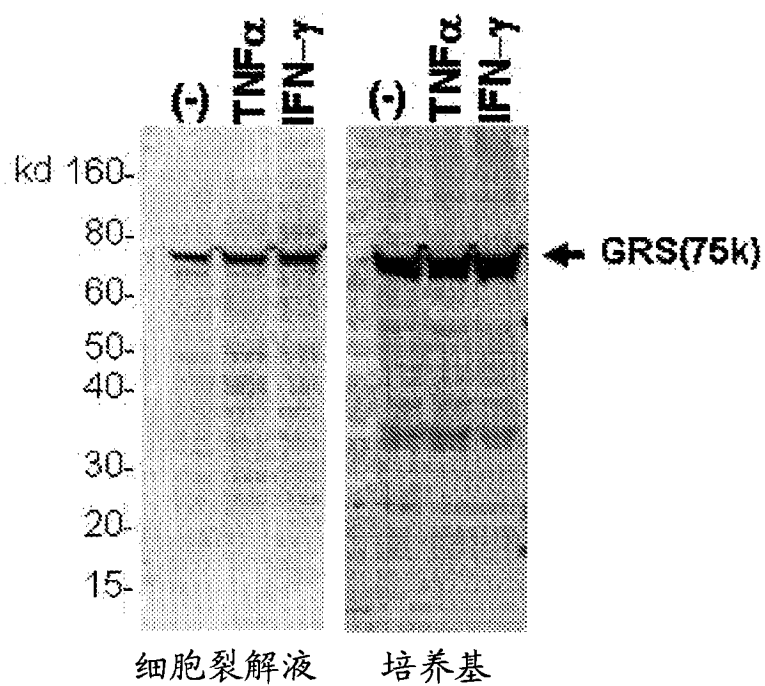


图13

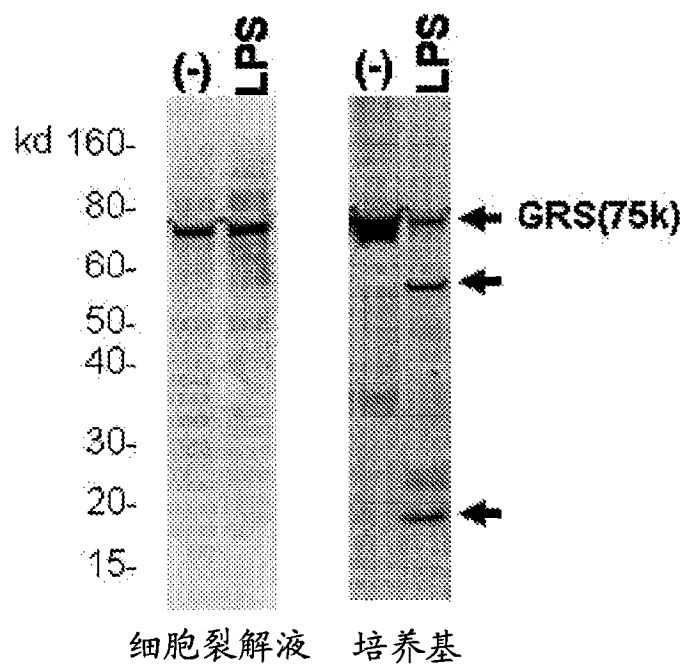


图14

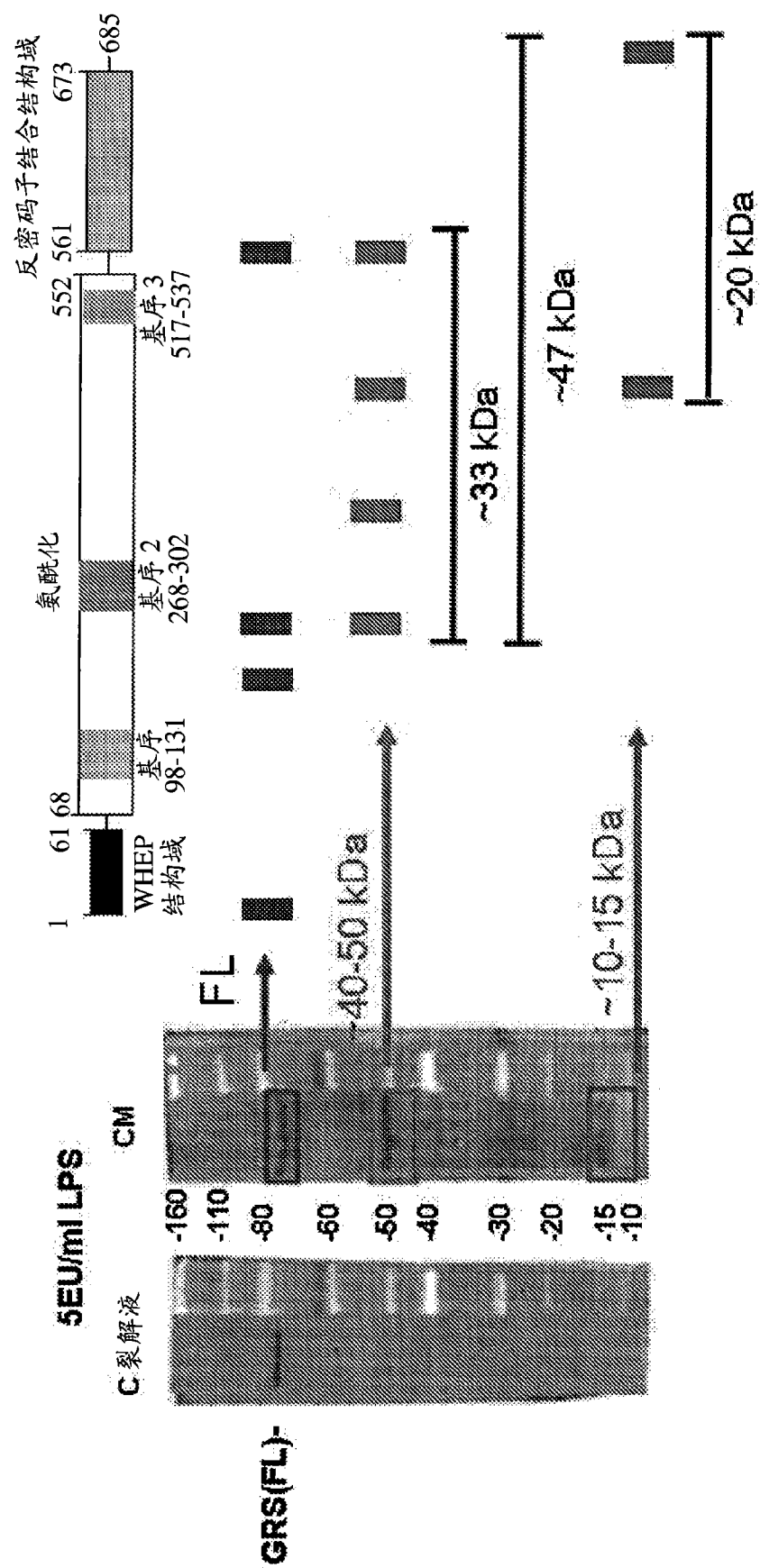


图15

上清条带 9: GRS (片段) MW:~45-50 kd

质谱计数: 19 (覆盖的肽已加粗)

MDGAGAEVLAPLRLAVRQ

QGD LVRKLKEDKAPQVDVDKAVAELKARKRVLEAKELALQPKDDIVDRAKMEDTLKRRFF
YDQAF AIYGGVSGLYDFGPVGCALKNNIIQTWRQHFIQEEQILEIDCTMLTPEPVLKTS
HVDKFADFMVKDVKNGEFCFRADHLLKAHLQKLMSDKKCSVEKKSEMESVLAQLDNYGQQE
LADLFVNYNVKSPITGNDLSPPVSFNLMFKTFIGPGGNMPGYLRPETAQGIFLNFKRLLE
FNQ GK**LPFAAAQIGNSFR**NEISPRSGLIRVREFTMAEIEHFVDPSEKDHPKFQNVADLHL
YLYSAKAQVSGQSARKMRLGDAVEQGVINNTVLGYFIGRI**IYLYLTK**VGISPDKLRFRQHM
ENEMAHYACDCWDAESKTSYGWIEIVGCADRSCYDLSCHARATKVPLVAEKPLKEPKTVN
VVQFEPSKGAIGKAYKKDAKLVM EYLAICDECYITEMEMLLNEK**GEFTIETEGK**TFQLTK
DMINVKRFQKTLYVEEVVPNVIEPSFGLGRIMYTVFEHTFHVREGDEQRT**FFSFPAVVAP**
FKCSVLPLSQNQEFMPFVKELSEALTRHGVSHKVDDSSGSIGRRYARTDEIGVAFGVTID
FDTVNKTPHTATLRDRDSMRQIRAEISELPSIVQDLANGNITWADVEARYPLFEGQETGK
KETIEE

图16A

上清条带 18: GRS (片段) MW:~15 kd

质谱计数: 3, (覆盖的肽已加粗)

MDGAGAEVLAPLRLAVRQ

QGD LVRKLKEDKAPQVDVDKAVAELKARKRVLEAKELALQPKDDIVDRAKMEDTLKRRFF
YDQAF AIYGGVSGLYDFGPVGCALKNNIIQTWRQHFIQEEQILEIDCTMLTPEPVLKTS
HVDKFADFMVKDVKNGEFCFRADHLLKAHLQKLMSDKKCSVEKKSEMESVLAQLDNYGQQE
LADLFVNYNVKSPITGNDLSPPVSFNLMFKTFIGPGGNMPGYLRPETAQGIFLNFKRLLE
FNQ GK**LPFAAAQIGNSFR**NEISPRSGLIRVREFTMAEIEHFVDPSEKDHPKFQNVADLHL
YLYSAKAQVSGQSARKMRLGDAVEQGVINNTVLGYFIGRIYLYLTKVGISPDKLRFRQHM
ENEMAHYACDCWDAESKTSYGWIEIVGCADRSCYDLSCHARATKVPLVAEKPLKEPKTVN
VVQFEPSKGAIGKAYKKDAKLVM EYLAICDECYITEMEMLLNEK**GEFTIETEGK**TFQLTK
DMINVKRFQKTLYVEEVVPNVIEPSFGLGRIMYTVFEHTFHVREGDEQRT**FFSFPAVVAP**
FKCSVLPLSQNQEFMPFVKELSEALTRHGVSHKVDDSSGSIGRRYARTDEIGVAFGVTID
FDTVNKTPHTATLRDRDSMRQIRAEISELPSIVQDLANGNITWADVEARY**PLFEGQETGK**
KETIEE

图16B