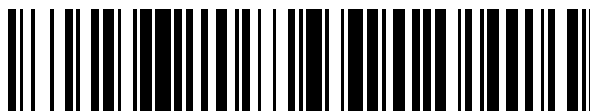


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 951**

51 Int. Cl.:

A61K 38/53 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2010** **E 10793402 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015** **EP 2509625**

54 Título: **Histidil ARNt sintetasas para reducir la inflamación**

30 Prioridad:

11.12.2009 US 285913 P

11.12.2009 US 285923 P

11.12.2009 US 285919 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.05.2015

73 Titular/es:

ATYR PHARMA, INC. (100.0%)
3565 General Atomics Court, Suite 103
San Diego, CA 92121, US

72 Inventor/es:

WATKINS, JEFFRY DEAN;
VASSEROT, ALAIN P.;
GREENE, LESLIE ANN;
ADAMS, RYAN ANDREW;
CHIANG, KYLE P.;
ZHANG, WEI;
PIEHL, KRISTI HELEN;
HONG, FEI y
HE, ALINA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 535 951 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Histidil ARNt sintetasa para reducir la inflamación

Antecedentes

Campo técnico

- 5 La presente descripción se refiere generalmente a composiciones que comprenden polipéptidos aminoacil-ARNt sintetasa, incluyendo truncamientos, fragmentos proteolíticos, y/o variantes de éstos, y al uso de dichas composiciones para modular la inflamación y otras respuestas celulares.

Descripción de la técnica relacionada

- 10 Las aminoacil-ARNt sintetasa, que catalizan la aminoacilación de moléculas de ARNt, son esenciales para descodificar la información genética durante el proceso de la traducción. En los eucariotas superiores, las aminoacil-ARNt sintetasa se asocian con otros polipéptidos para formar complejos multienzimáticos supramoleculares. Cada una de las ARNt sintetasa eucariotas consiste en una enzima central, que está relacionada de cerca con el equivalente procariota de la ARNt sintetasa, y uno o más dominios adicionales que están unidos al extremo amino-terminal o carboxilo-terminal de la enzima central. La tirosil-ARNt sintetasa humana (YRS), por ejemplo, tiene un
- 15 dominio carboxilo-terminal que no es parte de las moléculas YRS procariotas o eucariotas inferiores.

Las aminoacil-ARNt sintetasa, tales como tirosil-ARNt sintetasa, triptófano-ARNt sintetasa, y otras, están asociadas con funciones expandidas en células de mamíferos, incluyendo actividades en las rutas de transducción de la señal, entre otras.

- 20 Park Sang Gyu et al. (IUBMB LIFE, vol. 58, no. 9, 2006, p. 556-558) se refiere a aminoacil-ARNt sintetasa y sus funciones distintas de en la síntesis de proteínas. Park Sang Gyu et al. sugiere un papel para HRS en la mediación de la enfermedad inflamatoria.

Brown MV et al. (Vascular Pharmacology, vol. 52, no. 1-2, 2010, p. 21-26) enseña que la histidil-ARNt sintetasa (HisRS) tiene una función pro-inflamatoria a través de su interacción con los receptores de quimioquina de la superficie celular.

Resumen breve

- 25 Las realizaciones de la presente invención surgen del descubrimiento inesperado de que composiciones que comprenden polipéptidos aminoacil-ARNt sintetasa (AARS), incluyendo fragmentos truncados, fragmentos proteolíticos, y variantes de éstos, modulan respuestas inflamatorias, y de esta manera modulan la inflamación. Estos polipéptidos AARS son útiles, por lo tanto, en el tratamiento de una variedad de enfermedades o afecciones inflamatorias.
- 30

De acuerdo con esto, la presente invención está dirigida a la reivindicación 1.

- 35 Determinadas realizaciones descritas en la presente memoria incluyen un fragmento proteolítico del polipéptido HRS. En determinadas realizaciones, la secuencia del fragmento proteolítico se obtiene incubando el polipéptido con una proteasa in vitro. En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, la secuencia del fragmento proteolítico se obtiene expresando recombinantemente el polipéptido HRS en una célula, en el que la célula comprende una o más proteasas recombinantes o endógenas. En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, el fragmento proteolítico comprende la secuencia de un fragmento proteolítico HRS humano o de ratón endógeno, natural.

- 40 La aminoacil-ARNt sintetasa para uso según la presente invención es un polipéptido HisRS. Determinadas realizaciones comprenden polipéptido HisRS variante de corte y empalme. En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, el polipéptido HisRS comprende al menos el dominio WHEP de HisRS. En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, el polipéptido HisRS comprende al menos el dominio de unión anticodón de HisRS. En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, el polipéptido HisRS carece de un dominio de aminoacilación funcional. En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, el polipéptido HisRS comprende al menos el dominio WHEP de HisRS y el dominio de unión anticodón de HisRS pero carece de un dominio de aminoacilación funcional. En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, el polipéptido HisRS comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO:28. En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, el polipéptido HisRS comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 90%, 95%, 98%, ó 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:28. En determinadas realizaciones
- 45
- 50 descritas en la presente memoria, el polipéptido HisRS comprende al menos 400 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia mostrada en SEQ ID NO:28.

La reducción de una respuesta inflamatoria puede incluir poner en contacto una célula con una concentración efectiva de un polipéptido HRS que tiene una actividad moduladora de la respuesta inflamatoria, reduciendo de esta manera la respuesta inflamatoria.

- En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, la célula es una célula inmune o una célula vascular. En determinadas realizaciones, la célula inmune es un granulocito, linfocito, monocito/macrófago, célula dendrítica, o mastocito. En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, el granulocito es un neutrófilo, eosinófilo, o basófilo. En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, el linfocito es una
- 5 célula B, célula T CD8+, célula T CD4+, célula asesina natural, o célula T $\gamma\delta$. En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, la célula vascular es una célula de músculo liso, células endoteliales, o fibroblasto.
- La célula puede ponerse en contacto in vitro o ex vivo. La célula puede administrarse a un sujeto. La célula puede ponerse en contacto en un sujeto mediante la administración directa del polipéptido HRS al sujeto.
- Puede reducirse una respuesta inflamatoria aguda, puede reducirse una respuesta inflamatoria crónica, o ambas.
- 10 Puede incluir modular la activación, secreción de moléculas inflamatorias, proliferación, actividad, migración, o adhesión de una o más células inmunes o células vasculares. Puede incluir modular los niveles o actividad de una o más moléculas inflamatorias.
- En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, la una o más moléculas inflamatorias comprenden moléculas inflamatorias derivadas de plasma de una cualquiera o más del sistema del complemento, sistema
- 15 quinina, sistema de coagulación, o sistema de fibrinólisis. En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, la una o más moléculas inflamatorias comprenden moléculas inflamatorias derivadas de células de una cualquiera o más de gránulos de lisosomas, aminos vasoactivas, eicosanoides, citoquinas, proteínas de fase aguda, u óxido nítrico. En determinadas realizaciones, la una o más citoquinas se seleccionan de las citoquinas en las
- 20 Tablas J y K. Determinadas realizaciones incluyen modular los niveles o actividad de uno cualquiera o más de TNF- α , IL-2, MIP-1 β , IL-12(p40), KC, MIP-2, o IL-10.
- Se describe una reducción de una respuesta inflamatoria o afección inflamatoria asociada con uno o más tejidos, sistemas de tejido, u órganos seleccionados de piel, folículos pilosos, sistema nervioso, sistema auditivo u órganos de equilibrio, sistema respiratorio, tejidos gastroesofágicos, sistema gastrointestinal, sistema vascular, hígado,
- 25 vesícula biliar, sistema linfático/inmune, sistema uro-genital, sistema músculo-esquelético, tejido adiposo, mamas, y sistema endocrino.
- También se describe el tratamiento de hipersensibilidad seleccionada de hipersensibilidad de tipo I, hipersensibilidad de tipo II, hipersensibilidad de tipo III, hipersensibilidad de tipo IV, hipersensibilidad inmediata, hipersensibilidad mediada por anticuerpo, hipersensibilidad mediada por complejo inmune, hipersensibilidad mediada por linfocitos T, e hipersensibilidad de tipo retrasada.
- 30 También se describe el tratamiento de de una afección auto-inflamatoria seleccionada de fiebre mediterránea familiar, síndrome periódico asociado con el receptor de TNF (TRAPS), síndrome de hiper-IgD (HIDS), enfermedades relacionadas con CIAS1 tales como síndrome de Muckle-Wells, síndrome auto-inflamatorio frío familiar, y enfermedad inflamatoria multisistema de inicio neonatal, síndrome PAPA (artritis estéril pirogénica, pioderma gangrenoso, acné), y síndrome de Blau.
- 35 También se describe el tratamiento de inflamación asociada con un cáncer seleccionado de cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de pulmón, cáncer de ovarios, cáncer testicular, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de cerebro, melanoma, cáncer de piel no melanoma, cáncer de hueso, linfoma, leucemia, cáncer de tiroides, cáncer endometrial, mieloma múltiple, leucemia mieloide aguda, neuroblastoma, glioblastoma, y linfoma no de Hodgkin.
- 40 También se describe el tratamiento de inflamación asociada con el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS). También se describe el tratamiento de inflamación asociada con tormenta de citoquinas. También se describe el tratamiento de inflamación asociada con uno cualquiera o más de inflamación granulomatosa, inflamación fibrinosa, inflamación purulenta, inflamación serosa, o inflamación ulcerosa. También se describe el tratamiento de inflamación asociada con una o más heridas. El uso incluye el tratamiento de inflamación asociada
- 45 con el trastorno pulmonar obstructivo crónico (COPD).
- También se describe en la presente memoria la reducción de una afección inflamatoria asociada con la actividad de una o más células inmunes o células vasculares. En determinadas realizaciones, la célula inmune es un granulocito, linfocito, monocito/macrófago, célula dendrítica, o mastocito. En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, el granulocito es un neutrófilo, eosinófilo, o basófilo. En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, el linfocito es una célula B, célula T, célula asesina natural. En determinadas realizaciones
- 50 descritas en la presente memoria, la célula vascular es una célula de músculo liso, células endoteliales, o fibroblasto. En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, la afección inflamatoria es una afección mediada por neutrófilos, una afección mediada por macrófagos, o una afección mediada por linfocitos.
- También se describen polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos y proteínas de fusión como se describe en la presente memoria, así como vectores de expresión que comprenden dichos polinucleótidos, y célula huésped que comprende dichos vectores de expresión.
- 55

También se describen composiciones, por ejemplo composiciones farmacéuticas, que comprenden vehículos fisiológicamente aceptables y al menos uno de los polipéptidos aislados, proteínas de fusión, anticuerpos, polinucleótidos aislados, vectores de expresión, células huésped, etc., de la invención, como se describe en la presente memoria.

- 5 También se describen métodos para modular una actividad celular mediante la puesta en contacto de una célula o tejido con una composición de la invención, como se describe en la presente memoria, en el que la actividad celular que se va a modular se selecciona del grupo que consiste en proliferación celular, apoptosis, señalización celular, metabolismo celular, angiogénesis, migración celular, unión celular, producción de citoquinas, y semejantes.

- 10 También se describe el tratamiento de una enfermedad, trastorno u otra afección en un sujeto que lo necesita mediante la administración de una composición según la presente invención. Dichas enfermedades, trastornos o afecciones pueden incluir, pero no están limitados a, cáncer, enfermedad o afección inflamatoria, enfermedad inmune (incluyendo enfermedad autoinmune) y/o afecciones asociadas con angiogénesis anormal.

Listado de secuencias

SEQ ID NO:1 es la secuencia de aminoácidos de longitud completa de tirosil-ARNt sintetasa (YRS) humana.

- 15 SEQ ID NO:2 es la secuencia de aminoácidos de una variante Y341A de YRS humana de longitud completa.

SEQ ID NO:3 es la secuencia de aminoácidos de una YRS humana truncada en el C-terminal (aminoácidos 1-364).

SEQ ID NO:4 es una secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de longitud completa de YRS humana (SEQ ID NO: 1).

SEQ ID NO:5 muestra la secuencia de una etiqueta de ocho aminoácidos.

- 20 SEQ ID NO:6 es la secuencia de aminoácidos de la variante de corte y empalme de YRS humana SP1.

SEQ ID NO:7 es la secuencia de polinucleótido que codifica la variante de corte y empalme de YRS humana SP1 (SEQ ID NO:6).

SEQ ID NO:8 es la secuencia de aminoácidos de la variante de corte y empalme de YRS humana SP2.

- 25 SEQ ID NO:9 es la secuencia de polinucleótido que codifica la variante de corte y empalme de YRS humana SP2 (SEQ ID NO:8).

SEQ ID NO:10 es la secuencia de aminoácidos de la variante de corte y empalme de YRS humana SP3.

SEQ ID NO:11 es la secuencia de polinucleótido que codifica la variante de corte y empalme de YRS humana SP3 (SEQ ID NO:10).

SEQ ID NO:12 es la secuencia de aminoácidos de la variante de corte y empalme de YRS humana SP4.

- 30 SEQ ID NO:13 es la secuencia de polinucleótido que codifica la variante de corte y empalme de YRS humana SP4 (SEQ ID NO:12).

SEQ ID NO:14 es la secuencia de aminoácidos de la variante de corte y empalme de YRS humana SP5.

SEQ ID NO:15 es la secuencia de polinucleótido que codifica la variante de corte y empalme de YRS humana SP5 (SEQ ID NO:14).

- 35 SEQ ID NO:16 es la secuencia de aminoácidos de longitud completa de glicil-ARNt sintetasa (GlyRS) citoplásmica humana.

SEQ ID NO: 17 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido GlyRS de SEQ ID NO:16.

SEQ ID NOS:18-24 representan secuencias peptídicas ilustrativas analizadas en la determinación de límites del fragmento GlyRS.

- 40 SEQ ID NO:25 es la secuencia de aminoácidos de longitud completa de glutaminil-ARNt sintetasa (QRS) humana.

SEQ ID NOS:26 y 27 representan secuencias peptídicas ilustrativas analizadas en la determinación de límites del fragmento QRS.

SEQ ID NO:28 es la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la proteína histidil-ARNt sintetasa (HisRS) (NP_002100.2).

SEQ ID NO:29 es una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de la variante de corte y empalme HisRS-SV9.

SEQ ID NO:30 es la secuencia de aminoácidos del polipéptido variante de corte y empalme HisRS-SV9 codificado por SEQ ID NO:29.

- 5 SEQ ID NO:31 es una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de la variante de corte y empalme HisRS-SV11.

SEQ ID NO:32 es la secuencia de aminoácidos del polipéptido variante de corte y empalme HisRS-SV11 codificado por SEQ ID NO:31.

SEQ ID NO:33 es la secuencia de aminoácidos de la isoforma principal de triptofanil-ARNt sintetasa (WRS) humana.

- 10 SEQ ID NO:34 es la secuencia de aminoácidos de una variante truncada (T2) de WRS humana.

SEQ ID NO:35 es la secuencia de aminoácidos de una variante truncada (Toltrup) de WRS humana.

SEQ ID NOS:36-103 representan varios fragmentos peptídicos endógenos de QRS humana.

SEQ ID NO: 104 es la secuencia de aminoácidos de una variante de corte y empalme de fenilalanil-ARNt sintetasa (PheRS) humana (PheRS_SV1P).

- 15 SEQ ID NO: 105 es la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de longitud completa aspartil-ARNt sintetasa (AspRS) humana.

SEQ ID NO:106 es la secuencia de aminoácidos de un fragmento N-terminal (F1; aminoácidos 1-471) de WRS humana.

- 20 SEQ ID NO:107 es la secuencia de aminoácidos de una variante de corte y empalme (mini-WRS; aminoácidos 48-471) de WRS humana.

SEQ ID NO:108 es la secuencia de aminoácidos de un fragmento (T1; aminoácidos 71-471) de WRS humana).

SEQ ID NOS:109-115 son fragmentos proteolíticos naturales, endógenos de QRS humana obtenidos de células T Jurkat humanas.

- 25 SEQ ID NO:116 es la secuencia de aminoácidos de longitud completa de glutaminil-ARNt sintetasa (mQRS) de ratón.

SEQ ID NO: 117 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido QRS humano de SEQ ID NO:25.

Breve descripción de los dibujos

- 30 La Figura 1 muestra los efectos de polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa en la migración de neutrófilos en los pulmones. La Figura 1A muestra los efectos para Y341A, y la Figura 1B muestra los efectos para mini-YRS, comparado con células control positivo tratadas con dexametasona y células control no tratadas (véase el Ejemplo 1).

La Figura 2 muestra los efectos de polipéptidos histidil-ARNt sintetasa en la migración de granulocitos en los pulmones. La Figura 2A muestra una migración reducida de neutrófilos, y la Figura 2B muestra una migración reducida de eosinófilos (véase el Ejemplo 1).

- 35 La Figura 3 muestra que los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa estimulan la migración de líneas celulares 293 y CHO transfectadas con el receptor CXCR-2 (véase el Ejemplo 2). El gráfico izquierdo en la Figura 24 muestra los resultados para células 293/CXCR-2, y el gráfico derecho en la Figura 24 muestra los resultados para células CHO/CXCR-2.

- 40 La Figura 4 muestra los efectos estimuladores de polipéptidos YRS en la migración de células polimorfonucleares (PMN) (véase el Ejemplo 3).

- 45 La Figura 5 muestra la liberación de citoquinas in vivo e in vitro en respuesta al polipéptido D1 AspRS (aminoácidos 1-154 de SEQ ID NO:105). La Figura 5A muestra los niveles séricos circulantes de TNF- α e IL-10 en ratones a los que se inyectaron intravenosamente 10mg/kg de D1. TNF- α se incrementa en puntos tempranos de tiempo pero se aclara rápidamente mientras la citoquina anti-inflamatoria, IL-10, muestra un curso prolongado de tiempo. La Figura 5B muestra los niveles séricos in vivo para cinco citoquinas de ratones a los que se inyectó D1. La Figura 5C muestra el análisis in vitro de PBMC estimuladas con D1, con un incremento en TNF- α a las 4 horas que es marcadamente superior que el DRS de longitud completa. La Figura 5D muestra que los niveles secretados de IL-10 se incrementan significativamente a las 24 horas después de tratamiento de PBMC con D1.

La Figura 6 muestra que los polipéptidos variantes de corte y empalme recombinantes HRS-SV9 y HRS-SV11 aumentan la secreción de IL-2 en células T Jurkat activadas. Las células se trataron con PMA (25 ng/ml) más yonomicina (250 ng/ml) con o sin HRS-SV9 o HRS-SV11, y el medio se analizó 48 horas después por ELISA.

La Figura 7 muestra que PBMC estimuladas con HRS-SV9 secretan TNF- α de una manera dependiente de la dosis.

- 5 Las Figuras 8A-8C muestran la estructura de dominio y la secuencia de aminoácidos de QRS (SEQ ID NO:25), e ilustran la separación por SDS-PAGE de fragmentos de QRS (SEQ ID NOS: 116 y 117) generados por proteólisis endógena de QRS de longitud completa.

La Figura 9 muestra los fragmentos de QRS (designados Q1, Q2, Q3, y Q4) que se clonaron en un vector de expresión de proteína de E. coli para la sobreexpresión y purificación.

- 10 La Figura 10 muestra que el pretratamiento con los cuatro fragmentos de QRS (Q1, Q2, Q3, y Q4) inhibió la cantidad de TNF- α liberada de PBMC después de estimulación con 0,5 EU/ml de LPS.

La Figura 11 muestra que el pretratamiento con el fragmento Q4 inhibió la cantidad de TNF- α liberada de PBMC después de estimulación con 0,5 EU/ml de LPS, después de 4 y 24 horas.

- 15 La Figura 12 muestra que el pretratamiento con el fragmento Q4 de QRS inhibió la cantidad de IL-12(p40) liberada de PBMC después de estimulación con LPS.

Las Figuras 13A a 13C muestran los efectos inhibidores de polipéptidos AARS en la migración de células THP-1. La Figura 13A muestra los efectos inhibidores de HisRS en la migración de THP-1 al quimioatrayente CCL-23, la Figura 13B muestra los efectos inhibidores de AspRS en la migración de THP-1 al quimioatrayente CCL-23, y la Figura 13C muestra los efectos inhibidores del polipéptido p43 en la migración de THP-1 al quimioatrayente CCL-5.

- 20 La Figura 14 muestra una Plataforma de Análisis de Migración y Topografía de Proteínas (PROTOMAP) de fracciones de péptido QRS citosólicas (azul) y de medio condicionado (rojo) de macrófagos, junto con una representación de la secuencia del polipéptido QRS; (morado) indica que el péptido se encontró tanto en fracciones citosólicas como de medio condicionado. Véase el Ejemplo 5.

- 25 Las Figuras 15A-15D muestran las secuencias de aminoácidos de fragmentos peptídicos de QRS naturales, endógenos que corresponden al PROTOMAP de la Figura 14. En estas figuras, (azul; en *itálica*) corresponde a péptidos detectados en el citosol, (rojo; subrayado) corresponde a péptidos detectados en el medio condicionado, y (morado; en *itálica* y subrayado) corresponde a péptidos detectados en ambas muestras. La Figura 15A muestra los fragmentos peptídicos para la banda 6 (QRS de longitud completa), la Figura 15B muestra los fragmentos peptídicos para la banda 9 (fragmento QRS C-terminal), y las Figuras 15C-D muestran los fragmentos peptídicos para las
30 bandas 19 y 20 (fragmento QRS N-terminal).

- Las Figuras 16A-16C muestran las secuencias de aminoácidos de péptidos QRS endógenos (azul; en *itálica*) que se obtuvieron de células T Jurkat humanas tratadas con estaurosporina. Las Figuras 18A y 18B muestran los péptidos para las bandas 18 y 19, respectivamente, obtenidos de células T Jurkat tratadas con Estaurospaurina (STS) durante 4 horas. La Figura 18C muestra los péptidos para la banda 18, obtenidos de células T Jurkat tratadas con
35 STS durante 6 horas.

Descripción detallada

La presente invención es como se proporciona en las reivindicaciones.

- La presente invención surge del descubrimiento de que aminoacil-ARNt sintetasas (AARS) y determinados polipéptidos derivados de éstas poseen actividades biológicas no canónicas de relevancia terapéutica. Por lo tanto,
40 según un aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido histidil-ARNt sintetasa (HRS) para uso según la reivindicación 1. Actividad "no canónica", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere generalmente a una actividad poseída por un polipéptido AARS que es distinta de la adición de un aminoácidos en una molécula de ARNt. Como se detalla en la presente memoria, una actividad biológica no canónica presentada por un polipéptido HRS de la invención incluye la reducción de respuestas inflamatorias, incluyendo respuestas inflamatorias agudas y
45 crónicas, respuestas inflamatorias sistémicas, respuestas inflamatorias locales, y respuestas inflamatorias a nivel celular, ya sea in vivo, ex vivo, o in vitro. Los ejemplos de actividades moduladoras de respuestas inflamatorias incluyen, sin limitación, modulación del crecimiento, actividad, o tráfico de varias células inmunes, y modulación de la producción o secreción de varias citoquinas. Por lo tanto, las realizaciones descritas en la presente memoria incluyen polipéptidos HRS, incluyendo truncamientos, variantes de corte y empalme, fragmentos proteolíticos, y
50 variantes de éstos para uso como se define en la reivindicación 1, que modulan la inflamación, disminuyendo una respuesta inflamatoria, y de esta manera poseen actividad terapéuticamente beneficiosa en el tratamiento y profilaxis de enfermedades o afecciones asociadas con la inflamación.

Las ventajas del uso de los polipéptidos AARS sobre otros tratamientos incluyen, por ejemplo, un mecanismo diferente de acción que los tratamientos tradicionales, sinergismo con la señalización basada en inflamación,

potencia superior, y los beneficios asociados con el uso de una molécula des-inmunizada. Otras ventajas serán evidentes para un experto en la técnica.

La práctica de la presente descripción empleará, a no ser que se indique específicamente lo contrario, métodos convencionales de biología molecular y técnicas de ADN recombinante que están dentro de la experiencia de la técnica, muchos de los cuales se describen más adelante para el propósito de ilustración. Dichas técnicas se explican totalmente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3^a Edición, 2000); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I y II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications* (P. Herdewijn, ed., 2004); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames y S. Higgins, eds., 1985); *Nucleic Acid Hybridization: Modern Applications* (Buzdin y Lukyanov, eds., 2009); *Transcription and Translation* (B. Hames y S. Higgins, eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, ed., 1986); *Freshney, R.I. (2005) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, 5^a Ed. Hoboken NJ, John Wiley & Sons; B. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (3^a Edición 2010); Farrell, R., *RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization* (3^a Edición 2005).

Definiciones

A no ser que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por los expertos en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque pueden usarse cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen los métodos y materiales preferidos. Para los propósitos de la presente invención, los términos siguientes se definen más adelante.

Los artículos "un" y "una" se usan en la presente memoria para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, al menos a uno) del objeto gramatical del artículo. Como ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

Por "aproximadamente" se quiere decir una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía tanto como 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1% respecto a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia.

El término "fragmento biológicamente activo", como se aplica a fragmentos de una secuencia de polinucleótido o polipéptido de referencia, se refiere a un fragmento que tiene al menos aproximadamente 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000% o más de la actividad de una secuencia de referencia. Están incluidos en el alcance de la presente descripción fragmentos biológicamente activos con una longitud de al menos 400, 420, 440, 460, 480, 500 o más residuos de aminoácidos contiguos, incluyendo todos los números enteros intermedios, que comprenden o codifican una actividad reductora de la respuesta inflamatoria de un polipéptido HRS de SEQ ID NO: 28.

Los fragmentos biológicamente activos también incluyen variantes de corte y empalme naturales de una secuencia AARS de referencia, así como fragmentos proteolíticos de polipéptidos AARS.

Los "fragmentos proteolíticos", o la secuencia de fragmentos proteolíticos, pueden identificarse u obtenerse según una variedad de técnicas. Por ejemplo, como se ejemplifica en la presente memoria, los fragmentos proteolíticos pueden identificarse in vitro, tal como incubando polipéptidos AARS con proteasas seleccionadas, o pueden identificarse endógenamente (es decir, in vivo). En determinadas realizaciones, los fragmentos proteolíticos endógenos pueden generarse o identificarse, por ejemplo, expresando recombinantemente polipéptidos AARS en un microorganismo seleccionado o célula eucariota que se ha modificado para contener una o más proteasas seleccionadas, o que naturalmente contiene una o más proteasas que son capaces de actuar sobre un polipéptido AARS, y aislando y caracterizando los fragmentos proteolíticos producidos endógenamente de éstos. Los ejemplos de dichos fragmentos proteolíticos incluyen Q1-Q4, como se describe en la presente memoria, así como los fragmentos proteolíticos ilustrados en las Tablas C-I, incluyendo variantes de éstos.

Los fragmentos proteolíticos endógenos naturales pueden generarse o identificarse, por ejemplo, a partir de varias fracciones celulares (por ejemplo, citosólica, de membrana, nuclear) y/o medio de crecimiento de varios tipos celulares, incluyendo, por ejemplo, macrófagos tales como macrófagos RAW (por ejemplo, macrófagos RAW 264.7; véase el Ejemplo 5), células T, incluyendo células T primarias y líneas de células T tales como Jurkats, y células asesinas naturales (NK), entre otras. Los fragmentos proteolíticos endógenos, generados de cualquier forma, pueden identificarse por técnicas tales como espectrometría de masa, o técnicas equivalentes. Una vez se ha generado o identificado un fragmento proteolítico identificado in vitro o endógenamente, puede secuenciarse y clonarse en un vector de expresión para la producción recombinante, o producirse sintéticamente.

Los fragmentos biológicamente activos representativos generalmente participan en una interacción, por ejemplo, una interacción intramolecular o inter-molecular. Una interacción inter-molecular puede ser una interacción de unión específica o una interacción enzimática. Una interacción inter-molecular puede ser entre un polipéptido AARS y una molécula diana, tal como otro polipéptido AARS o una molécula diana implicada en la modulación del proceso de inflamación (por ejemplo, producción o secreción de citoquinas, migración o reclutamiento de células inmunes,

respuesta celular inmune a antígenos propios o extraños, adhesión). Los fragmentos biológicamente activos de un polipéptido HRS incluyen fragmentos polipeptídicos que comprenden secuencias de aminoácidos con una similitud o identidad suficiente respecto a, o que se obtienen de, las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 28, incluyendo partes biológicamente activas de éstos

- 5 Por "secuencia codificadora" se quiere decir cualquier secuencia de ácido nucleico que contribuye a codificar el producto polipeptídico de un gen. Por el contrario, el término "secuencia no codificadora" se refiere a cualquier secuencia de ácido nucleico que no contribuye a codificar el producto polipeptídico de un gen.

A lo largo de esta especificación, a no ser que el contexto requiera otra cosa, las palabras "comprenden," "comprende," y "que comprende" se entenderá que implican la inclusión de una etapa o elemento o grupo de etapas o elementos indicado pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos.

10 Por "consiste en" se quiere decir que incluye, y se limita a, lo que sea que sigue la expresión "que consiste en." Así, la expresión "que consiste en" indica que los elementos listados se requieren o son obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos. Por "consiste esencialmente en" se quiere decir que incluye cualesquiera elementos listados después de la expresión, y que está limitado a otros elementos que no interfieren con o contribuyen a la actividad o acción especificada en la descripción para los elementos listados. Así, la expresión "que consiste esencialmente en" indica que los elementos listados se requieren o son obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes dependiendo de si afectan o no materialmente la actividad o acción de los elementos listados.

15 Los términos "complementario" y "complementariedad" se refieren a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados por las reglas de emparejamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia "A-G-T," es complementaria a la secuencia "T-C-A." La complementariedad puede ser "parcial," en la que sólo algunas de las bases de los ácidos nucleicos concuerdan según la reglas del emparejamiento de bases. O, puede haber complementariedad "completa" o "total" entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre cadenas de ácido nucleico tiene efectos significativos en la eficiencia y fuerza de la hibridación entre cadenas de ácido nucleico.

20 Por "corresponde a" o "que corresponde a" se quiere decir (a) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica o complementaria a toda o parte una secuencia de polinucleótido de referencia o que codifica una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de aminoácidos en un péptido o proteína; o (b) un péptido o polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a una secuencia de aminoácidos en un péptido o proteína de referencia.

25 Por "derivado" se quiere decir un polipéptido que se ha derivado de la secuencia básica por modificación, por ejemplo por conjugación o formación de un complejo con otros restos químicos (por ejemplo, pegilación) o por técnicas de modificación posterior a la traducción como se entenderá en la técnica. El término "derivado" también incluye en su alcance alteraciones que se han hecho a una secuencia parental incluyendo adiciones o deleciones que proporcionan moléculas funcionalmente equivalentes.

Tal y como se usa en la presente memoria, los términos "función" y "funcional" y semejantes se refieren a una función biológica, enzimática, o terapéutica.

30 Por "gen" se quiere decir una unidad de herencia que ocupa un locus específico en un cromosoma y consiste en secuencias reguladoras de la transcripción y/o traducción y/o una región codificadora y/o secuencias no traducidas (por ejemplo, intrones, secuencias no traducidas 5' y 3').

35 "Homología" se refiere al número en porcentaje de aminoácidos que son idénticos o constituyen sustituciones conservativas. La homología puede determinarse usando programas de comparación de secuencias tales como GAP (Deveraux et al., 1984, Nucleic Acids Research **12**, 387-395). De esta manera, las secuencias con una longitud similar o sustancialmente diferente a las citadas en la presente memoria podrían compararse por inserción de huecos en el alineamiento, determinándose dichos huecos, por ejemplo, por el algoritmo de comparación usado por GAP.

40 El término "célula huésped" incluye una célula individual o cultivo celular que puede ser o ha sido un receptor de cualquier vector o vectores recombinantes o polinucleótido aislado de la invención. Las células huésped incluyen la progenie de una única célula huésped, y la progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN total) a la célula parental original debido a mutación y/o cambio natural, accidental, o deliberado. Una célula huésped incluye células transfectadas o infectadas in vivo o in vitro con un vector recombinante o un polinucleótido de la invención. Una célula huésped que comprende un vector recombinante es una célula huésped recombinante.

45 Por "aislado" se quiere decir material que carece sustancialmente o esencialmente de componentes que normalmente le acompañan en su estado nativo. Por ejemplo, un "polinucleótido aislado," tal y como se usa en la presente memoria, incluye un polinucleótido que se ha purificado de las secuencias que lo flanquean en su estado natural, por ejemplo, un fragmento de ADN del que se han retirado las secuencias que normalmente están

adyacentes al fragmento. Alternativamente, un "péptido aislado" o un "polipéptido aislado" y semejantes, tal y como se usa en la presente memoria, incluye el aislamiento y/o purificación in vitro de una molécula de péptido o polipéptido de su entorno celular natural, y de la asociación con otros componentes de la célula; es decir, no está asociado significativamente con sustancias in vivo.

- 5 Por "obtenido de" se quiere decir que una muestra tal como, por ejemplo, un extracto de polinucleótido o extracto de polipéptido se aísla de, o se obtiene de, una fuente particular del sujeto. Por ejemplo, el extracto puede obtenerse de un tejido o un fluido biológico aislado directamente del sujeto.

El término "oligonucleótido" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un polímero compuesto por una multiplicidad de residuos de nucleótidos (desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o variantes estructurales relacionadas o análogos sintéticos de éstos) unidos mediante enlaces fosfodiéster (o variantes estructurales relacionadas o análogos sintéticos de éstos). Así, aunque el término "oligonucleótido" se refiere típicamente a un polímero de nucleótidos en el que los residuos de nucleótidos y las uniones entre ellos son naturales, se entenderá que el término también incluye en su alcance varios análogos incluyendo, pero no restringido a, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), fósforamidatos, fósforotioatos, fosfonatos de metilo, ácidos 2-O-metil ribonucleicos, y semejantes.

10 El tamaño exacto de la molécula puede variar dependiendo de la aplicación particular. Un oligonucleótido tiene típicamente una longitud bastante corta, generalmente de aproximadamente 10 a 30 residuos de nucleótidos, pero el término puede referirse a moléculas de cualquier longitud, aunque el término "polinucleótido" o "ácido nucleico" se usa típicamente para oligonucleótidos grandes.

El término "unido de manera operativa" tal y como se usa en la presente memoria significa poner un gen estructural bajo el control regulador de un promotor, que entonces controla la transcripción y opcionalmente la traducción del gen. En la construcción de combinaciones de genes promotor/estructural heterólogas, se prefiere generalmente posicionar la secuencia genética o promotor a una distancia del sitio de inicio de la transcripción del gen que es aproximadamente la misma que la distancia entre esa secuencia genética o promotor y el gen que controla en su entorno natural; es decir, el gen del que se obtiene la secuencia genética o promotor. Como se conoce en la técnica,

20 puede acomodarse alguna variación en esta distancia sin pérdida de función. De manera similar, el posicionamiento preferido de un elemento de secuencia reguladora respecto a un gen heterólogo que se va a poner bajo su control se define por el posicionamiento del elemento en su entorno natural; es decir, los genes de los que se obtiene.

La expresión "polinucleótido" o "ácido nucleico" tal y como se usa en la presente memoria designa ARNm, ARN, ARNc, ADNc o ADN. El término se refiere típicamente a la forma polimérica de nucleótidos con una longitud de al menos 10 bases, bien ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas monocatenarias y bicatenarias de ADN.

30

Los términos "variante de polinucleótido" y "variante" y semejantes se refieren a polinucleótidos que presentan identidad de secuencia sustancial con una secuencia de polinucleótido AARS de referencia o polinucleótidos que hibridan con una secuencia AARS de referencia bajo condiciones astringentes que se definen posteriormente en la presente memoria. Estos términos también engloban polinucleótidos que se distinguen de un polinucleótido de referencia por la adición, delección o sustitución de al menos un nucleótido. De acuerdo con esto, los términos variante de polinucleótido" y "variante" incluyen polinucleótidos en los que uno o más nucleótidos se han añadido o delecionado, o reemplazado con nucleótidos diferentes. A este respecto, se entiende bien en la técnica que pueden hacerse determinadas alteraciones incluidas mutaciones, adiciones, delecciones y sustituciones en un polinucleótido de referencia mediante lo cual el polinucleótido alterado retiene la función o actividad biológica del polinucleótido de referencia. Las variantes de polinucleótidos incluyen, por ejemplo, polinucleótidos que tienen al menos 50% (y al menos 51% a al menos 99% y todos los porcentajes de números enteros intermedios) de identidad de secuencia con la secuencia mostrada en SEQ ID NO:4, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, ó 31, o partes de éstas que codifican un fragmento biológicamente activo de un polipéptido AARS. Los términos variante de polinucleótido" y "variante"

35

40

45

"Polipéptido," "fragmento de polipéptido," "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente memoria para hacer referencia a un polímero de residuos de aminoácidos y a variantes y análogos sintéticos de los mismos. Así, estos términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son aminoácidos no naturales sintéticos, tales como un análogo químico de un aminoácido natural correspondiente, así como polímeros de aminoácidos naturales.

50

El término "aminoacil-ARNt sintetasa" (AARS) se refiere generalmente a enzimas que en su forma natural o de tipo salvaje son capaces de catalizar la esterificación de un aminoácido específico o su precursor a uno de todos sus ARNt cognados compatibles para formar un aminoacil-ARNt. En esta actividad "canónica", las aminoacil-ARNt sintetetas catalizan una reacción de dos etapas: en primer lugar, activan su aminoácido respectivo formando un aminoacil-adenilato, en el que el carboxilo del aminoácido se une al fosfato alfa de ATP desplazando pirofosfato, y entonces, cuando se une el ARNt correcto, el grupo aminoacilo del aminoacil-adenilato se transfiere al OH 2' ó 3' terminal del ARNt.

55

Las aminoacil-ARNt sintetetas de clase I tienen típicamente dos restos de secuencia altamente conservados. Estas enzimas aminoacilan en el 2'-OH de un nucleótido de adenosina, y habitualmente son monoméricas o diméricas. Las

aminoacil-ARNt sintetetasas de clase II tienen típicamente tres restos de secuencia altamente conservados. Estas enzimas aminoacilan en el 3'-OH de la misma adenosina, y habitualmente son diméricas o tetraméricas. Los sitios activos de las enzimas de clase II están compuestos principalmente por una lámina β antiparalela de siete cadenas flanqueada por hélices α . Aunque la fenilalanina-ARNt sintetasa es de clase II, aminoacila en el 2'-OH.

Los polipéptidos AARS incluyen tirosil-ARNt sintetetasas (YRS), triptofanil-ARNt sintetetasas (WRS), glutaminil-ARNt sintetetasas (QRS), glicil-ARNt sintetetasas (GlyRS), histidil-ARNt sintetetasas, seril-ARNt sintetetasas, fenilalanil-ARNt sintetetasas, alanil-ARNt sintetetasas, asparaginil-ARNt sintetetasas (AsnRS), aspartil-ARNt sintetetasas (AspRS), cisteinil-ARNt sintetetasas (CysRS), glutamil-ARNt sintetetasas, prolil-ARNt sintetetasas (ProRS), arginil-ARNt sintetetasas, isoleucil-ARNt sintetetasas, leucil-ARNt sintetetasas, lisil-ARNt sintetetasas, treonil-ARNt sintetetasas, metionil-ARNt sintetetasas, y valil-ARNt sintetetasas. Las secuencias de tipo salvaje de longitud completa de estos polipéptidos AARS se conocen en la técnica. También se incluyen en el significado de polipéptidos AARS las proteínas multifuncionales que interaccionan con aminoacil ARNt sintetasa (AIMP), incluyendo AIMP-1 (o p43), AIMP-2 (o p38), y AIMP-3 (o p18).

Las expresiones "polipéptidos," "fragmentos de polipéptidos," "polipéptidos truncados" o "variantes de éstos" mencionadas en la presente memoria engloban, sin limitación, polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos que comparte al menos 50% (y al menos 51% a al menos 99% y todos por porcentajes de números enteros intermedios) de identidad de secuencia con una secuencia AARS de referencia, tal como la secuencia de aminoácidos de un polipéptido AARS humano o de ratón, incluyendo fragmentos biológicamente activos de éste, tales como fragmentos que tienen al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 o más aminoácidos contiguos de las secuencias de referencia, incluyendo todos los números enteros intermedios. Estas expresiones engloban además la variación alélica natural de polipéptidos AARS que puede existir y ocurrir de un género o especie a otro. La secuencia de referencia es la mostrada en SEQ ID NO: 28, según la reivindicación 1.

Los polipéptidos AARS, incluyendo truncamientos, fragmentos, y/o variantes de éste mencionados en la presente memoria, engloban polipéptidos que presentan al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1.000% o más de la actividad biológica específica de un polipéptido AARS de referencia (por ejemplo, una actividad moduladora de la respuesta inflamatoria en un sujeto o in vitro). Meramente como ilustración, la actividad biológica no canónica relacionada con AARS puede cuantificarse, por ejemplo, midiendo la capacidad de un polipéptido AARS para reducir la migración de células inmunes tales como granulocitos a un sitio de inflamación, incluyendo los pulmones, o midiendo el efecto de un polipéptido AARS en una respuesta de las células inmunes frente a un antígeno dado, ya sea propio o extraño. En determinadas realizaciones, los polipéptidos AARS desensibilizan las células inmunes tales como neutrófilos frente a un antígeno, y de esta manera reducen el reclutamiento de estas células en los sitios de inflamación. En determinadas realizaciones, los polipéptidos AARS modulan la respuesta inflamatoria de las células inmunes, o modulan los niveles o actividades de varias moléculas inflamatorias, entre otras. Los modelos in vitro adecuados para ensayar las células inmunes se describen en la presente memoria (véase el Ejemplo 1) y se conocen en la técnica. Los polipéptidos AARS, incluyendo truncamientos y/o variantes de éstos, que tienen una actividad biológica sustancialmente reducida respecto a un polipéptido AARS de referencia son aquellos que presentan menos de aproximadamente 25%, 10%, 5% ó 1% de la actividad específica de un polipéptido HRS de referencia biológicamente activo (es decir, que tienen una actividad no canónica).

La expresión "variante" de polipéptido se refiere a polipéptidos que se distinguen de un polipéptido de referencia por la adición, delección o sustitución de al menos un residuo de aminoácido. En determinadas realizaciones, una variante de polipéptido se distingue de un polipéptido de referencia por una o más sustituciones, que pueden ser conservativas o no conservativas. En determinadas realizaciones, la variante de polipéptido comprende sustituciones conservativas y, a este respecto, se entiende bien en la técnica que algunos aminoácidos pueden cambiarse a otros con propiedades ampliamente similares sin cambiar la naturaleza de la actividad del polipéptido. Las variantes de polipéptidos también engloban polipéptidos en los que uno o más aminoácidos se han añadido o delecionado, o reemplazado con diferentes residuos de aminoácidos.

La presente descripción contempla el uso en los métodos descritos en la presente memoria de variantes de polipéptidos HRS de longitud completa, fragmentos truncados de polipéptidos HRS de longitud completa, variantes de corte y empalme, fragmentos proteolíticos, incluyendo fragmentos proteolíticos endógenos, y variantes de dichos fragmentos, así como sus fragmentos biológicamente activos relacionados. Los fragmentos biológicamente activos de un polipéptido HRS incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente similares a, u obtenidas de, las secuencias de aminoácidos de un (posible) polipéptido HRS de longitud completa de SEQ ID NO: 28.

Típicamente, los fragmentos biológicamente activos comprenden un dominio o resto con al menos una actividad de un polipéptido HRS y pueden incluir uno o más (y en algunos casos todos) de los varios dominios activos, e incluyen fragmentos que tienen una actividad moduladora de la respuesta inflamatoria. En algunos casos, los fragmentos biológicamente activos de un polipéptido HRS tienen una actividad biológica (por ejemplo, modular la secreción de citoquinas, modular la migración de células inmunes) que es única del fragmento particular, truncado, de manera que el polipéptido HRS de longitud completa puede no tener esa actividad. En determinados casos, la actividad biológica puede revelarse separando el fragmento de polipéptido HRS biológicamente activo de las demás

secuencias de polipéptido HRS de longitud completa, o alterando determinados residuos de la secuencia de polipéptido de tipo salvaje HRS de longitud completa para desenmascarar los dominios biológicamente activos. Un fragmento biológicamente activo de un polipéptido HRS truncado puede ser un fragmento de polipéptido que tiene 400, 450, 500 o más aminoácidos contiguos, incluyendo todos los números enteros intermedios, de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 28. En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, un fragmento biológicamente activo comprende una secuencia, dominio, o resto modulador de la respuesta inflamatoria. Las expresiones "identidad de secuencia" o, por ejemplo, que comprende una "secuencia 50% idéntica a," tal y como se usan en la presente memoria, se refieren al grado en el que las secuencias son idénticas en una base nucleótido a nucleótido o una base aminoácido a aminoácido sobre una ventana de comparación. Así, un "porcentaje de identidad de secuencia" puede calcularse comparando dos secuencias alineadas de manera óptima sobre la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que ocurre la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, I) o el residuo de aminoácido idéntico (por ejemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) en ambas secuencias para rendir el número de posiciones concordantes, dividiendo el número de posiciones concordantes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para rendir el porcentaje de identidad de secuencia.

Los términos usados para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos o polipéptidos incluyen "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" tiene una longitud de al menos 12 pero frecuentemente 15 a 18 y habitualmente al menos 25 unidades de monómero, incluyendo residuos de nucleótidos y aminoácidos. Como dos polinucleótidos pueden comprender cada uno (1) una secuencia (es decir, sólo una parte de la secuencia de polinucleótido completa) que es similar entre dos polinucleótidos, y (2) una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencia entre dos (o más) polinucleótidos se llevan a cabo típicamente comparando secuencias de los dos polinucleótidos sobre una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de al menos 6 posiciones contiguas, habitualmente aproximadamente 50 a aproximadamente 100, más habitualmente aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en el que una secuencia se compara con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de alinear de manera óptima las dos secuencias. La ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) de aproximadamente 20% o menos comparado con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El alineamiento óptimo de secuencias para alinear una ventana de comparación puede llevarse a cabo por implementaciones informáticas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Paquete de Software Wisconsin Genetics Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, EEUU) o por inspección y seleccionarse el mejor alineamiento (es decir, el que resulta en el mayor porcentaje de homología sobre la ventana de comparación) generado por cualquiera de los distintos métodos. También puede hacerse referencia a la familia de programas BLAST como se describe por ejemplo por Altschul et al., 1997, Nucl. Acids Res. 25:3389. Una discusión detallada del análisis de secuencias puede encontrarse en la Unidad 19.3 de Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology," John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Capítulo 15.

Un "sujeto," tal y como se usa en la presente memoria, incluye cualquier animal que presenta un síntoma, o presenta riesgo de presentar un síntoma, que puede tratarse bien con un polipéptido AARS, células (por ejemplo, células madre) que se han tratado ex vivo o in vitro con un polipéptido AARS, o ambos. Los sujetos adecuados (pacientes) incluyen animales de laboratorio (tales como ratón, rata, conejo, o cobaya), animales de granja, y animales domésticos o mascotas (tales como un gato o perro). Están incluidos los primates no humanos y, preferiblemente, los pacientes humanos. Determinadas realizaciones descritas en la presente memoria incluyen sujetos que presentan, o presentan riesgo de presentar, una respuesta inflamatoria incrementada o patológica, o una respuesta inflamatoria insuficiente.

Una "concentración efectiva" de un polipéptido aminoacil-ARNt sintetasa se refiere a una cantidad que es capaz de modular o regular una respuesta inflamatoria o inflamación de una manera deseada, comparado con un polipéptido control o ausencia de polipéptido, ya sea en una célula in vitro o ex vivo, en un tejido, o en un sujeto. Un ejemplo de una actividad moduladora de la respuesta inflamatoria incluye reducir la migración de células inmunes tales como granulocitos (por ejemplo, neutrófilos, eosinófilos) o linfocitos a tejidos seleccionados, tales como el pulmón. Otro ejemplo incluye desensibilizar células inmunes frente a un antígeno. Un ejemplo adicional de una actividad moduladora de la respuesta inflamatoria incluye la modulación de la producción de citoquinas. Otros ejemplos serán evidentes a partir de la descripción proporcionada en la presente memoria y la comprensión en la técnica.

Una "célula inmune" incluye cualquier célula del sistema inmune vertebrado, incluyendo linfocitos tales como células B, células T asesinas (es decir, células T CD8+), células T auxiliares (es decir, células T CD4+, incluyendo células T_{H1} y T_{H2}), células asesinas naturales, y células T $\gamma\delta$, monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastocitos, eosinófilos, y basófilos.

Un "megacariocito" se refiere generalmente a una célula de la médula ósea que es responsable de la producción de trombocitos sanguíneos (es decir, plaquetas), que son necesarios para la coagulación sanguínea normal. Los megacariocitos representan típicamente 1 de 10.000 células de la médula ósea. Los megacariocitos derivan de

células precursoras de célula madre hematopoyéticas pluripotentes en la médula ósea. La trombopoyetina (TPO) es la señal principal para la producción de megacariocitos, es decir, TPO es suficiente pero no absolutamente necesaria para inducir la diferenciación de células progenitoras en la médula ósea hacia un fenotipo megacariocito final. Otras señales moleculares para la diferenciación de megacariocitos incluyen GM-CSF, IL-3, IL-6, IL-11, quimioquinas (SDF-1; FGF-4), y eritropoyetina.

Se cree que los megacariocitos se desarrollan a través del linaje siguiente: CFU-Me (célula madre hematopoyética pluripotencial o hemocitoblasto) -> megacarioblasto -> promegacariocito -> megacariocito. En el estadio megacarioblasto, la célula pierde su capacidad de dividirse, pero todavía es capaz de replicar su ADN y continuar el desarrollo, volviéndose poliploide. Después de la maduración, los megacariocitos empiezan el proceso de producir plaquetas, o trombocitos. La trombopoyetina juega un papel en la inducción de los megacariocitos para formar procesos pequeños proto-plaquetas, o membranas internas citoplásmicas para almacenar plaquetas antes de la liberación. Después de la liberación, cada uno de esos procesos proto-plaquetas puede dar lugar a 2.000-5.000 nuevas plaquetas. Globalmente, aproximadamente 2/3 de las plaquetas recién liberadas permanecerán en la circulación y aproximadamente 1/3 serán secuestradas por el bazo. Después de liberar las plaquetas, el núcleo celular remanente cruza típicamente la barrera de la médula ósea a la sangre y es consumido en el pulmón por los macrófagos alveolares. La megacariocitopenia, también referida como megacarioptosis, es una escasez de megacariocitos en la médula ósea.

Un "eritrocito" se refiere a una célula sanguínea roja que consiste principalmente en hemoglobina, una metaloproteína compleja que contiene grupos hemo cuyos átomos de hierro unen transitoriamente moléculas de oxígeno (O₂) en los pulmones. Los eritrocitos se producen por un proceso denominado eritropoyesis, en el que se desarrollan a partir de células madre especializadas a través de reticulocitos a eritrocitos maduros en aproximadamente 7 días y viven un total de aproximadamente 100-120 días. Las "policitemias" (o eritrocitosis) son enfermedades caracterizadas por un excedente de eritrocitos, en las que la viscosidad incrementada de la sangre puede causar varios síntomas. Las "anemias" son enfermedades caracterizadas por una capacidad baja de transporte de oxígeno de la sangre, debido al recuento bajo de células rojas o alguna anomalía de las células sanguíneas rojas o la hemoglobina.

Un "granulocito" se refiere a una célula sanguínea blanca que se caracteriza por la presencia de gránulos en su citoplasma. Los granulocitos también se refieren como leucocitos polimorfonucleares (PMN o PML), debido a los tamaños variados del núcleo. Los ejemplos de granulocitos incluyen neutrófilos, eosinófilos, y basófilos.

Un "neutrófilo," o granulocito neutrófilo, se refiere generalmente a un tipo abundante de células sanguíneas blancas en los seres humanos, que, junto con los basófilos y eosinófilos, forman parte de la familia de células polimorfonucleares (PMN). Los neutrófilos pueden identificarse fácilmente según sus únicas características de tinción en preparaciones histológicas o citológicas con hematoxilina y eosina (H&E). Los neutrófilos se encuentran normalmente en la corriente sanguínea, pero son unos del primer grupo de células inflamatorias en migrar hacia los sitios de inflamación durante la fase inicial (es decir, aguda) de la inflamación, principalmente como resultado de infección o cáncer. Típicamente, los neutrófilos migran en primer lugar a través de los vasos sanguíneos, y después a través de los tejidos intersticiales, siguiendo señales químicas (por ejemplo, interleuquina-8 (IL-8), interferón-gamma (IFN-gamma), y C5a) que se originan en el sitio de la inflamación. La "neutropenia" se refiere a la presencia de recuentos bajos de neutrófilos, que pueden resultar de un trastorno congénito (genético), o pueden desarrollarse debido a otras afecciones, como en el caso de anemia aplásica o algunos tipos de leucemia. La "neutrofilia" se refiere a un recuento anormalmente alto de neutrófilos.

Los "eosinófilos," también denominados leucocitos eosinófilos, se refieren a leucocitos que tienen gránulos redondos rugosos de tamaño uniforme en su citoplasma, y que típicamente tienen un núcleo bilobulado (dos lóbulos). Los gránulos citoplasmáticos de los eosinófilos se tiñen de rojo con el agente de tinción eosina. Los eosinófilos constituyen normalmente aproximadamente 1% a aproximadamente 3% de los leucocitos de sangre periférica, con un recuento de aproximadamente 350 a 650 por milímetro cúbico. Los recuentos de eosinófilos en la sangre suben frecuentemente por encima del intervalo normal durante las reacciones alérgicas y las infecciones parasitarias, tales como gusanos. La "eosinopenia" se refiere a una forma de agranulocitosis en la que el número de granulocitos eosinófilos es menor del esperado. La "eosinofilia" se refiere a un número anormalmente alto de eosinófilos en la sangre. Por ejemplo, la eosinofilia puede clasificarse como suave (menos de aproximadamente 1.500 eosinófilos por milímetro cúbico), moderada (aproximadamente 1.500 a aproximadamente 5.000 por milímetro cúbico), o grave (más de aproximadamente 5.000 por milímetro cúbico). En la eosinofilia primaria, la producción incrementada de eosinófilos se debe típicamente a una anomalía en las células madre hematopoyéticas, tal como una leucemia eosinofílica. En la eosinofilia secundaria, la producción incrementada de eosinófilos se debe típicamente a un proceso reactivo dirigido por citoquinas.

Los basófilos, también denominados leucocitos basofílicos, se refieren a leucocitos que tienen gránulos azulados negros rugosos de tamaño uniforme en el citoplasma, y que típicamente tienen un núcleo bilobulado (dos lóbulos). Los gránulos citoplásmicos de los basófilos se tiñen con agentes de tinción básicos. Los basófilos constituyen normalmente aproximadamente 0,5% a 3% de los leucocitos de sangre periférica. Los basófilos almacenan y liberan histamina y serotonina, entre otros químicos. Los basófilos son capaces de ingerir partículas extrañas, y también producen, almacenan y liberan heparina, serotonina, e histamina. La liberación de químicos inflamatorios tales como

heparina e histamina está asociada frecuentemente con asma y alergias. Los basófilos son producidos continuamente por células madre en la médula ósea. La "basopenia" se refiere a un recuento bajo de basófilos (por ejemplo, menos de aproximadamente $0,01 \times 10^9$ por litro de sangre), y la "basofilia" se refiere a un recuento alto de basófilos (por ejemplo, más de aproximadamente 10^{10} por litro de sangre).

- 5 Los "linfocitos" se refieren generalmente a células sanguíneas blancas del sistema inmune vertebrado, e incluyen células B, células T (por ejemplo, células T auxiliares, células T citotóxicas, células T $\gamma\delta$), y células asesinas naturales (NK). Generalmente, y meramente para propósitos ilustrativos, las células B producen y secretan anticuerpos, las células T auxiliares liberan citoquinas y factores de crecimiento que regulan otras células inmunes, las células T citotóxicas (CTL) lisan células infectadas con virus, células tumorales y aloinjertos, y las células NK lisan células infectadas por virus y células tumorales. La "linfocitopenia" se caracteriza por un nivel anormalmente bajo de linfocitos en la sangre. El recuento total normal de linfocitos es típicamente aproximadamente 1.000 a 4.800/ μ L en adultos, y aproximadamente 3.000 a 9.500/ μ L en niños menores de 2 años. A la edad de 6, el límite inferior del recuento total normal de linfocitos es aproximadamente 1.500/ μ L. La linfocitopenia se caracteriza frecuentemente por un recuento total de linfocitos de $< 1.000/\mu$ L en adultos o $< 3.000/\mu$ L en niños menores de 2 años. Los ejemplos específicos de linfocitopenia incluyen T-linfocitopenia, en la que hay demasiadas pocas células T (por ejemplo, recuentos de células T CD4+ por debajo de aproximadamente 300 células/ μ L) pero frecuentemente números normales de otros linfocitos, B linfocitopenia, en la que hay demasiados pocos linfocitos B pero frecuentemente números normales de otros linfocitos, y NK linfocitopenia, en la que hay demasiadas pocas células asesinas naturales, pero frecuentemente números normales de otros linfocitos.
- 10
- 15
- 20 La "linfocitosis" se refiere a un recuento anormalmente alto de linfocitos, caracterizado frecuentemente por un recuento total de linfocitos que es mayor de 40% por encima del normal. En adultos, la linfocitosis absoluta está presente típicamente cuando el recuento absoluto de linfocitos es mayor de 4.000 por microlitro, en niños mayores mayor de 7.000 por microlitro, y en niños mayor de 9.000 por microlitro. La linfocitosis relativa puede ocurrir cuando hay una proporción mayor (mayor del 40%) de linfocitos entre las células sanguíneas blancas, y cuando el recuento de linfocitos (ALC) es normal (menos de aproximadamente 4.000 por microlitro).
- 25

El término "que modula" incluye "que incrementa" o "que estimula," así como "que disminuye" o "que reduce," típicamente en una cantidad estadísticamente significativa o fisiológicamente significativa.

- Los términos "aumenta" o "que aumenta," o "incrementa" o "que incrementa," o "estimula" o "que estimula," se refieren generalmente a la capacidad de uno o agentes o composiciones para producir o causar una respuesta fisiológica mayor (es decir, efectos aguas abajo) en una célula, comparado con la respuesta causada bien en ausencia de polipéptido AARS o con una molécula/composición control. Una respuesta fisiológica mensurable puede incluir mayor crecimiento celular, expansión, adhesión, o migración, entre otros evidentes a partir de la comprensión de la técnica y la descripción en la presente memoria. Entre otros métodos conocidos en la técnica, los ensayos de formación de colonias in vitro representan una manera de medir las respuestas celulares a los agentes proporcionados en la presente memoria. Una respuesta fisiológica mensurable también puede incluir una respuesta clínica, tal como inflamación alterada, como se mide, por ejemplo, por la temperatura corporal, rojez, hinchamiento, u otro marcador clínico de la inflamación. Una cantidad "incrementada" o "aumentada" es típicamente una cantidad "estadísticamente significativa", y puede incluir un incremento que es 1,1, 1,2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (por ejemplo, 500, 1.000 veces) (incluyendo todos los números enteros y puntos decimales intermedios y por encima de 1), por ejemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) la cantidad producida en ausencia de polipéptido AARS (la ausencia de un agente) o por una composición control.
- 30
- 35
- 40

- El término "reduce" puede estar relacionado generalmente con la capacidad de uno o más polipéptidos AARS de la invención para "disminuir" una respuesta fisiológica o celular relevante, tal como un síntoma de una enfermedad o afección descrita en la presente memoria, como se mide según las técnicas rutinarias en la técnica de diagnóstico. Los ejemplos incluyen migración disminuida de células inmunes tales como granulocitos al pulmón, e inflamación disminuida del pulmón. Una respuesta fisiológica mensurable puede incluir inflamación disminuida, como se mide, por ejemplo, por la temperatura corporal, rojez, hinchamiento, u otro marcador clínico de la inflamación. Las respuestas fisiológicas o celulares relevantes (in vivo o in vitro) serán evidentes para los expertos en la técnica. Una "disminución" en una respuesta puede ser estadísticamente significativa comparado con la respuesta producida por ausencia de polipéptido AARS o una composición control, y puede incluir, por ejemplo, una disminución de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ó 100%, incluyendo todos los números enteros intermedios.
- 45
- 50

- "Migración" se refiere a migración celular, un proceso que puede medirse según ensayos rutinarios in vitro, como se describe en la presente memoria y conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el Ejemplo 8). Migración también se refiere a migración in vivo, tal como la migración de células de un tejido a otro tejido (por ejemplo, de la médula ósea a la sangre periférica, o de la sangre periférica al tejido pulmonar), o de un sitio en un tejido a otro sitio en el mismo tejido. La migración in vivo (por ejemplo, quimiotaxis) ocurre frecuentemente en una respuesta a infección o tejido dañado/irritado.
- 55

"Diferenciación" se refiere al proceso por el que una célula menos especializada (por ejemplo, pluripotente, totipotente, multipotente, etc.) se convierte en un tipo celular más especializado.

"Tratamiento" o "tratar," tal y como se usa en la presente memoria, incluye cualquier efecto deseable en los síntomas o patología de una enfermedad o afección asociada con la modulación de la inflamación, o en el resultado de otros tratamientos primarios (por ejemplo, infecciones, alergias) que pueden beneficiarse de la modulación de la inflamación, y puede incluir incluso cambios o mejoras mínimas en uno o más marcadores mensurables de la enfermedad o afección que se está tratando. "Tratamiento" o "tratar" no indica necesariamente la erradicación completa o cura de la enfermedad o afección, o síntomas asociados de ésta. El sujeto que recibe este tratamiento es cualquier animal que lo necesita, incluyendo primates, en particular seres humanos, y otros mamíferos tales como equinos, ganado, suido y ovejas; y aves de corral y mascotas en general. También se incluyen tratamientos "profilácticos", que reducen el riesgo de desarrollar una enfermedad o afección relevante, o de desarrollar síntomas asociados con la enfermedad o afección. Los marcadores ejemplares de mejora clínica incluyen sin limitación temperatura corporal alterada, alteraciones en el recuento de células inmunes, y alteraciones en los recuentos bacterianos, ya sea después de la administración de un polipéptido AARS, después de la administración de células que se han tratado ex vivo o in vitro con un polipéptido AARS, o ambos.

Por "vector" se quiere decir una molécula de polinucleótido, preferiblemente una molécula de ADN obtenida, por ejemplo, de un plásmido, bacteriófago, levadura o virus, en el que puede insertarse o clonarse un polinucleótido. Un vector contiene preferiblemente uno o más sitios de restricción únicos y pueden ser capaces de replicación autónoma en una célula huésped definida incluyendo una célula o tejido diana o una célula o tejido progenitor de éste, o puede integrarse en el genoma del huésped definido de manera que la secuencia clonada se puede reproducir. De acuerdo con esto, el vector puede ser un vector con replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extra-cromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido lineal o circular cerrado, un elemento extra-cromosómico, un mini-cromosoma, o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la auto-replicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica junto con el o los cromosomas en los que se ha integrado. Un sistema de vector puede comprender un único vector o plásmido, dos o más vectores o plásmidos, que conjuntamente contienen el ADN total que se va a introducir en el genoma de la célula huésped, o un transposón. La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que se va a introducir el vector. En el caso presente, el vector es preferiblemente uno que es funcional de manera operativa en una célula bacteriana. El vector también puede incluir un marcador de selección tal como un gen de resistencia a antibiótico que puede usarse para la selección de transformantes adecuados.

Los términos "de tipo salvaje" y "natural" se usan indistintamente para hacer referencia a un gen o producto génico que tiene las características de ese gen o producto génico cuando se aísla de una fuente natural. Un gen o producto génico de tipo salvaje (por ejemplo, un polipéptido) es el que se observa más frecuentemente en una población y se designa así arbitrariamente la forma "normal" o "de tipo salvaje" del gen.

Polipéptidos Aminoacil ARNt y Variantes de Éstos

La presente invención se basa en la observación de que polipéptidos aminoacil-ARNt sintetasas, incluyendo truncamientos y variantes de éstos, modulan las respuestas inflamatorias tanto in vivo como ex vivo (o in vitro). De acuerdo con esto, los polipéptidos descritos en la presente memoria incluyen un polipéptido HRS de longitud completa, además de cualesquiera fragmentos biológicamente activos, o variantes o modificaciones de éstos, de un polipéptido HRS como se define en la reivindicación 1, en el que el polipéptido es capaz de reducir una respuesta inflamatoria, bien en un sujeto, in vitro, o ex vivo.

Las aminoacil-ARNt sintetasas catalizan típicamente la aminoacilación de ARNt con su aminoácido cognado. Debido a su papel central en la unión de aminoácidos con tripletes de nucleótidos contenidos en ARNt, se piensa que las aminoacil-ARNt sintetasas están entre las primeras proteínas que aparecieron en la evolución.

Como se ha indicado anteriormente, los ejemplos de aminoacil-ARNt sintetasas incluyen tirosil-ARNt sintetasas (YRS), triptofanil-ARNt sintetasas (WRS), glutaminil-ARNt sintetasas (QRS), glicil-ARNt sintetasas (GlyRS), histidil-ARNt sintetasas (HisRS), seril-ARNt sintetasas (SRS), fenilalanil-ARNt sintetasas (PheRS), alanil-ARNt sintetasas (AlaRS), asparaginil-ARNt sintetasas (AsnRS), aspartil-ARNt sintetasas (AspRS), cisteinil-ARNt sintetasas (CysRS), glutamil-ARNt sintetasas (ERS), prolil-ARNt sintetasas (ProRS), arginil-ARNt sintetasas (RRS), isoleucil-ARNt sintetasas (IRS), leucil-ARNt sintetasas (LRS), lisil-ARNt sintetasas (KRS), treonil-ARNt sintetasas (TRS), metionil-ARNt sintetasas (MRS), y valil-ARNt sintetasas (VRS).

Las tirosil-ARNt sintetasas (YRS) pertenecen a la familia de ARNt sintetasa de clase I, que tiene dos restos de secuencia altamente conservados en el sitio activo, HIGH y KMSKS. Las ARNt sintetasas de clase I aminoacilan en el 2'-OH de un nucleótido de adenosina, y habitualmente son monoméricas o diméricas (una o dos subunidades, respectivamente).

La tirosil-ARNt sintetasa humana está compuesta por tres dominios: 1) un dominio de plegamiento Rossmann amino terminal que es responsable de la formación del intermedio activado E-Tyr-AMP y está conservado en bacterias, archaea, y eucariotas; 2) un dominio de reconocimiento de anticodón de ARNt que no se ha conservado entre bacterias y eucariotas; y 3) un dominio carboxilo terminal que es único para la tirosil-ARNt sintetasa humana, y cuya estructura primaria es 49% idéntica a la proteína citoquina activadora de monocitos endotelial humana posible II, 50% idéntica al dominio carboxilo terminal de la metionil-ARNt sintetasa de *Caenorhabditis elegans*, y 43% idéntica al dominio carboxilo terminal de Arc1p de *Saccharomyces cerevisiae*.

Los primeros dos dominios de la tirosil-ARNt sintetasa humana son 52,36, y 16% idénticos a las tirosil-ARNt sintetastas de *S. cerevisiae*, *Methanococcus jannaschii*, y *Bacillus stearothermophilus*, respectivamente. Nueve de quince aminoácidos que se sabe que están implicados en la formación del complejo tirosil-adenilato en *B. stearothermophilus* están conservados en todos los organismos, mientras los aminoácidos implicados en el reconocimiento de ARNt^{Tyr} no están conservados. Los análisis cinéticos de tirosil-ARNt sintetastas recombinantes humanas y de *B. stearothermophilus* expresadas en *Escherichia coli* indican que la tirosil-ARNt sintetasa humana aminoacila ARNt^{Tyr} humano pero no de *B. stearothermophilus*, y viceversa. Se cree que el dominio carboxilo terminal de la tirosil-ARNt sintetasa humana evolucionó a partir de duplicación génica del dominio carboxilo de la metionil-ARNt sintetasa y puede dirigir el ARNt al sitio activo de la enzima.

Los fragmentos biológicos de las tirosil-ARNt sintetastas eucariotas conectan la síntesis de proteínas con rutas de señalización celulares. Estos fragmentos pueden producirse naturalmente bien por corte y empalme alternativo o proteolisis, o por tratamiento proteolítico artificial. También se describe que el fragmento N-terminal mini-YRS es capaz de modular las respuestas inflamatorias in vivo. Además, determinadas mutaciones en la secuencia del polipéptido YRS de longitud completa confieren una actividad moduladora de la respuesta inflamatoria incrementada en la secuencia de referencia (por ejemplo, Y341A). Los ejemplos de variantes de corte y empalme truncadas de la secuencia del polipéptido YRS de longitud completa incluyen los polipéptidos SP1-SP5.

La secuencia de aminoácidos de longitud completa de tirosil-ARNt sintetasa humana se muestra en SEQ ID NO:1. La estructura de mini-YRS humano (es decir, SEQ ID NO:3; o mini-Tyr), que contiene tanto el dominio catalítico como de reconocimiento de anticodón, se ha reportado hasta una resolución de 1,18 Å. Mientras los dominios catalíticos de las enzimas humana y bacteriana se superponen, la disposición espacial del dominio de reconocimiento de anticodón respecto al dominio catalítico es única en mini-YRS respecto a los ortólogos bacterianos. Sin pretender la vinculación a una teoría cualquiera, la orientación única del dominio de reconocimiento de anticodón puede explicar por qué el fragmento mini-YRS es más activo en varias rutas de señalización celular.

Los ejemplos específicos de variantes del polipéptido YRS incluyen polipéptidos YRS de longitud completa, o truncamientos o variantes de corte y empalme de éste, que tienen una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas de una sustitución R93Q, una sustitución I14L, una sustitución N17G, una sustitución L271, una sustitución A85S, y una sustitución V156L, además de combinaciones de éstas. Los ejemplos particulares de variantes del polipéptido YRS incluyen, pero no están limitadas a, un polipéptido YRS que tiene los aminoácidos 1-364 de SEQ ID NO:1 con una sustitución R93Q, un polipéptido YRS que tiene los aminoácidos 1-353 de SEQ ID NO:1 con una sustitución I14L, un polipéptido YRS que tiene los aminoácidos 1-353 de SEQ ID NO:1 con una sustitución N17G, un polipéptido YRS que tiene los aminoácidos 1-353 de SEQ ID NO:1 con una sustitución L271, un polipéptido YRS que tiene los aminoácidos 1-353 de SEQ ID NO:1 con una sustitución A85S, y un polipéptido YRS que tiene los aminoácidos 1-353 de SEQ ID NO:1 con una sustitución V156L.

Los ejemplos particulares de fragmentos YRS biológicamente activos incluyen, pero no están limitados a, polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa truncados en el C-terminal que comprenden o consisten en los aminoácidos 1-343, aminoácidos 1-344, aminoácidos 1-350, aminoácidos 1-353, o aminoácidos 1-364 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, además de los polipéptidos de SEQ ID NOS:3 y 6. Los ejemplos adicionales de fragmentos biológicamente activos incluyen, pero no están limitados a, polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa truncados en el N-terminal que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NOS: 6, 10, 12 y 14. Las histidil-ARNt sintetastas (HRS o HisRS) son dímeros α_2 que pertenecen a la clase IIa de la familia de ARNt sintetasa. Una compilación de estructuras primarias de HisRSs muestra que las subunidades de estas enzimas homo-diméricas consisten en 420-550 residuos de aminoácidos. Esto representa una longitud de cadena relativamente corta entre las AARS, cuyos tamaños de cadena peptídica varían de aproximadamente 300 a 1.100 residuos de aminoácidos. La SEQ ID NO:28 es la secuencia de aminoácidos de la proteína HisRS de longitud completa (NP_002100.2). La SEQ ID NO:30 es la secuencia de aminoácidos de la variante de corte y empalme HRS-SV9, y la SEQ ID NO:32 es la secuencia de aminoácidos de la variante de corte y empalme HRS-SV 11.

Los ejemplos de polipéptidos histidil-ARNt sintetasa, y variantes o truncamientos de éstos, incluyen fragmentos HisRS que comprenden al menos el dominio WHEP de HisRS, por ejemplo, los residuos de aminoácidos 3-43 de la proteína HisRS humana de longitud completa y fragmentos HisRS que comprenden al menos el dominio de unión anticodón de HisRS, por ejemplo, los residuos de aminoácidos 406-501 de la proteína HisRS humana de longitud completa. Los ejemplos adicionales incluyen fragmentos HisRS que carecen de un dominio de aminoacilación funcional, por ejemplo, los residuos de aminoácidos 54-398 de la proteína HisRS humana de longitud completa o

polipéptidos variantes de corte y empalme de HisRS que comprenden al menos el dominio WHEP y el dominio de unión anticodón pero carecen de un dominio de aminoacilación funcional.

En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, el polipéptido HisRS de la invención comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO:28, o es un fragmento continuo de un polipéptido mostrado en SEQ ID NO:28. De manera ilustrativa, los fragmentos pueden tener esencialmente cualquier longitud, siempre que retengan al menos una actividad biológica no canónica de interés. Por ejemplo, como se describe adicionalmente en la presente memoria, dicho fragmento puede comprender al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75 ó 80, o más, residuos de aminoácidos contiguos de SEQ ID NOS:28.

En realizaciones adicionales descritas en la presente memoria, un polipéptido HisRS comprende una variante activa (es decir, retiene al menos una actividad biológica canónica de interés) de una secuencia mostrada en SEQ ID NO:28. En determinadas realizaciones, la variante activa es un polipéptido que tiene al menos, 80%, 90%, 95% ó 99% de identidad a lo largo de su longitud con una secuencia mostrada en SEQ ID NO:28. En determinada realización, el polipéptido HisRS de la invención no es un polipéptido que consiste en los residuos 1-48 de la proteína HisRS humana de longitud completa. Éstos y otros polipéptidos HisRS se incluyen en los polipéptidos de la presente descripción.

Las triptofanil-ARNt sintetasas (WRS), también referidas como triptófano-ARNt ligasas, pertenecen a la familia de ARNt sintetasa de clase I. La triptofanil-ARNt sintetasa cataliza la aminoacilación de ARNt^{trp} con triptófano, una función esencial en la síntesis de proteínas. La WRS humana tiene un dominio quinasa en la región N-terminal y un sitio de fosforilación de serina cerca del extremo C.

Se producen dos formas principales de triptofanil-ARNt sintetasa humana in vivo a través de corte y empalme alternativo del ARNm, para rendir la proteína de longitud completa (SEQ ID NO: 33), y un fragmento de ésta, designado frecuentemente mini-WRS (SEQ ID NO: 107). También se describen T1-WRS (SEQ ID NO:108) y T2-WRS (SEQ ID NO:34) humanas, variantes de corte y empalme alternativo que se producen a partir de un promotor sensible a IFN-gamma, siendo el último un fragmento truncado en el N terminal de WRS, así como un fragmento N-terminal (F1; SEQ ID NO:106) y fragmento de WRS referido como "Tolstrup" (SEQ ID NO:35). En la técnica se conocen otras variantes de corte y empalme de WRS humana (véase, por ejemplo, Liu et al., *Nucleic Acids Research*, 32(2):719-27, 2004).

Estructuralmente, WRS de longitud completa contiene tres partes, un plegamiento de unión a dinucleótido canónico, una interfase dimérica, y un dominio de hélice. Esta enzima tiene una homología estructural suficiente con la tirosil-ARNt sintetasa (YRS) como para que las dos enzimas puedan describirse como isómeros conformacionales. Los elementos estructurales que interaccionan con el aminoácido activado, triptofanil-5' AMP, son casi exactos a los observados en el complejo tirosil-5' AMP. También, las cadenas laterales que reconocen indol están también altamente conservadas, y requieren una reorientación de una hélice "que determina especificidad" que contiene un aspartato conservado para asegurar la selección de triptófano frente a tirosina. El extremo carboxi, que está alterado y por lo tanto no se observa en YRS, forma parte de la interfase de dímero en WRS (véase Doublie et al., *Structure*, 3:17-31, 1995).

La estructura cristalina de T2-WRS humano se ha reportado a una resolución de 2,5 Å. Esta variante comparte una homología de secuencia muy baja de 22% con WRS de *Bacillus stearothermophilus* (bWRS), sin embargo, sus estructuras globales son sorprendentemente similares. La comparación estructural de T2-WRS con bWRS revela diferencias estructurales sustanciales en el bolsillo de unión a sustrato y en la entrada del bolsillo que juegan papeles importantes en la unión al sustrato y la unión a ARNt. T2-WRS tiene una apertura amplia al sitio activo y adopta una conformación compacta similar a la conformación cerrada de bWRS. Los estudios de modelado indican que el ARNt se une con la enzima dimérica e interacciona principalmente con el polipéptido de conexión 1 de WRS humana a través de su brazo aceptor y el dominio de hélice α de WRS a través de su bucle anticodón.

La secuencia de aminoácidos del polipéptido WRS de longitud completa (o la variante de corte y empalme principal) se muestra en SEQ ID NO:33. La secuencia de aminoácidos de varias variantes de corte y empalme o fragmentos se muestran en SEQ ID NOS:34 y 35.

Las glutaminil-ARNt sintetasas (QRS) pertenecen a la familia de ARNt sintetasas de clase I, y la proteína humana es una de las varias aminoacil-ARNt sintetasas de mamíferos que forman un complejo proteico macromolecular. El apéndice N-terminal específico de eucariotas de QRS parece estabilizar la asociación de otros componentes en el complejo multi-ARS, mientras el dominio catalítico C-terminal es necesario para la asociación de QRS con el complejo multi-AARS.

La enzima QRS humana se diferencia tanto de las enzimas bacterianas como de levadura, lo que sugiere que una parte considerable de QRS humana ha evolucionado para llevar a cabo funciones distintas de la de cargar ARNt. Por ejemplo, al menos dos regiones distintas (parte I y parte II) en la región N-terminal de QRS eucariota (EC 6.1.1.18) no tienen equivalente en *Escherichia coli*. Aunque se piensa que estas regiones se unen a ARN de una manera no específica, aumentando las interacciones entre el ARNt y la enzima, no son esenciales para la función de la enzima (véase, por ejemplo, Wang et al., *J. Biol. Chem.* 274:16508-12, 1999). Además, las células humanas y de

ratón expresan al menos una variante de QRS que contiene una delección en la parte 1 de la región N-terminal, posiblemente debido a un codón de inicio alternativo o corte y empalme alternativo. Sin embargo, los datos de secuencia disponibles para levadura sugieren que estos microorganismos no expresan dicha variante de QRS, sino que sólo expresan un polipéptido QRS que contiene tanto la parte I como la parte II de la región N-terminal.

5 Los estudios de filogenética molecular de QRS sugieren que ha evolucionado relativamente recientemente de la enzima relacionada de cerca glutamil-ARNt sintetasa. Como evidencia, mutantes seleccionados de glutaminil-ARNt sintetasa presentan un reconocimiento aumentado de ácido glutámico. Por ejemplo, la mutagénesis de dos residuos próximos al sitio activo, Phe-90 y Tyr-240, mejora el reconocimiento de ácido glutámico 3,5 veces in vitro y resulta en la misacilación de ARNt^{gln} con ácido glutámico.

10 QRS se ha cristalizado en una variedad de complejos, de manera más importante con su ARNt^{gln} cognado. La enzima hace contactos extensos con la cara cóncava del ARNt, y hace interacciones específicas con el anticodón CUG en las posiciones 34 a 36, y con las parejas de bases entre el extremo 5' y el extremo 3' del ARNt, justo antes del aceptor de aminoácido.

15 Determinados polipéptidos QRS poseen actividades anti-apoptóticas. Por ejemplo, QRS humano interacciona con la quinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis activada por ligación Fas (ASK1) de una manera dependiente de glutamina. Esta interacción implica los dominios catalíticos de las dos enzimas, y se disocia por el ligando Fas. Esta interacción también inhibe tanto la actividad de ASK1, según se mide por ensayos de quinasa y transcripción in vitro, como la muerte celular inducida por ASK1, un efecto que es debilitado por la privación de glutamina. La interacción anti-apoptótica de QRS con ASK1 se aumenta por lo tanto por la concentración celular de glutamina y se reduce por la ligación de Fas. Se cree que esta actividad anti-apoptótica reside en los 539 aminoácidos C-terminales de QRS humano.

20 La secuencia de aminoácidos del polipéptido QRS de longitud completa se muestra en SEQ ID NO:25. Determinados ejemplos específicos de variantes, truncamientos, o fragmentos de QRS incluyen polipéptidos QRS que comprenden o consisten esencialmente en los aminoácidos 1-183 (QRS1 o Q1), 1-220 (QRS2 o Q2), 1-249 (QRS3 o Q3), 1-200 (QRS4 o Q4), 1-(181-293), por ejemplo, 1-180, 1-181, 1-182, 1-183, 1-184, 1-185, 1-186, 1-187, 1-188, 1-189, 1-190, 1-191, 1-192, 1-193, 1-194, 1-195, 1-196, 1-197, 1-198, 1-199, 1-200, etc., de SEQ ID NO:25 (véase la Tabla 2). También se describen péptidos de SEQ ID NOS:36-103 y 109-115. La glicil-ARNt sintetasa (GlyRS) es un dímero α_2 que pertenece a la familia de ARNt sintetetas de clase II (véase, por ejemplo, Solicitud U.S. No. 12/492.925). El ADNc de aproximadamente 2462 pb para este gen contiene un marco de lectura abierto (ORF) grande que codifica 685 aminoácidos con un M(r) = 77.507 Da predicho. La secuencia de la proteína de GlyRS humano tiene aproximadamente 60% de identidad con GlyRS de *B. mori* y 45% de identidad con GlyRS de *S. cerevisiae*, y contiene restos 2 y 3 característicos de las ARNt sintetetas de clase II

30 La secuencia de aminoácidos del polipéptido GlyRS de longitud completa se muestra en SEQ ID NO: 16. SEQ ID NOS:18-24 representan secuencias peptídicas ilustrativas analizadas en la determinación de límites del fragmento GlyRS.

35 Determinados ejemplos de fragmentos proteolíticos de GlyRS incluyen polipéptidos que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en los residuos de aminoácidos 57-685, 214-685, 239-685, 311-685, 439-685, 511-658, 214-438, 367-438, 214-420, 214-338, 85-127 1-213, 1-61, 85-214, 333-685, 128-685, 265-685, 483-685 ó 25-56 de SEQ ID NO:16, incluyendo truncamientos o variantes biológicamente activos de éstos (por ejemplo, variantes que tienen aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 98% de identidad de secuencia con los fragmentos) que retienen sustancialmente al menos una actividad biológica no canónica de interés. Los ejemplos adicionales de polipéptidos AARS que tienen actividades no canónicas incluyen polipéptidos variantes de corte y empalme de fenilalanil-ARNt sintetasa (PheRS) (PheRS_SV1P) (SEQ ID NO: 104), que tienen una secuencia de aminoácidos única en el extremo C-terminal que es diferente de la secuencia de la proteína PheRS humana de longitud completa, incluyendo variantes y fragmentos de estos polipéptidos PheRS; y polipéptidos aspartil-ARNt sintetasa (AspRS) (SEQ ID NO:105), incluyendo fragmentos de éstos que consisten esencialmente en los residuos de aminoácidos 1-154, 1-174, 1-31, 399-425, 413-476 ó 397-425 de SEQ ID NO:105.

40 Las realizaciones descritas en la presente memoria contemplan el uso de polipéptidos HRS, incluyendo fragmentos truncados, variantes de corte y empalme, fragmentos proteolíticos, y polipéptidos variantes y/o modificados de éstos como se define en la reivindicación 1, para reducir la inflamación en un sujeto. Se incluyen polipéptidos HRS que reducen la migración de las células inmunes tales como granulocitos al pulmón, desensibilizan las células inmunes tales como granulocitos frente a un antígeno o irritante dado, o ambos, entre otras actividades moduladoras de la inflamación descritas en la presente memoria y conocidas en la técnica. Las proteínas variantes englobadas por la presente descripción son biológicamente activas, esto es, continúan poseyendo la actividad moduladora de la respuesta inflamatoria de una secuencia de polipéptido HRS de referencia (por ejemplo, SEQ ID NO: 28). Dichas variantes pueden resultar, por ejemplo, de polimorfismo genético o de manipulación humana.

55 Las variantes biológicamente activas de un fragmento de polipéptido HRS de referencia tendrán al menos 80%, 85%, habitualmente aproximadamente 90% a 95% o más, y típicamente aproximadamente 98% o más de similitud o identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de una proteína de referencia como se determina por

programas de alineamiento de secuencias descritos en otro lugar de la presente memoria usando parámetros por defecto. Una variante biológicamente activa de un polipéptido HRS de referencia puede diferenciarse de esa proteína generalmente tanto como por 50 residuos de aminoácidos o adecuadamente por tan poco como 1-15 residuos de aminoácidos, tan poco como 1-10, tal como 6-10, tan poco como 5, tan poco como 4, 3, 2, o incluso 1 residuo de aminoácido. En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, un polipéptido HRS se diferencia de las secuencias de referencia en SEQ ID NO: 28 por al menos uno pero menos de 15, 10 ó 5 residuos de aminoácidos. En otras realizaciones, se diferencia de las secuencias de referencia en SEQ ID NO: 28 por al menos un residuo pero menos de 20%, 15%, 10% ó 5% de los residuos.

Un polipéptido AARS puede alterarse de varias maneras incluyendo sustituciones, deleciones, truncamientos, e inserciones de aminoácidos. Los métodos para dichas manipulaciones son conocidos generalmente en la técnica. Por ejemplo, las variantes de secuencia de aminoácidos de un polipéptido AARS truncado y/o variante pueden prepararse por mutaciones en el ADN. Los métodos para mutagénesis y alteraciones en la secuencia de nucleótidos son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kunkel (1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 488-492), Kunkel et al., (1987, Methods in Enzymol, 154: 367-382), Pat. U.S. No. 4.873.192, Watson, J. D. et al., ("Molecular Biology of the Gene", Cuarta Edición, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987). La directriz sobre las sustituciones de aminoácidos apropiadas que no afectan la actividad biológica de la proteína de interés pueden encontrarse en el modelo de Dayhoff et al., (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.). Los métodos para cribar productos génicos de bibliotecas combinatorias preparadas por mutaciones puntuales o truncamiento, y para cribar bibliotecas de ADNc para productos génicos que tienen una propiedad seleccionada se conocen en la técnica. Dichos métodos se pueden adaptar para el cribado rápido de bibliotecas génicas generadas por mutagénesis combinatoria de polipéptidos AARS. La mutagénesis de conjunto recursiva (REM), una técnica que aumenta la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas, puede usarse en combinación con los ensayos de cribado para identificar variantes de polipéptido AARS (Arkin y Yourvan (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7811-7815; Delgrave et al., (1993) Protein Engineering, 6: 327-331). Las sustituciones conservativas, tales como el intercambio de un aminoácido con otro que tiene propiedades similares, pueden ser deseables como se discute con más detalle más adelante.

Los polipéptidos HRS truncados y/o variantes biológicamente activos pueden contener sustituciones de aminoácidos conservativas en varias localizaciones a lo largo de su secuencia, comparado con la secuencia de aminoácidos de HRS de referencia (SEQ ID NO: 28). Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica, que pueden sub-clasificarse generalmente como sigue:

Ácido: El residuo tiene una carga negativa debido a la pérdida de ión H a pH fisiológico y el residuo es atraído por disolución acuosa para buscar las posiciones de superficie en la conformación de un péptido en el que está contenido cuando el péptido está en medio acuoso a pH fisiológico. Los aminoácidos que tienen una cadena lateral ácida incluyen ácido glutámico y ácido aspártico.

Básico: El residuo tiene una carga positiva debido a la asociación con ión H a pH fisiológico en una o dos unidades de pH de éste (por ejemplo, histidina) y el residuo es atraído por disolución acuosa para buscar las posiciones de superficie en la conformación de un péptido en el que está contenido cuando el péptido está en un medio acuoso a pH fisiológico. Los aminoácidos que tienen una cadena lateral básica incluyen arginina, lisina e histidina.

Cargado: Los residuos están cargados a pH fisiológico y, por lo tanto, incluyen aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas o básicas (es decir, ácido glutámico, ácido aspártico, arginina, lisina e histidina).

Hidrofóbico: Los residuos no están cargados a pH fisiológico y el residuo es repelido por disolución acuosa para buscar posiciones internas en la conformación de un péptido en el que está contenido cuando el péptido está en medio acuoso. Los aminoácidos que tienen una cadena lateral hidrofóbica incluyen tirosina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina y triptófano.

Neutro/polar: Los residuos no están cargados a pH fisiológico, pero el residuo no es repelido suficientemente por disoluciones acuosas por lo que buscaría posiciones internas en la conformación de un péptido en el que está contenido cuando el péptido está en medio acuoso. Los aminoácidos que tienen una cadena lateral neutra/polar incluyen asparagina, glutamina, cisteína, histidina, serina y treonina.

Esta descripción también caracteriza determinados aminoácidos como "pequeños" ya que sus cadenas laterales no son suficientemente grandes, incluso si carecen de grupos polares, para conferir hidrofobicidad. Con la excepción de prolina, los aminoácidos "pequeños" son aquellos con cuatro carbonos o menos cuando al menos un grupo polar está en la cadena lateral y tres carbonos o menos cuando no es así. Los aminoácidos que tienen cadena lateral pequeña incluyen glicina, serina, alanina y treonina. El aminoácido secundario codificado por gen prolina es un caso especial debido a sus efectos conocidos en la conformación secundaria de las cadenas peptídicas. La estructura de prolina se diferencia de todos los demás aminoácidos naturales en que su cadena lateral está unida al nitrógeno del grupo α -amino, así como el carbono α . En la técnica se conocen varias matrices de similitud de aminoácidos (véase, por ejemplo, la matriz PAM120 y la matriz PAM250 como se describe por ejemplo por Dayhoff et al., 1978, A model

of evolutionary change in proteins). Las matrices para determinar las relaciones de distancia en M. O. Dayhoff, (ed.), Atlas of protein sequence and structure, Vol. 5, p. 345-358, National Biomedical Research Foundation, Washington DC; y por Gonnet et al., (Science, 256: 14430-14445, 1992), sin embargo, incluyen prolina en el mismo grupo que glicina, serina, alanina y treonina. De acuerdo con esto, para los propósitos de la presente invención, la prolina se clasifica como un aminoácido "pequeño".

El grado de atracción o repulsión requerido para la clasificación como polar o no polar es arbitrario y, por lo tanto, los aminoácidos específicamente contemplados por la invención se han clasificado como uno o el otro. La mayor parte de los aminoácidos no denominados específicamente pueden clasificarse tomando como base el comportamiento conocido.

Los residuos de aminoácidos pueden sub-clasificarse adicionalmente como cíclicos o no cíclicos, y aromáticos o no aromáticos, clasificaciones que son explícitas respecto a los grupos sustituyentes de la cadena lateral de los residuos, y como pequeños o grandes. El residuo se considera pequeño si contiene un total de cuatro átomos de carbono o menos, incluyendo el carbono carboxilo, siempre que esté presente un sustituyente polar adicional; tres o menos si no es así. Los residuos pequeños son, por supuesto, siempre no aromáticos. Dependiendo de sus propiedades estructurales, los residuos de aminoácidos pueden encontrarse en dos o más clases. Para los aminoácidos de proteínas naturales, la sub-clasificación según este esquema se presenta en la Tabla A.

Tabla A

Sub-clasificación de aminoácidos	
Sub-clases	Aminoácidos
Ácido	Ácido aspártico, Ácido glutámico
Básico	No cíclico: Arginina, Lisina; Cíclico: Histidina
Cargado	Ácido aspártico, Ácido glutámico, Arginina, Lisina, Histidina
Pequeño	Glicina, Serina, Alanina, Treonina, Prolina
Polar/neutro	Asparagina, Histidina, Glutamina, Cisteína, Serina, Treonina
Polar/grande	Asparagina, Glutamina
Hidrofóbico	Tirosina, Valina, Isoleucina, Leucina, Metionina, Fenilalanina, Triptófano
Aromático	Triptófano, Tirosina, Fenilalanina
Residuos que influyen en la orientación de la cadena	Glicina y Prolina

La sustitución de aminoácidos conservativa también incluye agrupaciones basadas en cadenas laterales. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas-hidroxilo es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina, y triptófano; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales básicas es lisina, arginina, e histidina; y un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Por ejemplo, es razonable esperar que el reemplazo de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado no tendrá un efecto importante en las propiedades del polipéptido variante resultante. Si un cambio de aminoácido resulta en un polipéptido AARS variante y/o truncado funcional puede determinarse fácilmente ensayando su actividad, como se describe en la presente memoria (véanse, por ejemplo, los Ejemplos 1, 2, 10, y 11). Las sustituciones conservativas se muestran en la Tabla B bajo el encabezamiento de sustituciones ejemplares. Las sustituciones de aminoácidos que se encuentran en el alcance de la invención, se consiguen, en general, seleccionando sustituciones que no se diferencien significativamente en su efecto para mantener (a) la estructura del núcleo peptídico en el área de la sustitución, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, (c) el volumen de la cadena lateral, o (d) la función biológica. Después de introducir las sustituciones, las variantes se criban para actividad biológica.

Tabla B

Sustituciones Ejemplares de Aminoácidos		
Residuo Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser	Ser
Gln	Asn, His, Lys,	Asn
Glu	Asp, Lys	Asp
Gly	Pro	Pro
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
He	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleu	Leu
Leu	Norleu, He, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Ile, Phe	Leu
Phe	Leu, Val, He, Ala	Leu
Pro	Gly	Gly
Ser	Thr	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	He, Leu, Met, Phe, Ala, Norleu	Leu

Alternativamente, pueden agruparse aminoácidos similares para hacer sustituciones conservativas en tres categorías tomando como base la identidad de las cadenas laterales. El primer grupo incluye ácido glutámico, ácido aspártico, arginina, lisina, histidina, teniendo todos cadenas laterales cargadas; el segundo grupo incluye glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, glutamina, asparagina; y el tercer grupo incluye leucina, isoleucina, valina, alanina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina, como se describe en Zubay, G., Biochemistry, tercera edición, Wm.C. Brown Publishers (1993).

Así, un residuo de aminoácido no esencial predicho en un polipéptido AARS truncado y/o variante se reemplaza típicamente con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales. Alternativamente, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de una secuencia codificadora de AARS, tal como por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden cribarse para una actividad del presente polipéptido para identificar mutantes que retienen esa actividad. Después de la mutagénesis de la secuencia codificadora, el péptido codificado puede expresarse recombinantemente y puede determinarse la actividad del péptido. Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que puede alterarse de la secuencia de referencia de un polipéptido de realización sin suprimir o alterar sustancialmente una o más de sus actividades. De manera adecuada, la alteración no suprime sustancialmente una de esas actividades, por ejemplo, la actividad es al menos 20%, 40%, 60%, 70% ó 80% 100%, 500%, 1.000% o más de un polipéptido AARS de referencia. Un residuo de aminoácido "esencial" es un residuo que, cuando se altera respecto al polipéptido AARS de referencia, resulta en la supresión de una actividad de la molécula parental tal que está presente menos de 20% de la actividad de

referencia. Por ejemplo, dichos residuos de aminoácidos esenciales incluyen aquellos que están conservados en los polipéptidos AARS a lo largo de diferentes especies, incluyendo aquellas secuencias que están conservadas en el o los sitios o restos de unión activos de polipéptidos AARS de varias fuentes.

De acuerdo con esto, la presente descripción también contempla variantes de las secuencias de polipéptido HRS naturales o sus fragmentos biológicamente activos, en el que las variantes se distinguen de la secuencia natural por la adición, delección, o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos. En general, las variantes presentarán al menos aproximadamente 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% de similitud o identidad de secuencia con una secuencia de polipéptido HRS de referencia como se muestra en SEQ ID NO: 28. Además, se contemplan las secuencias que se diferencian de las secuencias nativa o parental por la adición, delección, o sustitución de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos pero que retienen las propiedades de una secuencia de polipéptido HRS parental o de referencia como se define en la reivindicación 1. En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, la región C-terminal o N-terminal del polipéptido HRS de SEQ ID NO: 28 puede estar truncada por aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos, o por aproximadamente 10-50, 20-50, 50-100 o más aminoácidos, incluyendo todos los números enteros e intervalos intermedios (por ejemplo, 101, 102, 103, 104, 105), siempre que el polipéptido HRS truncado sea capaz de reducir una respuesta inflamatoria, bien in vivo, in vitro, o ex vivo (por ejemplo, reducir la migración de las células inmunes tales como granulocitos, incluyendo neutrófilos y eosinófilos).

En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, los polipéptidos variantes se diferencian de una secuencia HRS de referencia como se define en la reivindicación 1 por al menos uno pero por menos de 50, 40, 30, 20, 15, 10, 8, 6, 5, 4, 3 ó 2 residuo(s) de aminoácidos. En otras realizaciones, los polipéptidos variantes se diferencian de las secuencias correspondientes de SEQ ID NO: 28 por al menos 1% pero menos de 20%, 15%, 10% ó 5% de los residuos. (Si esta comparación requiere alineamiento, las secuencias deben alinearse para una similitud máxima. Las secuencias "en bucle" de delecciones o inserciones, o emparejamientos erróneos, se consideran diferencias.) Las diferencias son, de manera adecuada, diferencias o cambios en un residuo no esencial o una sustitución conservativa.

En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, un polipéptido variante incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o más de identidad de secuencia o similitud con una secuencia correspondiente de un polipéptido HRS como se muestra en SEQ ID NO: 28 y tiene la capacidad de reducir la inflamación pulmonar en un sujeto, tal como reduciendo la migración o reclutamiento de neutrófilos o eosinófilos al pulmón.

Los cálculos de la similitud de secuencia o identidad de secuencia entre secuencias (los términos se usan indistintamente en la presente memoria) se llevan a cabo como sigue. Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos, o de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o ácido nucleico para el alineamiento óptimo y las secuencias no homólogas pueden ignorarse para propósitos de comparación). En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, la longitud de una secuencia de referencia alineada para propósitos de comparación es al menos 30%, preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 50%, 60%, e incluso más preferiblemente al menos 70%, 80%, 90%, 100% de la longitud de la secuencia de referencia. Entonces se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición.

El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para el alineamiento óptimo de las dos secuencias.

La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede conseguirse usando un algoritmo matemático. En una realización preferida descrita en la presente memoria, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman y Wunsch, (1970, J. Mol. Biol. 48: 444-453) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando bien una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6, ó 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, ó 6. En otra realización preferida más descrita en la presente memoria, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70, u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, ó 6. Un conjunto particularmente preferido de parámetros (y el que debe usarse a no ser que se especifique otra cosa) es una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización por hueco de 12, una penalización por extensión de hueco de 4, y una penalización por hueco de desplazamiento de marco de 5.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (1989, Cabios, 4: 11-17) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión

2.0), usando una tabla de peso de residuo PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4.

Las secuencias de ácido nucleico y proteína descritas en la presente memoria pueden usarse como una "secuencia de búsqueda" para llevar a cabo una búsqueda frente a bases de datos públicas, por ejemplo, para identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Dichas búsquedas pueden llevarse a cabo usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al., (1990, J. Mol. Biol, **215**: 403-10). Las búsquedas de nucleótidos BLAST pueden llevarse a cabo con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteína BLAST pueden llevarse a cabo con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a moléculas de proteína de la invención. Para obtener alineamientos con huecos para propósitos de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., (1997, Nucleic Acids Res, **25**: 3389-3402). Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST).

Las variantes de un polipéptido AARS pueden identificarse cribando bibliotecas combinatorias de mutantes de un polipéptido AARS. Las bibliotecas o fragmentos, por ejemplo fragmentos N terminal, C terminal, o internos, de la secuencia codificadora de la proteína AARS pueden usarse para generar una población variegada de fragmentos para cribado y posterior selección de variantes de un polipéptido AARS.

Los métodos para cribar productos génicos de bibliotecas combinatorias preparadas por mutación puntual o truncamiento, y para cribar bibliotecas de ADNc para productos génicos que tienen una propiedad seleccionada se conocen en la técnica. Dichos métodos se pueden adaptar para el cribado rápido de bibliotecas génicas generadas por mutagénesis combinatoria de polipéptidos AARS.

También se incluyen en esta descripción fragmentos proteolíticos de polipéptidos HRS como se define en la reivindicación 1. En determinadas realizaciones ilustrativas de esta descripción, los fragmentos proteolíticos de polipéptidos HRS pueden producirse usando una variedad de enzimas proteolíticas o agentes químicos proteolíticos, según técnicas conocidas y disponibles en la técnica. Los fragmentos proteolíticos pueden producirse in vitro, tal como incubando polipéptidos HRS con una o más proteasas (como se describe en la presente memoria y se conoce en la técnica) en condiciones controladas y aislando y caracterizando los fragmentos producidos de éstas. Los fragmentos proteolíticos también pueden producirse in vivo, o endógenamente, tal como por la expresión recombinante de los polipéptidos HRS en una célula seleccionada (por ejemplo, célula bacteriana, célula eucariota), y aislando y caracterizando los fragmentos endógenos producidos de éstas (véase, por ejemplo, el Ejemplo 10).

Las proteasas se clasifican habitualmente según tres criterios principales: (i) la reacción catalizada, (ii) la naturaleza química del sitio catalítico, y (iii) la relación evolutiva, como se revela por la estructura. Los ejemplos generales de proteasas o proteinasas, según se clasifican por el mecanismo de catálisis, incluyen aspártico proteasas, serina proteasas, cisteína proteasas, y metaloproteasas.

La mayor parte de las aspártico proteasas pertenecen a la familia de la pepsina. Esta familia incluye enzimas digestivas, tales como pepsina y quimiosina, así como catepsinas D lisosomales y enzimas de procesamiento tales como renina, y determinadas proteasas fúngicas (por ejemplo, penicilopepsina, rizopuspepsina, endotiapepsina). Una segunda familia de aspártico proteasas incluye proteinasas virales tales como la proteasa del virus del SIDA (VIH), también denominada retropepsina.

Las serina proteasas incluyen dos familias distintas. En primer lugar, la familia de la quimiotripsina, que incluye las enzimas de mamíferos tales como quimiotripsina, tripsina, elastasa, y calicreína, y, en segundo lugar, la familia de la subtilisina, que incluye las enzimas bacterianas tales como subtilisina. La estructura 3D general entre estas dos familias es diferente, pero tienen la misma geometría en el sitio activo, y la catálisis se produce mediante el mismo mecanismo. Las serina proteasas presentan diferentes especificidades de sustrato, diferencias que se relacionan principalmente con sustituciones de aminoácidos en los diferentes subsitios de las enzimas (sitios de interacción con el residuo del sustrato). Algunas serina proteasas tienen un sitio de interacción extendido con el sustrato mientras otras tienen una especificidad que está restringida al residuo de sustrato P1.

La familia de las cisteína proteasas incluye las proteasas de plantas tales como papaína, actinidina, y bromelaina, varias catepsinas lisosomales de mamíferos, las calpaínas citosólicas (activadas por calcio), así como varias proteasas de parásitos (por ejemplo, Trypanosoma, Schistosoma). La papaína es el arquetipo y el miembro mejor estudiado de la familia. La elucidación reciente de la estructura de rayos X de la enzima convertidora de interleuquina-1-beta ha revelado un nuevo tipo de plegamiento para las cisteína proteinasas.

Las metaloproteasas son una de las clases más antiguas de proteasas, encontradas en bacterias, hongos, y organismos superiores. Se diferencian ampliamente en sus secuencias y sus estructuras 3D, pero la gran mayoría de las enzimas contiene un átomo de cinc que es catalíticamente activo. En algunos casos, el cinc puede reemplazarse por otro metal tal como cobalto o níquel sin pérdida de actividad proteolítica. La termolisina bacteriana se ha caracterizado bien y su estructura cristalográfica indica que el cinc está unido por dos histidinas y un ácido glutámico. Muchas metaloproteasas contienen el resto de secuencia HEXXH, que proporciona dos ligandos histidina

para el cinc. El tercer ligando es bien un ácido glutámico (termolisina, neprilisina, alanil aminopeptidasa) o una histidina (astacina, serralisina).

Las proteasas ilustrativas incluyen, por ejemplo, acromopeptidasa, aminopeptidasa, ancrod, enzima convertora de angiotensina, bromelaína, calpaína, calpaína I, calpaína II, carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B, carboxipeptidasa G, carboxipeptidasa P, carboxipeptidasa W, carboxipeptidasa Y, caspasa 1, caspasa 2, caspasa 3, caspasa 4, caspasa 5, caspasa 6, caspasa 7, caspasa 8, caspasa 9, caspasa 10, caspasa 11, caspasa 12, caspasa 13, catepsina B, catepsina C, catepsina D, catepsina E, catepsina G, catepsina H, catepsina L, quimiopapaína, quimasa, quimiotripsina, clostripaína, colagenasa, complemento C1r, complemento C1s, complemento Factor D, complemento factor I, cucumisina, dipeptidil peptidasa IV, elastasa (leucocitos), elastasa (pancreática), endoproteinasa Arg-C, endoproteinasa Asp-N, endoproteinasa Glu-C, endoproteinasa Lys-C, enteroquinasa, factor Xa, ficina, furina, granzima A, granzima B, Proteasa de VIH, IGasa, calicreína de tejido, leucina aminopeptidasa (general), leucina aminopeptidasa (citósol), leucina aminopeptidasa (microsomal), metaloproteasa de matriz, metionina aminopeptidasa, neutrasa, papaína, pepsina, plasmina, prolidasa, pronasa E, antígeno específico de la próstata, proteasa alcalofílica de *Streptomyces griseus*, proteasa de *Aspergillus*, proteasa de *Aspergillus saitoi*, proteasa de *Aspergillus sojae*, proteasa (*B. licheniformis*) (alcalina o alcalasa), proteasa de *Bacillus polymyxa*, proteasa de *Bacillus* sp, proteasa de *Rhizopus* sp., proteasa S, proteasomas, proteinasa de *Aspergillus oryzae*, proteinasa 3, proteinasa A, proteinasa K, proteína C, piroglutamato aminopeptidasa, renina, renina, estreptoquinasa, subtilisina, termolisina, trombina, activador de plasminógeno tisular, tripsina, triptasa y uroquinasa.

Las Tablas C-G ilustran el tipo de fragmentos proteolíticos que pueden producirse in vitro incubando polipéptidos AARS con varias proteasas. Las condiciones de incubación pueden controlarse de manera que sólo se esciden determinados sitios de escisión por la proteasa indicada, para conseguir sólo escisión parcial, seguido del aislamiento del fragmento proteolítico deseado según técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, cromatografía). Una vez se ha aislado y caracterizado un fragmento deseado (por ejemplo, secuenciado) según técnicas rutinarias en la técnica, puede clonarse y producirse de manera recombinante, o producirse sintéticamente, según se desee.

En la presente memoria también se describen fragmentos proteolíticos de AARS que pueden producirse por las proteasas ejemplares en las Tablas C-G, además de las proteasas listadas en otro lugar de la presente memoria, incluyendo cualquier combinación de proteasas (por ejemplo, Caspasa I e hidroxilamina), o cualquier combinación de sitios de escisión individuales. También, puede ser aproximada la posición del residuo de los sitios de escisión. Meramente como ilustración, un fragmento proteolítico de AARS puede incluir aproximadamente los residuos 1-165, aproximadamente los residuos 166-445, aproximadamente los residuos 166-455, aproximadamente los residuos 166-716, aproximadamente los residuos 445-716, o aproximadamente los residuos 455-716 de GlyRS que se ha escindido o escindido parcialmente por incubación con ácido yodosobenzoico (véase la Tabla C). Como una ilustración adicional, un fragmento proteolítico de AARS puede incluir aproximadamente los residuos 1-98, aproximadamente los residuos 1-135, aproximadamente los residuos 98-135, aproximadamente los residuos 1-234, aproximadamente los residuos 98-234, aproximadamente los residuos 1-379, aproximadamente los residuos 234-674, o aproximadamente los residuos 135-737 de QRS que se ha escindido o escindido parcialmente por prolina-endopeptidasa (véase la Tabla D). Como un ejemplo ilustrativo adicional, un polipéptido AARS puede incluir aproximadamente los residuos 1-210, aproximadamente los residuos 1-273, aproximadamente los residuos 1-295, aproximadamente los residuos 210-273, aproximadamente los residuos 210-295, aproximadamente los residuos 273-295 de QRS que se ha escindido o escindido parcialmente por hidroxilamina. Pueden aplicarse patrones similares a cualquiera de los polipéptidos AARS y cualquiera de las proteasas en las Tablas C-G, o a las demás proteasas listadas en la presente memoria o conocidas en la técnica.

Tabla C: Glicil-ARNt sintetasa (EC 6.1.1.14) (Glicina-ARNt ligasa) (GlyRS)

Proteasa	Posición de sitios de escisión (No. de Residuo)
Arg-C proteinasa	10 13 23 27 33 34 52 68 72 79 101 103 121 130 131 166 213 297 310 331 337 342 344 388 391 412 428 430 464 474 560 583 596 602 640 656 657 660 687 689 693 696 722
Asp-N endopeptidasa	55 75 83 89 91 115 116 119 125 134 148 178 195 199 204 214 227 246 255 270 355 360 369 393 424 442 445 462 467 510 522 553 598 647 648 661 672 674 687 689 707 717
Asp-N endopeptidasa + Glu N-terminal	55 60 61 75 82 83 89 91 96 105 108 115 116 119 124 125 134 148 171 172 176 178 185 195 199 204 209 214 227 233 237 239 246 252 255 270 298 312 332 344 349 351 355 358 360 369 393 396 424 433 435 442 445 447 456 462 467 482 487 497 510 516 522 523 528 530 535 538 542 544 553 567 568 575 589 596 598 599 625 632 635 647 648 661 662 672 674 687 689 697 700 707 717 719 726 729 734 737 738
BNPS-Escatol	165 445 455 716
CNBr	1 55 124 182 202 226 239 281 292 348 390 433 437 516 530 532 555 585 628 692

ES 2 535 951 T3

Proteasa	Posición de sitios de escisión (No. de Residuo)
Caspasa	215
Quimiotripsina-alta especificidad (extremo C a [FYW], no antes P)	132 133 134 138 141 148 150 165 169 198 201 212 249 258 261 278 282 285 295 305 308 314 321 330 346 354 365 374 376 408 409 414 416 429 440 445 453 455 467 497 508 518 526 540 549 561 566 579 586 589 593 604 605 614 627 630 658 668 674 716 726
Clostripaína	5 10 13 23 27 33 34 52 68 72 79 101 103 121 130 131 166 213 297 310 331 337 342 344 388 391 412 428 430 464 474 560 583 596 602 640 656 657 660 687 689 693 696 722
Ácido fórmico	56 76 84 90 92 116 117 120 126 135 149 179 196 200 205 215 228 247 256 271 356 361 370 394 425 443 446 463 468 511 523 554 599 648 649 662 673 675 688 690 708718
Glutamil endopeptidasa	61 62 83 97 106 109 125 172 173 177 186 210 234 238 240 253 299 313 333 345 350 352 359 397 434 436 448 457 483 488 498 517 524 529 531 536 539 543 545 568 569 576 590 597 600 626 633 636 663 698 701 720 727 730 735 738 739
Hidroxilamina	208 711
Ácido yodosobenzoico	165 445 455 716
LysC	80 82 85 93 99 102 108 115 123 129 158 190 197 204 207 219 224 229 230 235 236 264 283 309 318 360 364 379 389 419 426 450 477 484 487 490 501 506 509 510 513 537 547 553 559 563 615 632 646 679 733 734
LysN	79 81 84 92 98 101 107 114 122 128 157 189 196 203 206 218 223 228 229 234 235 263 282 308 317 359 363 378 388 418 425 449 476 483 486 489 500 505 508 509 512 536 546 552 558 562 614 631 645 678 732 733
NTCB (ácido 2-nitro-5-tiocianobenzoico)	40 154 179 210 230 441 443 460 465 470 521 524 615
Prolina-endopeptidasa	6 28 298 363 485
Peptidasa Staphylococcal I	61 83 97 106 109 125 172 177 186 210 234 238 240 253 299 313 333 345 350 352 359 397 434 436 448 457 483 488 498 517 524 529 531 536 539 543 545 568 576 590 597 600 626 633 636 663 698 701 720 727 730 735 738
Tripsina	10 13 23 33 34 52 68 72 79 80 82 85 93 99 101 102 103 108 115 121 123 129 130 131 158 166 190 197 204 207 213 219 224 229 230 235 236 264 283 309 310 318 331 337 342 344 360 364 379 388 389 391 412 419 426 428 430 450 464 474 477 487 490 501 506 509 510 513 537 547 553 559 560 563 583 596 602 615 632 640 646 656 657 660 679 687 689 693 696 722 733 734

Tabla D: Glutaminil-ARNt sintetasa (EC 6.1.1.18) (Glutamina-ARNt ligasa) (QRS)

Proteasa	Posiciones de sitios de escisión (No. de Residuo)
Arg-C proteinasa	21 34 62 64 67 68 95 109 132 134 141 154 195 201 202 225 265 267 301 351 352 361 376 378 391 403 419 427 463 464 486 497 509 515 523 524 525 538 558 567 576 616 629 639 666 667 690 694 745 764
Asp-N endopeptidasa	4 48 64 99 102 105 160 169 183 199 205 214 302 303 319 336 339 376 409 413 429 438 445 474 509 511 512 558 562 588 597 617 668 702 713 723 728 738 751 753 770
Asp-N endopeptidasa + Glu N-terminal	4 16 21 34 48 64 83 91 99 102 105 107 109 119 122 123 126 139 151 160 167 169 181 183 185 196 197 199 205 208 211 214 221 226 235 257 270 302 303 307 309 310 319 336 339 347 362 363 376 380 381 387 396 398 408 409 413 429 438 445 448 458 474 482 509 511 512 529 548 553 558 562 572 588 597 598 614 617 620 621 623 645 658 661 668 671 687 692 701 702

ES 2 535 951 T3

Proteasa	Posiciones de sitios de escisión (No. de Residuo)
	705 713 723 728 738 743 751 753 769 770
BNPS-Escatol	159 324 345 375 432 469 482 511 632 680
CNBr	1 146 150 164 171 221 250 321 380 390 404 408 413 548 569 686
Caspasa1	184
Quimiotripsina-alta especificidad (extremo C a [FYW], no antes P)	10 57 71 75 93 107 142 144 159 189 231 238 243 286 288 290 299 302 314 315 324 327 330 334 338 339 343 345 356 375 387 395 418 422 432 438 440 460 467 468 469 477 482 484 491 511 517 535 603 608 613 619 627 632 643 677 680 692 696 711 738 741 743 748 749 762
Clostripaína	21 34 62 64 67 68 95 109 132 134 141 154 195 201 202 225 265 267 301 351 352 361 376 378 391 403 419 427 463 464 486 497 509 515 523 524 525 538 558 567 576 616 629 639 666 667 690 694 745 764
Ácido fórmico	5 49 65 100 103 106 161 170 184 200 206 215 303 304 320 337 340 377 410 414 430 439 446 475 510 512 513 559 563 589 598 618 669 703 714 724 729 739 752 754771
Glutamil endopeptidasa	17 22 35 84 92 108 110 120 123 124 127 140 152 168 182 186 197 198 209 212 222 227 236 258 271 308 310 311 348 363 364 381 382 388 397 399 409 449 459 483 530 549 554 573 599 615 621 622 624 646 659 662 672 688 693 702 706 744 770
Hidroxilamina	210 273 295
Ácido yodosobenzoico	159 324 345 375 432 469 482 511 632 680
LysC	19 25 50 79 80 158 163 166 180 187 188 190 193 205 230 233 239 254 282 292 309 313 331 366 392 394 405 412 421 431 458 496 498 586 601 620 628 652 673 675 699 736 740 759 769 774
LysN	18 24 49 78 79 157 162 165 179 186 187 189 192 204 229 232 238 253 281 291 308 312 330 365 391 393 404 411 420 430 457 495 497 585 600 619 627 651 672 674 698 735 739 758 768 773
NTCB (ácido 2-nitro-5-tiocianobenzoico)	110 297 318 357 432 442 444 455 470 477 535 555 656 664 686 729
Prolina-endopeptidasa	98 135 234 379 674 737
Peptidasa Staphylococcal I	17 22 35 84 92 108 110 120 123 127 140 152 168 182 186 197 209 212 222 227 236 258 271 308 310 348 363 381 388 397 399 409 449 459 483 530 549 554 573 599 615 621 624 646 659 662 672 688 693 702 706 744 770
Trombina	567
Tripsina	19 21 25 34 50 62 64 67 68 79 80 95 109 132 141 154 158 163 166 180 187 188 190 193 195 201 202 205 225 230 239 254 265 267 282 292 301 309 313 331 351 352 361 366 376 391 392 394 403 405 412 419 421 427 431 458 463 464 486 496 497 498 509 515 523 525 538 558 567 576 586 601 616 620 628 629 639 652 666 667 675 690 694 699 740 745 759 764 769 774

Tabla E: Triptofanil-ARNt sintetasa, citoplásmica (EC 6.1.1.2) (Triptófano-ARNt ligasa) (WRS) (Proteína 53 inducida por interferón) (IFP53) (hWRS)

Proteasa	Posiciones de sitios de escisión (No. de Residuo)
Arg-C proteinasa	24 106 119 122 127 133 134 141 162 298 300 318 321 326 381 388 417 448 449 464
Asp-N endopeptidasa	33 36 56 60 75 82 85 98 100 112 141 147 184 196 197 204 208 220 227 236 238 270 272 298 301 311 313 321 353 362 381 394 396 408 409 410 418 453 468
Asp-N endopeptidasa + Glu N-terminal	4 10 20 33 34 36 55 56 60 75 78 80 81 82 85 98 100 112 114 120 141 147 150 166 184 196 197 198 204 208 216 220 227 236 238 270 272 298 301 311 313 321 353 362 381 384 385 394 396 407 408 409 410 413 418 428 435 443 450 453 454 458 468
BNPS-Escatol	88 182 203
CNBr	1 42 48 143 169 195 241 243 319 350 401 425 461
Caspasa1	61 363
Quimiotripsina-alta especificidad (extremo C a [FYW], no antes P)	13 50 58 84 88 100 107 131 137 138 150 156 157 159 177 179 182 187 201 203 212 214 227 233 235 240 247 248 260 267 269 289 297 316 317 339 360 377 390 400 402 405 406 420 460 468 470
Clostripaína	24 106 119 122 127 133 134 141 162 298 300 318 321 326 381 388 417 448 449 464
Enteroquinasa	200 412
Ácido fórmico	34 37 57 61 76 83 86 99 101 113 142 148 185 197 198 205 209 221 228 237 239 271 273 299 302 312 314 322 354 363 382 395 397 409 410 411 419 454 469
Glutamil endopeptidasa	5 11 21 35 56 79 81 82 115 121 151 167 199 217 385 386 408 414 429 436 444 451 455 459
Ácido yodosobenzoico	88 182 203
LysC	27 33 41 47 51 59 96 102 111 114 153 154 181 200 204 220 231 249 253 256
	264 277 331 349 366 369 371 374 412 418 431 432 450 458 465
LysN	26 32 40 46 50 58 95 101 110 113 152 153 180 199 203 219 230 248 252 255 263 276 330 348 365 368 370 373 411 417 430 431 449 457 464
NTCB (ácido 2-nitro-5-tiocianobenzoico)	61 224 273 304 308 393
Prolina-endopeptidasa	128 155 332
Peptidasa Staphylococcal I	5 11 21 35 56 79 81 115 121 151 167 199 217 385 408 414 429 436 444 451 455 459
Trombina	162 326
Tripsina	24 27 33 41 47 51 59 96 102 106 111 114 119 122 133 134 141 153 162 181 200 204 220 231 249 253 256 264 277 298 300 318 321 326 349 366 369 371 374 381 388 412 417 418 431 432 448 449 450 458 464 465

Tabla F: Tirosil-ARNt sintetasa (EC 6.1.1.1) (Tirosil-ARNt ligasa) (YRS)

Proteasa	Posiciones de sitios de escisión (No. de Residuo)
Arg-C proteinasa	16 34 93 135 189 207 237 279 325 367 371 400 418 432 450
Asp-N endopeptidasa	2 60 74 80 121 131 143 172 179 186 232 235 239 279 293 297 307 321 342 368 382 384 392 416 455 477 493
Asp-N endopeptidasa + Glu N-terminal	2 7 8 19 23 24 28 32 34 60 67 74 80 87 90 97 105 112 121 127 131 143 150 156 172 173 174 179 186 195 226 227 228 232 235 238 239 250 255 273 279 280 293 295 297 301 307 313 321 325 342 358 360 361 368 378 382 384 389 392 395 397 412 413 416 434 445 452 455 464 472 477 478 479 488 493 498 499
BNPS-Escatol	140 87 283 505
CNBr	1 56 83 104 211 214 223 350 431 439 511
Caspasa1	75 494
Quimiotripsina-alta especificidad (extremo C a [FYW], no antes P)	39 40 52 53 62 73 79 87 96 97 117 123 129 134 176 183 192 194 198 204 249 263 275 283 289 292 299 328 388 409 468 472 488 495 505 510
Clostripaína	16 34 93 135 189 207 237 279 325 367 371 400 418 432 450
Ácido fórmico	3 61 75 81 122 132 144 173 180 187 233 236 240 280 294 298 308 322 343 369 383 385 393 417 456 478 494
Glutamil endopeptidasa	8 9 20 24 25 29 33 35 68 88 91 98 106 113 128 151 157 174 175 196 227 228 229 239 251 256 274 281 296 302 314 326 359 361 362 379 390 396 398 413 414 435 446 453 465 473 479 480 489 499 500
Hidroxilamina	258
Ácido yodosobenzoico	40 87 283 505
LysC	10 26 28 32 37 47 58 64 84 102 114 116 119 127 146 147 154 178 190 197 206 222 231 238 242 243 244 246 247 265 272 282 287 297 310 319 327 334 335 346 348 352 356 374 380 391 412 427 430 470 474 482 484 485 486 490 496 506 513 520 523
LysN	9 25 27 31 36 46 57 63 83 101 113 115 118 126 145 146 153 177 189 196 205 221 230 237 241 242 243 245 246 264 271 281 286 296 309 318 326 333 334 345 347 351 355 373 379 390 411 426 429 469 473 481 483 484 485 489 495 505 512 519 522
NTCB (ácido 2-nitro- 5-tiocianobenzoico)	66 249 423 441 500 518
Prolina- endopeptidasa	48 159 306 349 382 428 483
Peptidasa Staphylococcal I	8 20 24 29 33 35 68 88 91 98 106 113 128 151 157 174 196 227 239 251 256
	281 296 302 314 326 359 361 379 390 396 398 413 435 446 453 465 473 479 489 499
Tripsina	10 16 26 28 32 34 37 58 64 84 93 102 114 116 119 127 135 146 147 154 178 189 190 197 206 207 222 231 237 238 242 243 244 246 247 265 272 279 282 287 297 310 319 325 327 334 335 346 352 356 367 371 374 380 391 400 412 418 430 432 450 470 474 484 485 486 490 496 506 513 520 523

Tabla G: Histidil-ARNt sintetasa (EC 6.1.1.21) (Histidina-ARNt ligasa) (HisRS)

Proteasa	Posiciones de sitios de escisión (No. de Residuo)
Arg-C proteinasa	4 17 19 63 68 73 82 86 128 137 149 157 158 165 167 169 214 215 232 266 326 362 375 388 396 405 424 479 484 490 491 500 501
Asp-N endopeptidasa	47 63 77 92 109 115 118 129 158 174 176 182 187 205 212 217 227 238 241 264 268 285 300 314 315 320 328 363 370 432 472 487 492
Asp-N endopeptidasa + Glu N-terminal	2 7 8 152831 32334748637377899297 100 108 109 115 118 122 129 158 169 174 176 182 187 189 196 205 212 217 227 238 241 246 247 251 255 261 264 268 280 285 296 300 306 314 315 320 328 336 348 349 363 370 386 393 397 400 401 407 421 422 429 432 438 455 456 467 469 472 484 485 487 491 492 495 496
BNPS-Escatol	246 432
CNBr	1 70 104 141 163 185 195 220 253 369
Quimiotripsina-alta especificidad (extremo C a [FYW], no antes P)	54 65 77 84 97 107 115 129 135 138150156 168 171 172 176 182 207 221 231 246 270 306 308 312 320 330 331 336 363 370 390 432 442 454
Clostripaína	4 17 19 63 68 73 82 86 128 137 149 157 158 165 167 169 214 215 232 266 326 362 375 388 396 405 424 479 484 490 491 500 501
Ácido fórmico	48 64 78 93 110 116 119 130 159 175 177 183 188 206 213 218 228 239 242 265 269 286 301 315 316 321 329 364 371433 473 488 493
Glutamil endopeptidasa	3 8 9 16 29 32 33 34 49 74 90 98 101 109 123 170 190 197 247 248 252 256 262 281 297 307 337 349 350 387 394 398 401 402 408 422 423 430 439 456 457 468 470 485 486 492 496 497
Ácido yodosobenzoico	246 432
LysC	12 22 25 37 40 42 51 53 57 60 75 85 100 106 112 118 143 148 154 193 210 230 240 243 250 257 288 293 303 317 373 376 403 418 419 426 437 443 444 447 472 477 499
LysN	11 21 24 36 39 41 50 52 56 59 74 84 99 105 111 117 142 147 153 192 209 229 239 242 249 256 287 292 302 316 372 375 402 417 418 425 436 442 443 446 471 476 498
NTCB (ácido 2-nitro-5-tiocianobenzoico)	82 173 190 195 223 234 378 454 506 508
Peptidasa Staphylococcal I	3 8 16 29 32 49 74 90 98 101 109 123 170 190 197 247 252 256 262 281 297 307 337 349 387 394 398 401 408 422 430 439 456 468 470 485 492 496
Tripsina	4 12 17 19 22 25 37 40 42 51 53 57 60 63 68 73 75 82 85 86 100 106 112 118 128 137 143 148 149 154 157 158 165 167 169 193 210 214 215 230 232 240 243 250 257 266 288 293 303 317 326 362 373 375 376 388 396 403 405 418 419 424 426 437 443 444 447 472 477 479 484 490 491 499 500 501

5 Determinadas realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a polipéptidos HRS aislados, que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en secuencias de aminoácidos que se han derivado de fragmentos de polipéptido HRS endógenos, naturales, como se define en la reivindicación 1. En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, como se ha indicado anteriormente, las secuencias de fragmentos proteolíticos naturales, endógenos, pueden generarse o identificarse, por ejemplo, de varias fracciones celulares (por ejemplo, citosólica, de membrana, nuclear) y/o medio condicionado de varios tipos celulares, incluyendo células primarias y líneas celulares. Los ejemplos de dichos tipos celulares incluyen, sin limitación, células inmunes tales como monocitos, células dendríticas, macrófagos (por ejemplo, macrófagos RAW 264.7; véase el Ejemplo 5), neutrófilos, eosinófilos, basófilos, y linfocitos, tales como células B y células T (por ejemplo, células auxiliares CD4+ y células asesinas CD8+), incluyendo células T primarias y líneas de células T tales como células T Jurkat, así como células asesinas naturales (NK).

10

En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, los fragmentos proteolíticos endógenos pueden identificarse por técnicas tales como espectrometría de masas, o técnicas equivalentes. Meramente como ilustración y no limitación, en determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, los proteomas de varios tipos celulares o fracciones de éstas pueden separarse por SDS-PAGE de 1D y los carriles del gel cortarse en bandas a intervalos fijados; después de lo cual las bandas pueden digerirse opcionalmente con una proteasa apropiada, tal como tripsina, para liberar los péptidos, que pueden analizarse por LC-MS/MS de 1D de fase reversa. Los datos proteómicos resultantes pueden integrarse en las denominadas peptografías, que representan, en el panel izquierdo, la cobertura de secuencia para una proteína dada en la dimensión horizontal (extremo N a C, izquierda a derecha) frente a la migración en SDS-PAGE en la dimensión vertical (peso molecular alto a bajo, parte superior a inferior).

Los fragmentos peptídicos específicos pueden secuenciarse o mapearse. La Tabla H proporciona un conjunto de fragmentos de polipéptido QRS de ratón ilustrativos que se identificaron a partir de macrófagos RAW según estas técnicas ejemplares. La Tabla I proporciona el conjunto correspondiente de fragmentos de polipéptido QRS humano. La Tabla J proporciona un conjunto de fragmentos de polipéptido QRS humano ilustrativos que se identificaron a partir de células T Jurkat humanas.

Tabla H: Fragmentos de Polipéptido QRS de Ratón

SECUENCIA PEPTÍDICA	SEQ ID NO:
ETLKNEALSTQLR	36
EAATQAHQQ,GSTIDKATGVLLYDLVSR	37
ETLKNEALSTQLREAATQAHQILGSTIDKATGVLLYDLVSR	38
DFEQECGVGVWTPQIEEAVESTINK	39
FNMGLLMGEAR*	40
MIKNEVDMQVLHLLGPK*	41
NEVDMQVLHLLGPK*	42
TPGYVITPYTMDLLK	43
FDDTNPEKEEAK*	44
VEELKGHNPLPSPWR	45
DRPKEESLLLFEAMR	46
VEELKGHNPLPSPWRDRPKEESLLLFEAMR	47
LVMEDGKMDPVAYR*	48
VYCPVQWEYGR*	49
ILQLVAAGAVR	50
DVLNDAAPRAMAVLEPLQWITNFPAPK	51
GFHQVPFASTVFIERSDFKEESEPGYKRLASGQPVGLR	52
AFIHWVSQPLVCEIR	53
LGYFSVDPDSHQGQIVFNR	54
TPGYVITPYTMDLLK	55
AINFNFGYAK*	56
FDDTNPEKEEAK*	57
FFTAIYDMVTWLGYPYK	58
FDDTNPEKEEAKFFTAIYDMVTWLGYPYK	59

SECUENCIA PEPTÍDICA	SEQ ID NO:
DRPKEESLLLFEAMR	60
VYCPVQWEYGR*	61
LNLHYAWSK*	62
VYCPVQWEYGRLLNLHYAWSK*	63
ILQLVAAGAVR	64
AMAVLEPLQWITNFPAPK	65
PLDIRVPNFPADETK	66
AMAVLEPLQWITNFPAPKPLDIRVPNFPADETK	67
SDFKEESEPGYKRLASGQPVGLRHTGYVIELQNNR	68
AFIHWVSQPLVCEIR	69
LGYFSVDPDSHQGQIVFNR	70
KATGVLLYDLVSR	71
SFLVSYIANK	72
DFEQECGVGVVVTPEQIEEAVESTINK	73
MIKNEVDMQVLHLLGPK*	74
EAATQAHQILGSTIDKATGVLLYDLVSR	75

* Las secuencias de ratón y humanas son idénticas.

Tabla I: Fragmentos de Polipéptido QRS Humano

SECUENCIA PEPTÍDICA	SEQ ID NO:
ETLKNSALSAQLR	76
EAATQAQQTILGSTIDKATGILLYGLASR	77
ETLKNSALSAQLREAATQAQQTILGSTIDKATGILLYGLASR	78
DFERECEGVGVIVTPEQIEEAVEAAINR	79
TPGYWTPHTMNLLK	80
GEELKGHNTLPSPWR	81
DRPMEESLLLFEAMR	82
GEELKGHNTLPSPWRDRPMEESLLLFEAMR	83
ILQLVATGAVR	84
DVLNDTAPRAMAVLESLRVIITNFPAK	85
GFHQVPFAPVFIERTDFKEEPEPGFKRLAWGQPVGLR	86
AFIHWVSQPLMCEVR	87
LGYFSVDPDSHQGKLVFNR	88

SECUENCIA PEPTÍDICA	SEQ ID NO:
TPGYWTPHTMNLK	89
FFTAICDMVAWLGYTPYK	90
FDDTNPEKEEAKFFTAIYDMVTWLGYPYK	91
DRPMEESSLLFEAMR	92
ILQLVATGAVR	93
AMAVLESLRVIITNFPAAK	94
SLDIQVPNFPADETK	95
AMAVLESLRVIITNFPAAKSLDIQVPNFPADETK	96
TDFKEEPEPGFKRLAWGQPVGLRHTGYVIELQHWK	97
AFIHWVSQPLMCEVR	98
LGYFSVDPDSHQGKLVFNR	99
KATGILLYGLASR	100
SFLVSYIASK	101
DFERECGVGVIVTPEQIEEAVEAAINR	102
EAATQAQQLGSTIDKATGILLYGLASR	103

Tabla J: Fragmentos de Polipéptido QRS Humano de células T Jurkat

SECUENCIA PEPTÍDICA	SEQ ID NO:
NSALSAQLREAATQAQQLGSTIDK	109
SHPLDPIDTVDFERECGVGVIVTPEQIEEAVEAAINR	110
LSFLVSYIASK	111
ECGVGVIVTPEQIEEAVEAAINR	112
EAATQAQQLGSTIDKATGILLYGLASR	113
IHTEPQLSAALEYVR	114
NEVDMQVLHLLGPK	115

5 También se describen polipéptidos QRS aislados que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en una cualquiera o más de SEQ ID NOS:36-103 ó 109-115 (en las Tablas H, I, y J anteriores), que modulan la inflamación, tal como reduciendo la inflamación pulmonar, incluyendo variantes de éstos. En determinadas realizaciones, estos fragmentos de polipéptido QRS aislados pueden comprender además 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ó 20 o más de los residuos C-terminales y/o N-terminales que los rodean, según se caracteriza por su localización en el polipéptido QRS de longitud completa. Estos fragmentos de polipéptido QRS aislados pueden estar truncados para contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ó 20 menos de sus residuos C-terminales y/o N-terminales. También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden dichos fragmentos de polipéptido QRS, y métodos para usar dichos polipéptidos o composiciones para tratar a un sujeto que lo necesita.

15 La presente descripción también contempla el uso de proteínas HRS quiméricas o de fusión para reducir la inflamación. Tal y como se usa en la presente memoria, una "proteína quimérica" o "proteína de fusión" HRS incluye

un polipéptido o fragmento de polipéptido HRS unido a un polipéptido que no es AARS. Un "polipéptido que no es AARS" se refiere a un "polipéptido heterólogo" que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a una proteína que es diferente de una proteína AARS, y que se deriva del mismo organismo o uno diferente. El polipéptido HRS de la proteína de fusión puede corresponder a toda o una parte de una secuencia de aminoácidos HRS biológicamente activa. En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, una proteína de fusión HRS incluye al menos una (o dos) parte biológicamente activa de una proteína HRS. Los polipéptidos que forman la proteína de fusión están unidos típicamente del extremo C al extremo N, aunque también pueden unirse del extremo C al extremo C, extremo N a extremo N, o extremo N a extremo C. Los polipéptidos de la proteína de fusión pueden estar en cualquier orden.

La pareja de fusión puede diseñarse e incluirse para esencialmente cualquier propósito deseado siempre que no afecte de manera adversa la actividad moduladora de la inflamación del polipéptido. Por ejemplo, en una realización descrita en la presente memoria, una pareja de fusión puede comprender una secuencia que ayude en la expresión de la proteína (un potenciador de la expresión) a rendimientos mayores que la proteína recombinante nativa. Otras parejas de fusión pueden seleccionarse para incrementar la solubilidad de la proteína o para permitir que la proteína sea dirigida a compartimentos intracelulares deseados.

La proteína de fusión puede incluir un resto que tiene una alta afinidad para un ligando. Por ejemplo, la proteína de fusión puede ser una proteína de fusión GST-HRS en la que las secuencias HRS se fusionan con el extremo C de las secuencias GST. Como otro ejemplo, un polipéptido HRS puede fusionarse con una etiqueta de ocho aminoácidos en el extremo C, tal como una etiqueta L-E-H-H-H-H-H-H (SEQ ID NO:5). También se describen aminoácidos 1-364 de un polipéptido YRS fusionado con una etiqueta 365-L-E-H-H-H-H-H-H-372 (SEQ ID NO:5) en el extremo C. Dichas proteínas de fusión pueden facilitar la purificación y/o identificación de un polipéptido AARS. Alternativamente, la proteína de fusión puede ser una proteína HRS que contiene una secuencia señal heteróloga en su extremo N. En determinadas células huésped, la expresión y/o secreción de proteínas HRS puede incrementarse a través del uso de una secuencia señal heteróloga.

Más generalmente, la fusión a secuencias heterólogas, tales como un fragmento Fc, puede utilizarse para eliminar características no deseadas o para mejorar las características deseadas (por ejemplo, propiedades farmacocinéticas) de un polipéptido HRS. Por ejemplo, la fusión a una secuencia heteróloga puede incrementar la estabilidad química, disminuir la inmunogenicidad, mejorar el direccionamiento in vivo, y/o incrementar la vida media en circulación de un polipéptido HRS.

La fusión a secuencias heterólogas también puede usarse para crear proteínas de fusión bi-funcionales, tales como proteínas bi-funcionales que no sólo son capaces de reducir la inflamación pulmonar a través del polipéptido HRS, sino que también son capaces de modificar (es decir, estimular o inhibir) otras rutas a través del polipéptido heterólogo. Los ejemplos de dichas rutas incluyen, pero no están limitados a, varias rutas relacionadas con el sistema inmune, tales como rutas de activación de la inmunidad innata o adaptativa, o rutas reguladoras del crecimiento celular, tales como angiogénesis, o hematopoyesis. En determinados aspectos, el polipéptido heterólogo puede actuar de manera sinérgica con el polipéptido HRS para modular las rutas relacionadas con la inflamación en un sujeto. Los ejemplos de polipéptidos heterólogos que pueden utilizarse para crear una proteína de fusión bi-funcional incluyen, pero no están limitados a, trombopoyetina, citoquinas (por ejemplo, IL-11), quimioquinas, y varios factores de crecimiento hematopoyéticos, además de fragmentos y/o variantes biológicamente activos de éstos.

Las proteínas de fusión pueden prepararse generalmente usando técnicas estándar. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican los componentes del polipéptido de una fusión deseada pueden ensamblarse separadamente, y ligarse en un vector de expresión apropiado. El extremo 3' de la secuencia de ADN que codifica un componente del polipéptido se liga, con o sin un conector peptídico, al extremo 5' de una secuencia de ADN que codifica el segundo componente del polipéptido de manera que los marcos de lectura de las secuencias están en fase. Esto permite la traducción en una única proteína de fusión que retiene la actividad biológica de ambos polipéptidos componentes.

Puede emplearse una secuencia de conector peptídico para separar el primer y segundo componente del polipéptido por una distancia suficiente para asegurar que cada polipéptido se pliega en sus estructuras secundaria y terciaria, si se desea. Dicha secuencia de conector peptídico se incorpora en la proteína de fusión usando técnicas estándar muy conocidas en la técnica. Determinadas secuencias de conector peptídico pueden elegirse tomando como base los factores siguientes: (1) su capacidad de adoptar una conformación extendida flexible; (2) su incapacidad de adoptar una estructura secundaria que podría interaccionar con epítomos funcionales en el primer y segundo polipéptido; y (3) la ausencia de residuos hidrofóbicos o cargados que podrían reaccionar con los epítomos funcionales del polipéptido. Las secuencias de conector peptídico preferidas contienen residuos Gly, Asn y Ser. También pueden usarse otros aminoácidos casi neutros, tales como Thr y Ala en la secuencia conectora. Las secuencias de aminoácidos que pueden emplearse de manera útil como conectores incluyen las descritas en Maratea et al., Gene 40:39 46 (1985); Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258 8262 (1986); Pat. U.S. No. 4.935.233 y Pat. U.S. No. 4.751.180. La secuencia conectora puede tener una longitud generalmente de 1 a aproximadamente 50 aminoácidos. Las secuencias conectoras no se requieren cuando el primer y segundo polipéptido tienen regiones de aminoácidos no esenciales N-terminales que pueden usarse para separar los dominios funcionales y evitar la interferencia estérica.

Las secuencias de ADN ligadas pueden unirse de manera operativa a elementos reguladores de la transcripción y traducción adecuados. Los elementos reguladores responsables de la expresión de ADN están localizados típicamente 5' respecto a la secuencia de ADN que codifica el primer polipéptido. De manera similar, los codones de parada requeridos para terminar la traducción y las señales de terminación de la transcripción están presentes 3' respecto a la secuencia de ADN que codifica el segundo polipéptido.

En general, los polipéptidos y polipéptidos de fusión (así como sus polinucleótidos codificadores) están aislados. Un polipéptido o polinucleótido "aislado" es uno que se retira de su entorno original. Por ejemplo, una proteína natural está aislada si se separa de parte o todos los materiales que coexisten en el sistema natural. Preferiblemente, dichos polipéptidos son al menos aproximadamente 90% puros, más preferiblemente al menos aproximadamente 95% y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 99% puros. Un polinucleótido se considera que está aislado si, por ejemplo, se clona en un vector que no es parte del entorno natural.

También se describen dímeros de polipéptidos AARS. Los dímeros pueden incluir, por ejemplo, homodímeros entre dos polipéptidos AARS idénticos, heterodímeros entre dos polipéptidos AARS diferentes (por ejemplo, un polipéptido YRS de longitud completa y un polipéptido YRS truncado; un polipéptido YRS truncado y un polipéptido WRS truncado), y/o heterodímeros entre un polipéptido AARS y un polipéptido heterólogo. Determinados heterodímeros, tales como aquellos entre un polipéptido AARS y un polipéptido heterólogo, pueden ser bi-funcionales, como se describe en la presente memoria. También se describen monómeros de polipéptidos AARS, incluyendo monómeros de polipéptidos AARS aislados que no dimerizan sustancialmente con un segundo polipéptido AARS, ya sea debido a una o más sustituciones, truncamientos, delecciones, adiciones, modificaciones químicas, o una combinación de estas alteraciones. En determinadas realizaciones, los polipéptidos AARS monoméricos poseen actividades biológicas, incluyendo actividades moduladoras de la respuesta inflamatoria, que no poseen los complejos de polipéptido AARS diméricos o multiméricos.

Determinadas realizaciones descritas en la presente memoria también contemplan el uso de polipéptidos HRS modificados, incluyendo modificaciones que mejoran las características deseadas de un polipéptido HRS, como se describe en la presente memoria. Las modificaciones de polipéptidos HRS incluyen derivatizaciones químicas y/o enzimáticas en uno o más aminoácidos constituyentes, incluyendo modificaciones en la cadena lateral, modificaciones en el núcleo, y modificaciones N- y C-terminales incluyendo acetilación, hidroxilación, metilación, amidación, y la unión de restos carbohidrato o lípido, cofactores, y semejantes. Las modificaciones ejemplares también incluyen pegilación de un polipéptido HRS (véase, por ejemplo, Veronese y Harris, *Advanced Drug Delivery Reviews* 54: 453-456, 2002).

También se describe la tecnología de ligación quimioselectiva que puede utilizarse para modificar polipéptidos AARS truncados, tal como uniendo polímeros de una manera específica de sitio y controlada. Dicha tecnología se basa típicamente en la incorporación de anclajes quimioselectivos en el núcleo de la proteína bien por medios químicos o recombinantes, y la modificación posterior con un polímero que porta un conector complementario. Como resultado, el proceso de ensamblaje y la estructura covalente del conjugado proteína-polímero resultante puede controlarse, permitiendo la optimización racional de las propiedades del fármaco, tal como eficacia y propiedades farmacocinéticas (véase, por ejemplo, Kochendoerfer, *Current Opinion in Chemical Biology* 9:555-560, 2005).

Los polipéptidos HRS truncados y/o variantes pueden prepararse por cualquier procedimiento adecuado conocido para los expertos en la técnica, tal como por técnicas recombinantes. Por ejemplo, los polipéptidos HRS pueden prepararse por un procedimiento que incluye las etapas de: (a) preparar una construcción que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido HRS truncado y que está unido de manera operativa a un elemento regulador; (b) introducir la construcción en una célula huésped; (c) cultivar la célula huésped para expresar el polipéptido HRS truncado; y (d) aislar el polipéptido HRS truncado y/o variante de la célula huésped. Los polipéptidos HRS recombinantes pueden prepararse convenientemente usando protocolos estándar como se describe, por ejemplo, en Sambrook, et al., (1989, *supra*), en particular las Secciones 16 y 17; Ausubel et al., (1994, *supra*), en particular los Capítulos 10 y 16; y Coligan et al., *Current Protocols in Protein Science* (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1997), en particular los Capítulos 1, 5 y 6.

Además de los métodos de producción recombinantes, los polipéptidos, y fragmentos de éstos, pueden producirse por síntesis peptídica directa usando técnicas de fase sólida (Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154 (1963)). La síntesis de proteínas puede llevarse a cabo usando técnicas manuales o automatizadas. La síntesis automatizada puede conseguirse, por ejemplo, usando el Sintetizador de Péptidos Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer). Alternativamente, varios fragmentos pueden sintetizarse químicamente separadamente y combinarse usando métodos químicos para producir la molécula deseada.

Composiciones de polinucleótido

También se describen polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos aminoacil-ARNt sintetasa, incluyendo truncamientos y/o variantes de éstos, así como composiciones que comprenden dichos polinucleótidos.

Tal y como se usa en la presente memoria, los términos "ADN" y "polinucleótido" y "ácido nucleico" se refieren a una molécula de ADN que se ha aislado y que carece de ADN genómico total de un especie particular. Por lo tanto, un

segmento de ADN que codifica un polipéptido se refiere a un segmento de ADN que contiene una o más secuencias codificadoras y que aún así está sustancialmente aislado de, o purificado careciendo de, ADN genómico total de la especie del que se obtiene el segmento de ADN. Incluidos en los términos "segmento de ADN" y "polinucleótido" están segmentos de ADN y fragmentos menores de dichos segmentos, y también vectores recombinantes, incluyendo, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagémidos, fagos, virus, y semejantes.

Como entenderán los expertos en la técnica, las secuencias de polinucleótidos descritas pueden incluir secuencias genómicas, secuencias extra-genómicas y codificadas por plásmidos y segmentos menores génicos preparados por ingeniería que expresan, o pueden adaptarse para expresar, proteínas, polipéptidos, péptidos y semejantes. Dichos segmentos pueden aislarse naturalmente, o modificarse sintéticamente por la mano del hombre.

Como reconocerá el experto en la técnica, los polinucleótidos pueden ser monocatenarios (codificadores o antisentido) o bicatenarios, y pueden ser moléculas de ADN (genómico, ADNc o sintético) o ARN. Pueden estar presentes, pero no es necesario, secuencias codificadoras o no codificadoras adicionales en un polinucleótido como se describe, y un polinucleótido puede, pero no es necesario, estar unido a otras moléculas y/o materiales de soporte.

Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica una aminoacil-ARNt sintetasa o una parte de ésta) o pueden comprender una variante, o un equivalente biológico funcional de dicha secuencia. Las variantes de polinucleótido pueden contener una o más sustituciones, adiciones, deleciones y/o inserciones, como se describe adicionalmente más adelante, preferiblemente de manera que la actividad moduladora de la respuesta inflamatoria del polipéptido codificado no disminuye sustancialmente respecto al polipéptido no modificado. El efecto en la actividad moduladora de la respuesta inflamatoria del polipéptido codificado puede evaluarse generalmente como se describe en la presente memoria.

También se describen polinucleótidos aislados que comprenden varias longitudes de cadenas contiguas de secuencia idénticas a o complementarias a una aminoacil-ARNt sintetasa, en el que los polinucleótidos aislados codifican una aminoacil ARNt sintetasa trunca como se describe en la presente memoria.

Las secuencias de nucleótidos ejemplares que codifican los polipéptidos AARS descritos en la presente memoria engloban secuencias codificadoras, tales como las secuencias de polinucleótidos de SEQ ID NOS:4, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, y 31, así como partes de las secuencias de nucleótidos de longitud completa o sustancialmente de longitud completa de los genes AARS o sus transcritos o copias de ADN de estos transcritos.

Las partes de una secuencia de nucleótidos de AARS pueden codificar partes o segmentos de polipéptido que retienen la actividad biológica del polipéptido de referencia, incluyendo los polipéptidos de SEQ ID NOS:1, 2, 3, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 25, 28, 30, 32-108, y 109-115 o polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, ó 98% idéntica a estas secuencias. Una parte de una secuencia de nucleótido AARS que codifica un fragmento biológicamente activo de un polipéptido AARS puede codificar al menos aproximadamente 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 300 ó 400 residuos de aminoácidos contiguos, o casi hasta el número total de aminoácidos presentes en un polipéptido AARS de longitud completa. Se entenderá fácilmente que "longitudes intermedias," en este contexto y en todos los demás contextos usados en la presente memoria, significa cualquier longitud entre los valores indicados, tal como 101, 102, 103, etc.; 151, 152, 153, etc.; 201, 202, 203, etc.

Los polinucleótidos como se describen, independientemente de la longitud de la secuencia codificadora en sí misma, pueden combinarse con otras secuencias de ADN, tal como promotores, señales de poliadenilación, sitios de enzima de restricción adicionales, sitios de clonación múltiple, otros segmentos codificadores, y semejantes, de manera que su longitud global puede variar considerablemente. Se contempla, por lo tanto, que puede emplearse un fragmento de polinucleótido de casi cualquier longitud, estando limitada la longitud total preferiblemente para facilitar la preparación y uso en el protocolo de ADN recombinante pretendido.

También se describen variantes de las secuencias de nucleótidos de AARS. Las variantes de ácido nucleico pueden ser naturales, tales como variantes alélicas (mismo locus), homólogas (locus diferente), y ortólogos (organismo diferente) o pueden no ser naturales. Las variantes naturales como éstas pueden identificarse con el uso de técnicas de biología molecular conocidas, como, por ejemplo, con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas de hibridación como se conoce en la técnica. Las variantes no naturales pueden prepararse por técnicas de mutagénesis, incluyendo las aplicadas a polinucleótidos, células, u organismos. Las variantes pueden contener sustituciones, deleciones, inversiones e inserciones de nucleótidos. La variación puede ocurrir en cualquiera o en ambas de las regiones codificadoras y no codificadoras. Las variaciones pueden producir sustituciones de aminoácidos tanto conservativas como no conservativas (comparado en el producto codificado). Para las secuencias de nucleótidos, las variantes conservativas incluyen aquellas secuencias que, debido a la degeneración del código genético, codifican la secuencia de aminoácidos de un polipéptido AARS de referencia, tal como las secuencias mostradas en SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 25, 28, 30, 32-108, ó 109-115. Las secuencias de nucleótidos variantes también incluyen secuencias de nucleótidos derivadas sintéticamente, tales como las generadas, por ejemplo, usando mutagénesis dirigida a sitio pero que todavía codifican un polipéptido AARS. Generalmente, las variantes de una secuencia de nucleótidos AARS particular tendrán al menos aproximadamente

30%, 40% 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, generalmente al menos aproximadamente 75%, 80%, 85%, deseablemente aproximadamente 90% a 95% o más, y más adecuadamente aproximadamente 98% o más de identidad de secuencia con esa secuencia de nucleótidos particular como se determina por programas de alineamiento de secuencias descritos en otro lugar de la presente memoria usando parámetros por defecto.

5 Las secuencias de nucleótidos AARS pueden usarse para aislar secuencias y alelos correspondientes de otros organismos, particularmente otros organismos o microorganismos. Los métodos están disponibles fácilmente en la técnica para la hibridación de secuencias de ácido nucleico. Las secuencias codificadoras de otros organismos pueden aislarse según técnicas muy conocidas basadas en su identidad de secuencia con las secuencias codificadoras mostradas en la presente memoria. En estas técnicas, toda o parte de la secuencia codificadora conocida se usa como una sonda que hibrida selectivamente con otras secuencias codificadoras de AARS presentes en una población de fragmentos de ADN genómico clonado o fragmentos de ADNc (es decir, bibliotecas genómicas o de ADNc) de un organismo elegido.

15 También se describen polinucleótidos que hibridan con secuencias de nucleótidos AARS de referencia, o con sus complementos, en condiciones de astringencia descritas más adelante. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "hibrida en condiciones de astringencia baja, astringencia media, astringencia alta, o astringencia muy alta" describe condiciones para la hibridación y lavado. La directriz para llevar a cabo las reacciones de hibridación puede encontrarse en Ausubel et al., (1998, supra), Secciones 6.3.1-6.3.6. En esta referencia se describen métodos acuosos y no acuosos y puede usarse cualquiera de los dos. La referencia en la presente memoria a condiciones de astringencia baja incluye y engloba de al menos aproximadamente 1% v/v a al menos aproximadamente 15% v/v formamida y de al menos aproximadamente 1 M a al menos aproximadamente 2 M sal para hibridación a 42°C, y al menos aproximadamente 1 M a al menos aproximadamente 2 M sal para lavado a 42°C. Las condiciones de astringencia baja también pueden incluir 1% Albúmina de Suero Bovino (BSA), 1 mM EDTA, 0,5 M NaHPO₄ (pH 7,2), 7% SDS para hibridación a 65°C, y (i) 2 × SSC, 0,1% SDS; o (ii) 0,5% BSA, 1 mM EDTA, 40 mM NaHPO₄ (pH 7,2), 5% SDS para lavado a temperatura ambiente. Una realización de condiciones de astringencia baja incluye hidridación en 6 × cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de dos lavados en 0,2 × SSC, 0,1% SDS al menos a 50°C (la temperatura de los lavados puede incrementarse hasta 55°C para condiciones de astringencia baja). Las condiciones de astringencia media incluyen y engloban de al menos aproximadamente 16% v/v a al menos aproximadamente 30% v/v formamida y de al menos aproximadamente 0,5 M a al menos aproximadamente 0,9 M sal para hibridación a 42°C, y al menos aproximadamente 0,1 M a al menos aproximadamente 0,2 M sal para lavado a 55°C. Las condiciones de astringencia media también pueden incluir 1% Albúmina de Suero Bovino (BSA), 1 mM EDTA, 0,5 M NaHPO₄ (pH 7,2), 7% SDS para hibridación a 65°C, y (i) 2 × SSC, 0,1% SDS; o (ii) 0,5% BSA, 1 mM EDTA, 40 mM NaHPO₄ (pH 7,2), 5% SDS para lavado a 60-65°C. Una realización de condiciones de astringencia media incluye hibridar en 6 × SSC a aproximadamente 45°C, seguido de uno o más lavados en 0,2 × SSC, 0,1% SDS a 60°C. Las condiciones de astringencia alta incluyen y engloban de al menos aproximadamente 31% v/v a al menos aproximadamente 50% v/v formamida y de al menos aproximadamente 0,01 M a aproximadamente 0,15 M sal para hibridación a 42° C, y aproximadamente 0,01 M a aproximadamente 0,02 M sal para lavado a 55° C. Las condiciones de astringencia alta también pueden incluir 1% BSA, 1 mM EDTA, 0,5 M NaHPO₄ (pH 7,2), 7% SDS para hibridación a 65°C, y (i) 0,2 × SSC, 0,1% SDS; o (ii) 0,5% BSA, 1 mM EDTA, 40 mM NaHPO₄ (pH 7,2), 1% SDS para lavado a una temperatura superior a 65°C. Una realización de condiciones de astringencia alta incluye hibridar en 6 × SSC a aproximadamente 45°C, seguido de uno o más lavados en 0,2 × SSC, 0,1% SDS a 65°C.

También se describe un polipéptido AARS que está codificado por un polinucleótido que hibrida con una secuencia de nucleótidos descrita en condiciones de astringencia muy alta. Una realización descrita en la presente memoria de condiciones de astringencia muy alta incluye hibridar en 0,5 M fosfato de sodio, 7% SDS a 65°C, seguido de uno o más lavados en 0,2 × SSC, 1% SDS a 65°C.

Otras condiciones de astringencia son muy conocidas en la técnica y un experto en la técnica reconocerá que pueden manipularse varios factores para optimizar la especificidad de la hibridación. La optimización de la astringencia de los lavados finales puede servir para asegurar un alto grado de hibridación. Para ejemplos detallados, véase Ausubel et al., supra en las páginas 2.10.1 a 2.10.16 y Sambrook et al. (1989, supra) en las secciones 1.101 a 1.104.

Aunque los lavados astringentes se llevan a cabo típicamente a temperaturas de aproximadamente 42°C a 68°C, un experto en la técnica apreciará que pueden ser adecuadas otras temperaturas para condiciones astringentes. La proporción máxima de hibridación ocurre típicamente a aproximadamente 20°C a 25°C por debajo de la T_m para la formación de un híbrido ADN-ADN. Es bien conocido en la técnica que la T_m es la temperatura de fusión, o temperatura a la que se disocian dos secuencias de polinucleótido complementarias. Los métodos para estimar T_m son muy conocidos en la técnica (véase Ausubel et al., supra en la página 2.10.8).

En general, la T_m de un dúplex perfectamente emparejado de ADN puede predecirse como una aproximación por la fórmula: $T_m = 81,5 + 16,6 (\log_{10} M) + 0,41 (\%G+C) - 0,63 (\% \text{ formamida}) - (600/\text{longitud})$ en la que: M es la concentración de Na⁺, preferiblemente en el intervalo de 0,01 molar a 0,4 molar; %G+C es la suma de las bases guanosina y citosina como un porcentaje del número total de bases, en el intervalo entre 30% y 75% G+C; % formamida es la concentración en porcentaje de formamida por volumen; longitud es el número de pares de bases

en el dúplex de ADN. La T_m de un dúplex de ADN disminuye aproximadamente 1°C con cada incremento de 1% en el número de pares de bases emparejados de manera errónea aleatoriamente. El lavado se lleva a cabo generalmente a $T_m - 15^\circ\text{C}$ para astringencia alta, o $T_m - 30^\circ\text{C}$ para astringencia moderada.

En un ejemplo de un procedimiento de hibridación, una membrana (por ejemplo, una membrana de nitrocelulosa o una membrana de nilón) que contiene ADN inmovilizado se hibrida toda la noche a 42°C en un tampón de hibridación (50% formamida desionizada, $5 \times \text{SSC}$, $5 \times$ disolución de Denhardt (0,1% ficoll, 0,1% polivinilpirrolidona y 0,1% albúmina de suero bovino), 0,1% SDS y 200 mg/mL ADN de esperma de salmón desnaturalizado) que contiene una sonda marcada. La membrana se somete a dos lavados secuenciales de astringencia media (es decir, $2 \times \text{SSC}$, 0,1% SDS durante 15 min a 45°C , seguido de $2 \times \text{SSC}$, 0,1% SDS durante 15 min a 50°C), seguido de dos lavados secuenciales de astringencia mayor (es decir, $0,2 \times \text{SSC}$, 0,1% SDS durante 12 min a 55°C seguido de $0,2 \times \text{SSC}$ y 0,1% disolución SDS durante 12 min a $65-68^\circ\text{C}$).

Los polinucleótidos y fusiones de éstos pueden prepararse, manipularse y/o expresarse usando cualquiera de una variedad de técnicas bien establecidas conocidas y disponibles en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótidos que codifican polipéptidos de la invención, o proteínas de fusión o equivalentes funcionales de éstos, pueden usarse en moléculas de ADN recombinante para dirigir la expresión de un polipéptido aminoacil-ARNt sintetasa truncado y/o variante en células huésped apropiadas. Debido a la degeneración inherente del código genético, pueden producirse otras secuencias de ADN que codifican sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos o una funcionalmente equivalente y estas secuencias pueden usarse para clonar y expresar un polipéptido dado.

Como entenderán los expertos en la técnica, puede ser ventajoso en algunos casos producir secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos que poseen codones no naturales. Por ejemplo, los codones preferidos para un huésped procariota o eucariota particular pueden seleccionarse para incrementar la proporción de la expresión de la proteína o para producir un transcrito de ARN recombinante que tiene propiedades deseables, tales como una vida media que es mayor que la de un transcrito generado a partir de una secuencia natural.

Además, las secuencias de polinucleótido como se describe pueden prepararse por ingeniería usando métodos conocidos generalmente en la técnica con el fin de alterar las secuencias que codifican el polipéptido por una variedad de razones, incluyendo pero no limitado a, alteraciones que modifican la clonación, procesamiento, expresión y/o actividad del producto génico.

Con el fin de expresar un polipéptido deseado, una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido, o un equivalente funcional, puede insertarse en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificadora insertada. Los métodos que son muy conocidos para los expertos en la técnica pueden usarse para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican un polipéptido de interés y elementos de control apropiados de la transcripción y traducción. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante in vitro, técnicas sintéticas, y recombinación genética in vivo. Dichas técnicas se describen en Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (1989), y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (1989).

Se conoce una variedad de sistemas de vectores de expresión/huésped y pueden utilizarse para contener y expresar secuencias de polinucleótido. Éstos incluyen, pero no están limitados a, microorganismos tales como bacterias transformadas con bacteriófago recombinante, vectores de expresión de ADN en plásmido, o cósmido; levaduras transformadas con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células de plantas transformadas con vectores de expresión de virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, plásmidos Ti o pBR322); o sistemas de células animales.

Los "elementos de control" o "secuencias reguladoras" presentes en un vector de expresión son aquellas regiones no traducidas del vector - potenciadores, promotores, regiones no traducidas 5' y 3' - que interaccionan con proteínas celulares del huésped para llevar a cabo la transcripción y traducción. Dichos elementos pueden variar en su fuerza y especificidad. Dependiendo del sistema de vector y célula utilizado, puede usarse cualquier número de elementos de la transcripción y traducción, incluyendo promotores constitutivos e inducibles. Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, pueden usarse promotores inducibles tales como el promotor híbrido lacZ del fagémido pBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla, Calif.) o plásmido PSPORT1 (Gibco BRL, Gaithersburg, Md.) y semejantes. En sistemas de células de mamíferos, se prefieren generalmente los promotores de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. Si es necesario generar una línea celular que contiene múltiples copias de la secuencia que codifica un polipéptido, pueden usarse ventajosamente los vectores basados en SV40 o EBV con un marcador seleccionable apropiado.

En sistemas bacterianos, pueden seleccionarse varios vectores de expresión dependiendo del uso pretendido del polipéptido expresado. Por ejemplo, cuando se necesitan grandes cantidades, pueden usarse vectores que dirigen la expresión a alto nivel de proteínas de fusión que se purifican fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero no están limitados a, la clonación multifuncional en *E. coli* y vectores de expresión tales como BLUESCRIPT (Stratagene), en

el que la secuencia que codifica el polipéptido de interés puede ligarse en el vector en marco con secuencias para la Met amino-terminal y los 7 residuos posteriores de β -galactosidasa de manera que se produce una proteína híbrida; los vectores pIN (Van Heeke y Schuster, J. Biol. Chem. 264:5503-5509 (1989)); y semejantes. Los vectores pGEX (Promega, Madison, Wis.) también pueden usarse para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente de las células lisadas por adsorción a lechos de glutatión-agarosa seguido de elución en presencia de glutatión libre. Las proteínas preparadas en dichos sistemas pueden diseñarse para incluir sitios de escisión de heparina, trombina, o factor XA proteasa de manera que el polipéptido clonado de interés puede liberarse del resto GST cuando se desee.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, pueden usarse varios vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles tales como factor alfa, alcohol oxidasa, y PGH. Para revisiones, véase Ausubel et al. (supra) y Grant et al., *Methods Enzymol.* 153:516-544(1987).

En los casos en los que se usan vectores de expresión de plantas, la expresión de secuencias que codifican polipéptidos puede estar dirigida por cualquiera de varios promotores. Por ejemplo, pueden usarse promotores virales tales como promotores 35S y 19S de CaMV solos o en combinación con la secuencia líder omega de TMV (Takamatsu, *EMBO J.* 6:307-311 (1987)). Alternativamente, pueden usarse promotores de plantas tales como la subunidad pequeña de RUBISCO o promotores de choque térmico (Coruzzi et al., *EMBO J.* 3:1671-1680 (1984); Broglie et al., *Science* 224:838-843 (1984); y Winter et al., *Results Probl. Cell Differ.* 17:85-105 (1991)). Estas construcciones pueden introducirse en células de planta por transformación de ADN directa o transfección mediada por patógeno. Dichas técnicas se describen en varias revisiones disponibles generalmente (véase, por ejemplo, Hobbs en McGraw Hill, *Yearbook of Science and Technology*, pp. 191-196 (1992)).

También puede usarse un sistema de insecto para expresar un polipéptido de interés. Por ejemplo, en uno de dichos sistemas, se usa el virus de polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes extraños en células de *Spodoptera frugiperda* o en larvas de *Trichoplusia*. Las secuencias que codifican el polipéptido pueden clonarse en una región no esencial del virus, tal como el gen de polihedrina, y ponerse bajo el control del promotor de polihedrina. La inserción exitosa de la secuencia que codifica el polipéptido dará lugar al gen de polihedrina inactivo y producirá virus recombinantes que carecen de proteína de cubierta. Los virus recombinantes pueden usarse para infectar, por ejemplo, células de *S. frugiperda* o larvas de *Trichoplusia* en las que el polipéptido de interés puede expresarse (Engelhard et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:3224-3227 (1994)).

En células huésped de mamífero, están disponibles generalmente varios sistemas de expresión basados en virus. Por ejemplo, en los casos en los que se usa un adenovirus como un vector de expresión, las secuencias que codifican un polipéptido de interés pueden ligarse en un complejo de transcripción/traducción de adenovirus que consiste en el promotor tardío y secuencia líder tripartita. La inserción en una región no esencial E1 o E3 del genoma viral puede usarse para obtener un virus viable que es capaz de expresar el polipéptido en células huésped infectadas (Logan y Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:3655-3659 (1984)). Además, pueden usarse potenciadores de la transcripción, tales como el potenciador del virus del sarcoma de Rous (RSV) o la región potenciadora/promotora inmediata/temprana de citomegalovirus (CMV) para incrementar la expresión en células huésped de mamífero.

También pueden usarse señales de inicio específicas para conseguir una traducción más eficiente de secuencias que codifican un polipéptido de interés. Dichas señales incluyen el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes. En los casos en los que se insertan secuencias que codifican el polipéptido, su codón de inicio, y secuencias en 5' en el vector de expresión adecuado, pueden no necesitarse señales de control de la transcripción o traducción adicionales. Sin embargo, en los casos en los que se inserta sólo la secuencia codificadora, o una parte de ésta, deben proporcionarse señales de control de la traducción exógenas incluyendo el codón de inicio ATG. Además, el codón de inicio debe estar en el marco de lectura correcto para asegurar la traducción del inserto completo. Los elementos de la traducción exógenos y codones de inicio pueden tener varios orígenes, tanto natural como sintético. La eficiencia de la expresión puede aumentarse por la inclusión de potenciadores que sean apropiados para el sistema celular particular que se usa, tales como aquellos descritos en la bibliografía (Scharf. et al., *Results Probl. Cell Differ.* 20:125-162 (1994)).

Además, una cepa de célula huésped puede elegirse por su capacidad de modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la proteína expresada en la forma deseada. Dichas modificaciones del polipéptido incluyen, pero no están limitadas a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación, y acilación. El procesamiento posterior a la traducción que escinde una forma "prepro" de la proteína también puede usarse para facilitar la inserción, plegamiento y/o función correctas. Pueden elegirse diferentes células huésped tales como CHO, HeLa, MDCK, HEK293, y W138, que tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades posteriores a la traducción, para asegurar la modificación y procesamiento correctos de la proteína extraña.

Para una producción a largo plazo, con alto rendimiento, de las proteínas recombinantes, se prefiere generalmente la expresión estable. Por ejemplo, pueden transformarse líneas celulares que expresan de manera estable un polinucleótido de interés usando vectores de expresión que pueden contener orígenes virales de replicación y/o

elementos de expresión endógenos y un gen de marcador seleccionable en el mismo vector o en un vector separado. Después de la introducción del vector, puede dejarse que las células crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de cambiarlas a medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento y recuperación de las células que expresan con éxito las secuencias introducidas. Los clones resistentes de células transformadas de manera estable pueden proliferar usando técnicas de cultivo tisular apropiadas para el tipo celular.

Puede usarse cualquier número de sistemas de selección para recuperar las líneas celulares transformadas. Éstos incluyen, pero no están limitados a, los genes de timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler et al., Cell 11:223-232 (1977)) y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy et al., Cell 22:817-823 (1990)) que pueden emplearse en células tk- o aprt-, respectivamente. También puede usarse resistencia a antimetabolito, antibiótico o herbicida como la base de la selección; por ejemplo, dhfr que confiere resistencia a metotrexato (Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:3567-70 (1980)); npt, que confiere resistencia a los aminoglicósidos, neomicina y G-418 (Colbere-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150:1-14 (1981)); y als o pat, que confieren resistencia a clorsulfurón y fosfinotricina acetiltransferasa, respectivamente (Murry, supra). Se han descrito genes seleccionables adicionales, por ejemplo, trpB, que permite a las células utilizar indol en lugar de triptófano, o hisD, que permite a las células utilizar histinol en lugar de histidina (Hartman y Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:8047-51 (1988)). El uso de marcadores visibles ha ganado popularidad con marcadores tales como antocianinas, β -glucuronidasa y su sustrato GUS, y luciferasa y su sustrato luciferina, siendo usados ampliamente no sólo para identificar transformantes, sino también para cuantificar la cantidad de expresión de proteína temporal o estable atribuible a un sistema de vector específico (Rhodes et al., Methods Mol. Biol. 55:121-131 (1995)).

En la técnica se conoce una variedad de protocolos para detectar y medir la expresión de productos codificados por polinucleótidos, usando bien anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para el producto. Los ejemplos incluyen el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), y separación de células activada por fluorescencia (FACS). Éstos y otros ensayos se describen, entre otros lugares, en Hampton et al., Serological Methods, a Laboratory Manual (1990) y Maddox et al., J. Exp. Med. 158:1211-1216 (1983).

Los expertos en la técnica conocen una amplia variedad de marcadores y técnicas de conjugación y pueden usarse en varios ensayos de ácidos nucleicos y aminoácidos. Los medios para producir sondas marcadas de hibridación o PCR para detectar secuencias relacionadas con los polinucleótidos incluyen oligomarcage, traslación de mella, y marcate terminal o amplificación por PCR usando un nucleótido marcado. Alternativamente, las secuencias, o cualquier parte de éstas pueden clonarse en un vector para la producción de una sonda de ARNm. Dichos vectores son conocidos en la técnica, están disponibles comercialmente, y pueden usarse para sintetizar sondas de ARN in vitro por la adición de una ARN polimerasa apropiada tal como T7, T3, o SP6 y nucleótidos marcados. Estos procedimientos pueden llevarse a cabo usando una variedad de kits disponibles comercialmente. Las moléculas informadoras o etiquetas adecuadas, que pueden usarse incluyen radionúclidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes, o cromogénicos así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas, y semejantes.

Las células huésped transformadas con una secuencia de polinucleótido de interés pueden cultivarse en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína del cultivo celular. La proteína producida por una célula recombinante puede secretarse o estar contenida intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o del vector usado. Como entenderán los expertos en la técnica, pueden diseñarse vectores de expresión que contienen polinucleótidos de la invención para contener secuencias señal que dirigen la secreción del polipéptido codificado a través de la membrana celular procariota o eucariota. Pueden usarse otras construcciones recombinantes para unir secuencias que codifican un polipéptido de interés a la secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de polipéptido que facilitará la purificación de proteínas solubles.

Composiciones de anticuerpo, fragmentos de éstos y otros agentes de unión

También se describen agentes de unión, tales como anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de éstos, que presentan unión inmunológica a un polipéptido descrito en la presente memoria, o a una parte, variante o derivado de éste, y métodos para usar los mismos. Preferiblemente, dichos agentes de unión son efectivos para modular una o más de las actividades no canónicas mediadas por un polipéptido AARS, o para detectar la presencia o ausencia de polipéptidos AARS seleccionados (por ejemplo, truncamientos, variantes de corte y empalme alternativo, mutantes) en una muestra, tal como una muestra biológica obtenida de un sujeto.

Por ejemplo, se describe un método para identificar o caracterizar un polipéptido AARS en un sujeto, que comprende obtener una muestra biológica del sujeto, poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno de éste, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une específicamente a un polipéptido AARS como se describe, y detectar la presencia o ausencia del anticuerpo unido, o fragmento de unión a antígeno de éste, identificando o caracterizando de esta manera el polipéptido AARS en el sujeto. En determinados aspectos, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno de éste, se une específicamente a un polipéptido AARS variante o truncado determinado, tal como un mutante seleccionado AARS o variante de corte y empalme alternativo, pero no se une específicamente a otros polipéptidos AARS, tal como un polipéptido AARS de longitud completa, de tipo salvaje.

Se dice que un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno de éste, se "une específicamente," "se une inmunológicamente," y/o es "inmunológicamente reactivo" a un polipéptido de la invención si reacciona a un nivel detectable (en, por ejemplo, un ensayo ELISA) con el polipéptido, y no reacciona de manera detectable con polipéptidos no relacionados en condiciones similares.

La unión inmunológica, tal y como se usa en este contexto, se refiere generalmente a las interacciones no covalentes del tipo que ocurren entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para el que la inmunoglobulina es específica. La fuerza, o afinidad de las interacciones de unión inmunológica pueden expresarse en términos de la constante de disociación (K_d) de la interacción, en el que una K_d menor representa una mayor afinidad. Las propiedades de la unión inmunológica de polipéptidos seleccionados pueden cuantificarse usando métodos muy conocidos en la técnica. Uno de dichos métodos conlleva medir las velocidades de la formación del complejo sitio unión a antígeno/antígeno y disociación, en el que esas velocidades dependen de las concentraciones de las parejas del complejo, la afinidad de la interacción, y de parámetros geométricos que influyen igualmente en la velocidad en ambas direcciones. Así, tanto la "constante de asociación" (k_{on}) como la "constante de disociación" (k_{off}) pueden determinarse por el cálculo de las concentraciones y las velocidades reales de asociación y disociación. La proporción de k_{off}/k_{on} permite la cancelación de todos los parámetros no relacionados con la afinidad, y es así igual a la constante de disociación K_d . Véase, generalmente, Davies et al. (1990) Annual Rev. Biochem. 59:439-473.

Un "sitio de unión a antígeno," o "parte de unión" de un anticuerpo se refiere a la parte de la molécula de inmunoglobulina que participa en la unión al antígeno. El sitio de unión al antígeno está formado por residuos de aminoácidos de las regiones variables N-terminales ("V") de las cadenas pesada ("H") y ligera ("L"). Estas cadenas altamente divergentes en las regiones V de las cadenas pesada y ligera se refieren como "regiones hipervariables" que están interpuestas entre cadenas flanqueantes más conservadas conocidas como "regiones marco," o "FR." Así, el término "FR" se refiere a secuencias de aminoácidos que se encuentran naturalmente entre y adyacentes a regiones hipervariables en las inmunoglobulinas. En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables de una cadena ligera y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada están dispuestas una respecto a otra en espacio tridimensional para formar una superficie de unión a antígeno. La superficie de unión a antígeno es complementaria a la superficie tridimensional de un antígeno unido, y las tres regiones hipervariables de cada una de las cadenas pesada y ligera se refieren como "regiones determinantes de la complementariedad," o "CDR."

Un agente de unión puede ser, por ejemplo, un ribosoma, con o sin un componente peptídico, una molécula de ARN o un polipéptido. Un agente de unión puede ser un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de éste. Los anticuerpos pueden prepararse por cualquiera de una variedad de técnicas conocidas para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. En general, los anticuerpos pueden producirse por técnicas de cultivo celular, incluyendo la generación de anticuerpos monoclonales como se describe en la presente memoria, o mediante transfección de genes de anticuerpo en huéspedes celulares bacterianos o de mamífero adecuados, con el fin de permitir la producción de anticuerpos recombinantes. En una técnica, un inmunógeno que comprende el polipéptido se inyecta inicialmente en cualquiera de una amplia variedad de mamíferos (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, ovejas o cabras). En esta etapa, los polipéptidos como se describe pueden servir como el inmunógeno sin modificación. Alternativamente, particularmente para polipéptidos relativamente cortos, puede incitarse una respuesta inmune superior si el polipéptido se une a una proteína vehicular, tal como albúmina de suero bovino o hemocianina de lapa. El inmunógeno se inyecta en el huésped animal, preferiblemente según un esquema predeterminado incorporando una o más inmunizaciones de refuerzo, y los animales se sangran periódicamente. Los anticuerpos policlonales específicos para el polipéptido pueden purificarse de dichos antiseros, por ejemplo, por cromatografía de afinidad usando el polipéptido acoplado a un soporte sólido adecuado.

Los anticuerpos monoclonales específicos para un polipéptido de interés pueden prepararse, por ejemplo, usando la técnica de Kohler y Milstein, Eur. J. Immunol. 6:511-519, 1976, y mejoras de ésta. Brevemente, estos métodos implican la preparación de líneas celulares inmortales capaces de producir anticuerpos que tienen la especificidad deseada (es decir, reactividad con el polipéptido de interés). Dichas líneas celulares pueden producirse, por ejemplo, a partir de células del bazo obtenidas de un animal inmunizado como se ha descrito anteriormente. Las células del bazo se immortalizan, por ejemplo, por fusión con una pareja de fusión de células de mieloma, preferiblemente una que es singénica con el animal inmunizado. Pueden emplearse una variedad de técnicas de fusión. Por ejemplo, las células de bazo y las células de mieloma pueden combinarse con un detergente no iónico durante unos pocos minutos y plaquearse a baja densidad en un medio selectivo que soporta el crecimiento de las células híbridas, pero no de las células de mieloma. Una técnica de selección preferida usa selección HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). Después de un tiempo suficiente, habitualmente aproximadamente 1 a 2 semanas, se observan colonias de híbridos. Se seleccionan colonias individuales y sus sobrenadantes de cultivo se ensayan para actividad de unión frente al polipéptido. Se prefieren los hibridomas que tienen alta reactividad y especificidad.

Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse de los sobrenadantes de colonias de hibridoma en crecimiento. Además, pueden emplearse varias técnicas para aumentar el rendimiento, tal como inyección de la línea celular de hibridoma en la cavidad peritoneal de un huésped vertebrado adecuado, tal como un ratón. Los anticuerpos monoclonales pueden recogerse del fluido de ascites o la sangre. Los contaminantes pueden eliminarse de los anticuerpos por técnicas convencionales, tales como cromatografía, filtración en gel, precipitación, y extracción. Los

polipéptidos como se describe pueden usarse en el proceso de purificación, por ejemplo, en una etapa de cromatografía de afinidad.

En la técnica se conocen varias moléculas terapéuticamente útiles que comprenden sitios de unión a antígeno que son capaces de presentar propiedades de unión inmunológica de una molécula de anticuerpo. La enzima proteolítica papaina escinde preferiblemente moléculas de IgG para rendir varios fragmentos, dos de los cuales (los fragmentos "F(ab)") comprende cada uno un heterodímero covalente que incluye un sitio de unión a antígeno intacto. La enzima pepsina es capaz de escindir moléculas de IgG para proporcionar varios fragmentos, incluyendo el fragmento "F(ab)₂" que comprende ambos sitios de unión a antígeno. Un fragmento "Fv" puede producirse por escisión proteolítica preferencial de una IgM, y en raras ocasiones molécula de inmunoglobulina IgG o IgA. Los fragmentos Fv, sin embargo, se obtienen más comúnmente usando técnicas recombinantes conocidas en la técnica. El fragmento Fv incluye un heterodímero V_H:V_L no covalente incluyendo un sitio de unión a antígeno que retiene la mayor parte de las capacidades de reconocimiento y unión a antígeno de la molécula de anticuerpo nativa. Inbar et al. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69:2659-2662; Hochman et al. (1976) Biochem 15:2706-2710; y Ehrlich et al. (1980) Biochem 19:4091-4096.

Un polipéptido de cadena única Fv ("sFv") es un heterodímero V_H:V_L unido covalentemente que se expresa a partir de una fusión génica incluyendo genes que codifican V_H y V_L unidos por un conector que codifica un péptido. Huston et al. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85(16):5879-5883. Se han descrito varios métodos para discernir estructuras químicas para convertir las cadenas de polipéptido de cadena ligera y pesada agregadas naturalmente- pero químicamente separadas- de una región V de anticuerpo en una molécula sFv que se plegará en una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de unión a antígeno. Véanse, por ejemplo, Pat. U.S. Nos. 5.091.513 y 5.132.405, de Huston et al.; y Pat. U.S. No. 4.946.778, de Ladner et al.

Cada una de las moléculas descritas anteriormente incluye un conjunto de CDR de cadena pesada y de cadena ligera, interpuestos respectivamente entre un conjunto de FR de cadena pesada y de cadena ligera que proporciona soporte a las CDR y define una relación espacial de las CDR una respecto a la otra. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "conjunto de CDR" se refiere a las tres regiones hipervariables de una región V de cadena pesada o ligera. Desde el extremo N de una cadena pesada o ligera, estas regiones se indican como "CDR1," "CDR2," y "CDR3" respectivamente. Un sitio de unión a antígeno, por lo tanto, incluye seis CDR, que comprenden el conjunto de CDR de cada una de una región V de cadena pesada y cadena ligera. Un polipéptido que comprende una única CDR, (por ejemplo, una CDR1, CDR2 o CDR3) se refiere en la presente memoria como una "unidad de reconocimiento molecular." Los análisis cristalográficos de varios complejos antígeno-anticuerpo han demostrado que los residuos de aminoácidos de las CDR forman un contacto extenso con el antígeno unido, en el que el contacto más extenso con el antígeno es con CDR3 de cadena pesada. Así, las unidades de reconocimiento molecular son responsables principalmente de la especificidad de un sitio de unión a antígeno.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "conjunto de FR" se refiere a las cuatro secuencias de aminoácidos flanqueantes que enmarcan las CDR de un conjunto de CDR de una región V de cadena pesada o ligera. Algunos residuos de FR pueden contactar el antígeno unido; sin embargo, las FR son responsables principalmente del plegamiento de la región V en el sitio de unión a antígeno, particularmente los residuos de FR directamente adyacentes a las CDR. En las FR, determinados residuos de aminoácidos y determinadas características estructurales están altamente conservadas. A este respecto, todas las secuencias de región V contienen un bucle disulfuro interno de aproximadamente 90 residuos de aminoácidos. Cuando las regiones V se pliegan en un sitio de unión, las CDR se presentan como restos de bucle proyectados que forman una superficie de unión a antígeno. Se reconoce generalmente que hay regiones estructurales conservadas de las FR que influyen en la forma plegada de los bucles de CDR en determinadas estructuras "canónicas" -- independientemente de la secuencia de aminoácidos precisa de la CDR. Además, se sabe que determinados residuos de FR participan en contactos interdominio no covalentes que estabilizan la interacción de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo.

Se han descrito varias moléculas de anticuerpo "humanizadas" que comprenden un sitio de unión a antígeno derivado de una inmunoglobulina no humana, incluyendo anticuerpos quiméricos que tienen regiones V de roedor y sus CDR asociadas fusionadas con dominios constantes humanos (Winter et al. (1991) Nature 349:293-299; Lobuglio et al. (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:4220-4224; Shaw et al. (1987) J Immunol. 138:4534-4538; y Brown et al. (1987) Cancer Res. 47:3577-3583), CDR de roedor injertadas en un FR de soporte humano antes de fusión con un dominio constante de anticuerpo humano apropiado (Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536; y Jones et al. (1986) Nature 321:522-525), y CDR de roedor soportadas por FR de roedor recubiertas recombinantemente (Publicación de Patente Europea No. 519.596, publicada el 23 de dic., 1992). Estas moléculas "humanizadas" se diseñan para minimizar una respuesta inmunológica no deseada hacia moléculas de anticuerpo antihumano de roedor lo que limita la duración y eficacia de las aplicaciones terapéuticas de estos restos en receptores humanos.

Tal y como se usa en la presente memoria, los términos "FR recubiertas" y "FR recubiertas recombinantemente" se refieren al reemplazo selectivo de residuos de FR de, por ejemplo, una región V de cadena pesada o ligera de roedor, con residuos de FR humano con el fin de proporcionar una molécula xenogénica que comprende un sitio de unión a antígeno que retiene sustancialmente toda la estructura de plegamiento del polipéptido FR nativo. Las técnicas de recubrimiento se basan en la comprensión de que las características de unión a ligando de un sitio de

unión a antígeno están determinadas principalmente por la estructura y disposición relativa de los conjuntos de CDR de cadena pesada y ligera en la superficie de unión a antígeno. Davies et al. (1990) Ann. Rev. Biochem. 59:439-473. Así, la especificidad de la unión a antígeno puede conservarse en un anticuerpo humanizado sólo cuando se mantienen cuidadosamente las estructuras CDR, su interacción entre sí, y su interacción con el resto de los dominios de la región V. Mediante el uso de técnicas de recubrimiento, los residuos de FR exteriores (por ejemplo, accesibles a disolvente) que son encontrados fácilmente por el sistema inmune se reemplazan selectivamente con residuos humanos para proporcionar una molécula híbrida que comprende bien una superficie débilmente inmunogénica, o sustancialmente no inmunogénica.

También se describen anticuerpos monoclonales que pueden acoplarse a uno o más agentes de interés. Por ejemplo, un agente terapéutico puede acoplarse (por ejemplo, unirse covalentemente) a un anticuerpo monoclonal adecuado bien directamente o indirectamente (por ejemplo, mediante un grupo conector). Una reacción directa entre un agente y un anticuerpo es posible cuando cada uno posee un sustituyente capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleofílico, tal como un grupo amino o sulfidrido, en uno puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contiene carbonilo, tal como un anhídrido o haluro de ácido, o con un grupo alquilo que contiene un buen grupo saliente (por ejemplo, un haluro) en el otro.

Alternativamente, puede ser deseable acoplar un agente terapéutico y un anticuerpo a través de un grupo conector. Un grupo conector puede funcionar como un espaciador para distanciar un anticuerpo de un agente con el fin de evitar interferencia con las capacidades de unión. Un grupo conector también puede servir para incrementar la reactividad química de un sustituyente en un agente o un anticuerpo, e incrementar así la eficiencia del acoplamiento. Un incremento en la reactividad química también puede facilitar el uso de agentes, o grupos funcionales en agentes, que de otra manera no sería posible.

Será evidente para los expertos en la técnica que pueden emplearse como el grupo conector una variedad de reactivos bifuncionales o polifuncionales, tanto homo- como hetero-funcionales (tales como los descritos en el catálogo de Pierce Chemical Co., Rockford, IL). El acoplamiento puede efectuarse, por ejemplo, a través de grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfidrido o residuos de carbohidrato oxidados. Hay numerosas referencias que describen dicha metodología, por ejemplo, Patente U.S. No. 4.671.958, de Rodwell et al.

Cuando un agente terapéutico es más potente cuando está libre de la parte de anticuerpo de los inmunoconjugados de la presente invención, puede ser deseable usar un grupo conector que es escindible durante o después de la internalización en una célula. Se han descrito varios grupos conectores escindibles diferentes. Los mecanismos para la liberación intracelular de un agente de estos grupos conectores incluyen escisión por reducción de un enlace disulfuro (por ejemplo, Patente U.S. No. 4.489.710, de Spitler), por irradiación de un enlace fotolábil (por ejemplo, Patente U.S. No. 4.625.014, de Senter et al.), por hidrólisis de cadenas laterales de aminoácidos derivatizadas (por ejemplo, Patente U.S. No. 4.638.045, de Kohn et al.), por hidrólisis mediada por complemento del suero (por ejemplo, Patente U.S. No. 4.671.958, de Rodwell et al.), e hidrólisis catalizada por ácido (por ejemplo, Patente U.S. No. 4.569.789, de Blattler et al.).

Puede ser deseable acoplar más de un agente a un anticuerpo. En una realización, se acoplan múltiples moléculas de un agente a una molécula de anticuerpo. En otra realización, puede acoplarse más de un tipo de agente a un anticuerpo. Independientemente de la realización particular, los inmunoconjugados con más de un agente pueden prepararse de varias maneras. Por ejemplo, puede acoplarse más de un agente directamente a una molécula de anticuerpo, o pueden usarse conectores que proporcionan múltiples sitios para la unión.

Modulación de respuestas inflamatorias y métodos de uso

Las realizaciones de la presente descripción se refieren al descubrimiento de que polipéptidos aminoácil-ARNt sintetasa (AARS), y variantes de éstos, modulan la inflamación en una variedad de formas útiles, tanto in vitro como in vivo. Por ejemplo, en determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, los polipéptidos HRS para uso según la reivindicación 1 reducen una respuesta inflamatoria, tal como reduciendo la migración o infiltración de células inmunes en tejidos seleccionados, incrementando la producción de citoquinas anti-inflamatorias, o reduciendo la producción de citoquinas pro-inflamatorias, entre otros mecanismos.

"Inflamación" se refiere generalmente a la respuesta biológica de tejidos a estímulos dañinos, tal como patógenos, células dañadas (por ejemplo, heridas), e irritantes. El término "respuesta inflamatoria" se refiere a los mecanismos específicos por los que la inflamación se consigue y regula, incluyendo, meramente como ilustración, activación o migración de células inmunes, producción de citoquinas, vasodilatación, incluyendo liberación de quinina, fibrinólisis, y coagulación, entre otros descritos en la presente memoria y conocidos en la técnica. Idealmente, la inflamación es un intento protector del cuerpo tanto para eliminar el estímulo injurioso como para iniciar el proceso de cicatrización para el tejido o tejidos afectados. En ausencia de inflamación, las heridas e infecciones nunca cicatrizarían, creando una situación en la que la destrucción progresiva del tejido amenazaría la supervivencia. Por otra parte, la inflamación excesiva o crónica puede estar asociada con una variedad de enfermedades, tal como fiebre del heno, aterosclerosis, y artritis reumatoide, entre otras descritas en la presente memoria y conocidas en la técnica.

Los polipéptidos HRS para uso según la reivindicación 1 pueden modular la inflamación aguda, inflamación crónica, o ambas. Dependiendo de las necesidades del sujeto, determinadas realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a reducir la inflamación aguda o respuestas inflamatorias, y determinadas realizaciones se refieren a reducir la inflamación crónica o respuestas inflamatorias crónicas.

- 5 La inflamación aguda se refiere a la respuesta inicial del cuerpo a estímulos presumiblemente dañinos e implica un movimiento incrementado de plasma y leucocitos desde la sangre a los tejidos dañados. Es un proceso a corto plazo, empezando típicamente en minutos u horas y finalizando después de la eliminación del estímulo injurioso. La inflamación aguda puede caracterizarse por una cualquiera o más de enrojecimiento, calor incrementado, hinchazón, dolor, y pérdida de función. El enrojecimiento y calor se deben principalmente a un flujo sanguíneo incrementado a temperatura corporal central al sitio inflamado, la hinchazón está causada por la acumulación de fluido, el dolor se debe típicamente a la liberación de químicos que estimulan las terminaciones nerviosas, y la pérdida de función tiene múltiples causas.

- 15 Las respuestas inflamatorias agudas se inician principalmente por células inmunes locales, tales como macrófagos residentes, células dendríticas, histiocitos, células de Kupffer y mastocitos. En el inicio de una infección, quemadura, u otras lesiones, estas células experimentan activación y liberan mediadores inflamatorios responsables de los signos clínicos de la inflamación, tales como aminas vasoactivas y eicosanoides. La vasodilatación y su flujo sanguíneo incrementado resultante causa el enrojecimiento y calor incrementado. La permeabilidad incrementada de los vasos sanguíneos resulta en una exudación o extravasación de proteínas plasmáticas y fluido en el tejido, lo que crea la hinchazón. Determinados mediadores liberados tales como bradiquinina incrementan la sensibilidad al dolor, y alteran los vasos sanguíneos para permitir la migración o extravasación de leucocitos, tales como neutrófilos, que migran típicamente a lo largo de un gradiente quimiotáctico creado por las células inmunes locales.

- 20 Las respuestas inflamatorias agudas también incluyen uno o más sistemas de cascada bioquímicos acelulares, que consisten en modulado de proteínas plasmáticas preformadas, que actúan en paralelo para iniciar y propagar la respuesta inflamatoria. Estos sistemas incluyen el sistema del complemento, que se activa principalmente por bacterias, y los sistemas de coagulación y fibrinólisis, que se activan principalmente por necrosis, tal como el tipo de daño tisular que es causado por determinadas infecciones, quemaduras, u otros traumas. Por lo tanto, los polipéptidos HRS pueden usarse para reducir la inflamación aguda, o cualquiera de una o más de las respuestas inflamatorias agudas individuales.

- 25 La inflamación crónica, una respuesta inflamatoria prolongada y retrasada, se caracteriza por un desplazamiento progresivo en el tipo de células que están presentes en el sitio de la inflamación, y da lugar frecuentemente a la destrucción y cicatrización simultánea o casi simultánea del tejido a partir del proceso inflamatorio. A nivel celular, las respuestas inflamatorias crónicas implican una variedad de células inmunes tales como monocitos, macrófagos, linfocitos, células plasmáticas, y fibroblastos, aunque a diferencia de la inflamación aguda, que está mediada principalmente por granulocitos, la inflamación crónica está mediada principalmente por células mononucleares tales como monocitos y linfocitos. La inflamación crónica también implica una variedad de mediadores inflamatorios, tales como IFN- γ y otras citoquinas, factores de crecimiento, especies de oxígeno reactivas, y enzimas hidrolíticas. La inflamación crónica puede durar durante muchos meses o años, y puede resultar en la destrucción de tejido y fibrosis no deseada.

- 30 Los signos clínicos de la inflamación crónica dependen de la duración de la enfermedad, lesiones inflamatorias, causa y área anatómica afectada. (véase, por ejemplo, Kumar et al., Robbins Basic Pathology-8^a Ed., 2009 Elsevier, Londres; Miller, LM, Pathology Lecture Notes, Atlantic Veterinary College, Charlottetown, PEI, Canadá). La inflamación crónica está asociada con una variedad de afecciones o enfermedades patológicas, incluyendo, por ejemplo, alergias, enfermedad de Alzheimer, anemia, estenosis de la válvula aórtica, artritis tal como artritis reumatoide y osteoartritis, cáncer, fallo cardíaco congestivo, fibromialgia, fibrosis, ataque cardíaco, fallo renal, lupus, pancreatitis, ictus, complicaciones quirúrgicas, enfermedad pulmonar inflamatoria, enfermedad del intestino inflamatoria, aterosclerosis, y psoriasis, entre otras descritas en la presente memoria y conocidas en la técnica. Por lo tanto, los polipéptidos HRS pueden usarse para tratar o gestionar la inflamación crónica, reducir una cualquiera o más de las respuestas inflamatorias crónicas individuales, o tratar una cualquiera o más enfermedades o afecciones asociadas con la inflamación crónica.

- 35 Los polipéptidos HRS también pueden reducir la inflamación proliferativa, un proceso inflamatorio caracterizado por un incremento en el número de células tisulares. Éstas pueden englobar afecciones de la piel tales como psoriasis, seborrea o eccema, o también puede pensarse en ellas en términos de cánceres y crecimientos anormales especialmente a la vista de la evidencia que se acumula basada en métodos moleculares más eficientes para documentar incluso inflamación crónica de grado bajo.

- 40 En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, los polipéptidos HRS pueden reducir las respuestas inflamatorias a nivel celular, tal como modulando la activación, secreción de moléculas inflamatorias (por ejemplo, secreción de citoquinas o quinina), proliferación actividad, migración, o adhesión de varias células implicadas en la inflamación. Los ejemplos de dichas células incluyen células inmunes y células vasculares. Las células inmunes incluyen, por ejemplo, granulocitos tales como neutrófilos, eosinófilos y basófilos, macrófagos/monocitos, linfocitos tales como células B, células T asesinas (es decir, células T CD8+), células T

auxiliares (es decir, células T CD4+, incluyendo células T_H1 y T_H2), células asesinas naturales, células T $\gamma\delta$, células dendríticas, y mastocitos. Los ejemplos de células vasculares incluyen células de músculo liso, células endoteliales, y fibroblastos. También se describen polipéptidos HRS para uso según la reivindicación 1 en métodos para reducir una afección inflamatoria asociada con una o más células inmunes o células vasculares, incluyendo afecciones inflamatorias mediadas por neutrófilos, mediadas por macrófagos, y mediadas por linfocitos.

En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, los polipéptidos HRS pueden modular los niveles o actividad de moléculas inflamatorias, incluyendo moléculas inflamatorias derivadas de plasma y moléculas inflamatorias derivadas de células. Se incluyen moléculas pro-inflamatorias y moléculas anti-inflamatorias. Los ejemplos de moléculas inflamatorias derivadas plasma incluyen, sin limitación, proteínas o moléculas de uno cualquiera o más de sistema del complemento, sistema de quinina, sistema de coagulación, y el sistema de fibrinolisis. Los ejemplos de miembros del sistema del complemento incluyen C1, que existe en el suero sanguíneo como un complejo molecular que contiene aproximadamente 6 moléculas de C1q, 2 moléculas de C1r, y 2 moléculas de C1s, C2 (a y b), C3(a y B), C4 (a y b), C5, y el complejo de ataque a la membrana de C5a, C5b, C6, C7, C8, y C9. Los ejemplos del sistema de quinina incluyen bradiquinina, calidina, calidreínas, carboxipeptidasas, enzimas convertora de angiotensina, y endopeptidasa neutra.

Los ejemplos de moléculas inflamatorias derivadas de células incluyen, sin limitación, enzimas contenidas en gránulos de lisosomas, aminas vasoactivas, eicosanoides, citoquinas, proteínas de fase aguda, y gases solubles tal como óxido nítrico. Las aminas vasoactivas contienen al menos un grupo amino, y se dirigen a los vasos sanguíneos para alterar su permeabilidad o causar vasodilatación. Los ejemplos de aminas vasoactivas incluyen histamina y serotonina. Los eicosanoides se refieren a moléculas de señalización hechas por la oxidación de ácidos grasos esenciales de veinte carbonos, e incluyen prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos, y leucotrienos.

Las citoquinas se refieren a una variedad de sustancias que son secretadas por las células inmunes, e incluyen polipéptidos y glicoproteínas. Típicamente, las citoquinas se categorizan como citoquinas autocrinas, que actúan en el mismo tipo de célula del que se secreta la citoquina, o citoquinas paracrinas, que están restringidas a actuar en un tipo celular diferente del que se secreta la citoquina. Los ejemplos de citoquinas, ejemplos de sus células productoras, ejemplos de sus células diana, y actividades ejemplares se incluyen en las Tablas J y K siguientes.

Tabla K: Citoquinas

Citoquinas Inmunes Seleccionadas y Sus Actividades			
Citoquina	Célula Productora	Célula Diana	Actividad
GM-CSF	células Th	células progenitoras	crecimiento y diferenciación de monocitos y DC
IL-1a IL-1b	monocitos macrófagos células B DC	células Th	co-estimulación
		células B	maduración y proliferación
		células NK	activación
		varias	inflamación, respuesta de fase aguda, fiebre
IL-2	células Th1	células T y B activadas, células NK	crecimiento, proliferación, activación
IL-3	células Th células NK	células madre	crecimiento y diferenciación
		mastocitos	crecimiento y liberación de histamina
IL-4	células Th2	células B activadas	proliferación y diferenciación síntesis de IgG ₁ e IgE
		macrófagos	MHC Clase II
		células T	proliferación
IL-5	células Th2	células B activadas	proliferación y diferenciación síntesis de IgA
IL-6	monocitos macrófagos células Th2	células B activadas	diferenciación en células plasmáticas

Citoquinas Inmunes Seleccionadas y Sus Actividades			
Citoquina	Célula Productora	Célula Diana	Actividad
	células estromales	células plasmáticas	secreción de anticuerpos
		células madre	diferenciación
		varias	respuesta de fase aguda
IL-7	estroma de la médula estroma del timo	células madre	diferenciación en células B y T progenitoras
IL-8	macrófagos células endoteliales	neutrófilos	quimiotaxis
IL-10	células Th2	macrófagos	producción de citoquinas
		células B	activación
IL-12	macrófagos células B	células Tc activadas	diferenciación en CTL (con IL-2)
		células NK	activación
IFN- α	leucocitos	varias	replicación viral expresión de MHC I
IFN- β	fibroblastos	varias	replicación viral
			expresión de MHC I
IFN-gamma	células Th1, células Tc, células NK	varias	replicación viral
		macrófagos	expresión de MHC
		células B activadas	la clase Ig cambia a IgG _{2a}
		células Th2	proliferación
		macrófagos	eliminación de patógenos
MIP-1 α	macrófagos	monocitos, células T	quimiotaxis
MIP-1 β	linfocitos	monocitos, células T	quimiotaxis
TGF- β	células T, monocitos	monocitos, macrófagos	quimiotaxis
		macrófagos activados	síntesis de IL-1
		células B activadas	síntesis de IgA
		varias	proliferación
TNF- α	macrófagos, mastocitos, células NK	macrófagos	expresión de CAM y citoquina
		células tumorales	muerte celular
TNF- β	células Th1 y Tc	fagocitos	fagocitosis, producción de NO
		células tumorales	muerte celular

Tabla L: Citoquinas

Nombre Antiguo	Nombre Nuevo
ENA-78	CXCL5
GRO α	CXCL1
GRO β	CXCL2
GRO γ	CXCL3
PF4	CXCL4
IP-10	CXCL10
Mig	CXCL9
I-TAC	CXCL11
SDF-1 α/β	CXCL12
BCA-1	CXCL13
	CXCL16
BRAK	CXCL14
MCP-1	CCL2
MCP-4	CCL13
MCP-3	CCL7
MCP-2	CCL8
MIP-1 β	CCL4
MIP-1 α S	CCL3
MIP-1 α P	CCL3LI
RANTES	CCL5
MPIF-1	CCL23
HCC-1	CCL14
HCC-2	CCL15
HCC-4	CCL16
Eotaxina	CCL11
Eotaxina-2	CCL24
Eotaxina-3	CCL26
TARC	CCL17
MDC	CCL22
MIP-3 α	CCL20
ELC	CCL19

Nombre Antiguo	Nombre Nuevo
SLC	CCL21
I-309	CCL1
TECK	CCL25
CTACK	CCL27
MEC	CCL28
PARC	CCL18
Linfotactina	XCL1
SCM-1 β	XCL2
Fractalquina	CX3CL1

En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, los polipéptidos HRS incrementan los niveles de uno cualquiera o más de TNF- α , MIP-1b, IL-12(p40), KC, MIP-2, o IL-10. En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, los polipéptidos HRS incrementan la secreción de al menos uno de TNF- α e IL-10 por células mononucleares de sangre periférica (PBMC), incluyendo monocitos, linfocitos, o ambos. En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, los polipéptidos HRS incrementan la secreción de IL-2 por linfocitos tales como células T activadas. En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, los polipéptidos HRS reducen la secreción de TNF- α por células inmunes tales como PBMC, y en determinadas realizaciones descritas en la presente memoria reducen la secreción de TNF- α inducida por lipopolisacárido por éstas y otras células. En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, los polipéptidos HRS reducen la secreción de IL-12 por células inmunes tales como PBMC, y en determinadas realizaciones descritas en la presente memoria reducen la secreción de IL-12 inducida por lipopolisacárido por éstas y otras células.

Cada citoquina tiene típicamente un receptor de citoquina correspondiente. Los ejemplos de clases de receptores de citoquina incluyen, sin limitación, receptores de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig), tales como los tipos de receptor de IL-1, que comparten homología estructural con las inmunoglobulinas (anticuerpos), moléculas de adhesión celular, e incluso algunas citoquinas, y receptores de la familia del factor de crecimiento hematopoyético, tal como la familia del receptor de IL-2 y los receptores para GM-CSF, IL-3, e IL-5, receptores de la familia del interferón (tipo 2), incluyendo receptores para IFN β y γ . Los ejemplos adicionales incluyen receptores de la familia de los factores de necrosis tumoral (TNF) (tipo 3), que comparten un dominio de unión extracelular rico en cisteína común e interaccionan con varios otros ligandos distintos de citoquina tales como CD40, CD27 y CD30, receptores de la familia de siete hélices transmembrana, incluyendo los receptores acoplados a proteína G, y receptores de quimioquina tales como CXCR4 y CCR5, así como receptores para IL-8, MIP-1 y RANTES. Por lo tanto, en determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, los polipéptidos HRS pueden modular los niveles o actividad de una o más citoquinas seleccionadas, tales como las de las Tablas J y K, los niveles o actividad de uno o más receptores de citoquina seleccionados, la interacción entre citoquinas y sus receptores, o cualquier combinación de éstos.

Los polipéptidos HRS también pueden modular los niveles o actividad de proteínas de fase aguda. Los ejemplos de proteínas de fase aguda incluyen la proteína reactiva C, amiloide A sérico, amiloide P sérico, y vasopresina. En determinados casos, la expresión de proteínas de fase aguda puede causar un rango de efectos sistémicos no deseados incluyendo amiloidosis, fiebre, presión sanguínea incrementada, sudor disminuido, malestar, pérdida de apetito, y somnolencia. De acuerdo con esto, los polipéptidos HRS pueden modular los niveles o actividad de proteínas de fase aguda, sus efectos sistémicos, o ambos.

En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, los polipéptidos HRS reducen la inflamación local, inflamación sistémica, o ambas. En determinadas realizaciones, el polipéptido HRS puede reducir la inflamación local o las respuestas inflamatorias locales. En determinadas realizaciones, los polipéptidos HRS pueden reducir la inflamación sistémica o las respuestas inflamatorias sistémicas.

En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, la reducción de la inflamación o respuestas inflamatorias puede estar asociada con uno o más tejidos u órganos. Los ejemplos no limitativos de dichos tejidos u órganos incluyen piel (por ejemplo, dermis, epidermis, capa subcutánea), folículos pilosos, sistema nervioso (por ejemplo, cerebro, médula espinal, nervios periféricos), sistema auditivo u órganos de equilibrio (por ejemplo, oído interno, oído medio, oído externo), sistema respiratorio (por ejemplo, nariz, tráquea, pulmones), tejidos gastroesofágicos, el sistema gastrointestinal (por ejemplo, boca, esófago, estómago, intestino delgado, intestino

- grosso, recto), sistema vascular (por ejemplo, corazón, vasos sanguíneos, y arterias), hígado, vesícula biliar, sistema linfático/inmune (por ejemplo, nódulos linfáticos, folículos linfoides, bazo, timo, médula ósea), sistema urogenital (por ejemplo, riñones, uréter, vejiga, uretra, cuello uterino, trompas de Falopio, ovarios, útero, vulva, próstata, glándulas bulbouretrales, epididimitis, próstata, vesículas seminales, testículos), sistema músculo-esquelético (por ejemplo, músculos esqueléticos, músculos lisos, hueso, cartílago, tendones, ligamentos), tejido adiposo, mamas, y el sistema endocrino (por ejemplo, hipotálamo, pituitaria, tiroides, páncreas, glándulas adrenales). De acuerdo con esto, los polipéptidos HRS pueden usarse para reducir la inflamación asociada con cualquiera de estos tejidos u órganos, de manera que se tratan afecciones o enfermedades que están asociadas con la inflamación de estos tejidos u órganos.
- 10 Como se ha indicado anteriormente, determinadas realizaciones descritas en la presente memoria pueden emplear polipéptidos HRS para reducir la inflamación o respuestas inflamatorias asociadas con tejidos u órganos particulares. Se incluyen las respuestas inflamatorias y afecciones asociadas con la piel, incluyendo inflamación, infecciones, y cánceres asociados con las capas dérmica, epidérmica, y subcutánea de la piel. Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas con la piel incluyen, sin limitación, dermatitis, tal como psoriasis, dermatitis irritante, dermatitis seborreica, dermatitis atópica (eccema), dermatitis alérgica por contacto, dermatitis inducida por calor, dermatitis inducida por fármacos, dermatitis dishidrótica, urticaria, dermatitis autoinmune, cáncer de piel tal como melanoma, y dermatitis ampollosa. También se incluyen infecciones bacterianas, virales o parasitarias, eritema multiforme, eritema nodoso, granuloma anular, roble venenoso/hiedra venenosa, y necrosis epidérmica tóxica.
- 15 20 Determinadas realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a reducir respuestas inflamatorias y afecciones asociadas con el sistema nervioso, incluyendo inflamación, infecciones, y cáncer asociado con el cerebro y la médula espinal del sistema nervioso central, el sistema nervioso periférico, y las meninges. La expresión de mediadores inflamatorios incluyendo complemento, moléculas de adhesión, enzimas ciclooxigenasa y sus productos y citoquinas se incrementa en enfermedad neurodegenerativa experimental y clínica, y los estudios de intervención en animales experimentales sugieren que varios de estos factores contribuyen directamente al daño neuronal. Por ejemplo, citoquinas específicas, tales como interleuquina-1 (IL-1), se han implicado de forma importante en la neurodegeneración aguda, tal como ictus y daño en la cabeza.
- 25 Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas con el sistema nervioso incluyen, sin limitación, meningitis (es decir, inflamación de las membranas protectoras que cubren el cerebro y la médula espinal), mielitis, encefalomiелitis (por ejemplo, encefalomiелitis miálgica, encefalomiелitis aguda diseminada, encefalomiелitis diseminada o esclerosis múltiple, encefalomiелitis autoinmune), aracnoiditis (es decir, inflamación del aracnoide, una de las membranas que rodean y protegen los nervios del sistema nervioso central), granuloma, inflamación o meningitis inducida por fármacos, enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer, ictus, demencia por VIH, encefalitis tal como encefalitis viral y encefalitis bacteriana, infecciones parasitarias, trastornos inflamatorios desmielinizantes, y trastornos auto-inmunes tal como enfermedades autoinmunes mediadas por células T CD8+ del SNC. Los ejemplos adicionales incluyen enfermedad de Parkinson, miastenia grave, neuropatía motora, síndrome de Guillain-Barre, neuropatía autoinmune, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, enfermedad neurológica paraneoplásica, atrofia cerebelar paraneoplásica, síndrome de hombre rígido no-paraneoplásico, atrofia cerebelar progresiva, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sydeham, síndrome de Gilles de la Tourette, poliendocrinopatía autoinmune, neuropatía disimmune, neuromiotonía adquirida, artrogriposis múltiple, neuritis óptica, y síndrome del hombre rígido.
- 30 35 40 Como se ha indicado anteriormente, también se incluye la inflamación asociada con infecciones del sistema nervioso. Los ejemplos específicos de infecciones bacterianas asociadas con la inflamación del sistema nervioso incluyen, sin limitación, infección streptococcal tal como streptococci grupo B (por ejemplo subtipos III) y Streptococcus pneumoniae (por ejemplo, serotipos 6, 9, 14, 18 y 23), Escherichia coli (por ejemplo, que porta el antígeno K1), Listeria monocytogenes (por ejemplo, serotipo IVb), infección neisserial tal como Neisseria meningitidis (meningococo), infección staphylococcal, infección por heamophilus tal como Haemophilus influenzae tipo B, Klebsiella, y Mycobacterium tuberculosis. También se incluyen las infecciones por staphylococci y pseudomonas y otros bacilos Gram-negativos, principalmente respecto a trauma en el cráneo, que proporciona a las bacterias en la cavidad nasal el potencial de entrar en el espacio meníngeo, o en personas con derivación cerebral o dispositivo relacionado (por ejemplo, drenaje extraventricular, reservorio Ommaya). Los ejemplos específicos de infecciones virales asociadas con la inflamación del sistema nervioso incluyen, sin limitación, enterovirus, virus del herpes simple tipo 1 y 2, virus T-linfotrófico humano, virus de la varicela zoster (varicela y herpes zoster), virus de las paperas, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y virus de coriomeningitis linfocítica (LCMV). La meningitis también puede resultar de infección con espiroquetas tal como Treponema pallidum (sífilis) y Borrelia burgdorferi (enfermedad de Lyme), parásitos tales como malaria (por ejemplo, malaria cerebral), hongos tales como Cryptococcus neoformans, y amebas tales como Naegleria fowleri.
- 45 50 55 La meningitis u otras formas de inflamación del sistema nervioso también pueden estar asociadas con la diseminación de cáncer a las meninges (meningitis maligna), determinados fármacos tales como determinados fármacos antiinflamatorios no esteroideos, antibióticos e inmunoglobulinas intravenosas, sarcoidosis (o neurosarcoidosis), trastornos del tejido conectivo tales como lupus eritematoso sistémico, y determinadas formas de vasculitis (afecciones inflamatorias de la pared de los vasos sanguíneos) tal como enfermedad de Behçet. Los
- 60

quistes epidermoides y quistes dermoides pueden causar meningitis mediante la liberación de materia irritante en el espacio subaracnoide. De acuerdo con esto, los polipéptidos AARS pueden usarse para tratar o gestionar una cualquiera o más de estas afecciones.

Determinadas realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a reducir respuestas inflamatorias y afecciones asociadas con el sistema auditivo u órganos de equilibrio, tales como el oído interno, oído medio, y oído externo. Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas con el sistema auditivo u órganos de equilibrio incluyen, sin limitación, inflamación del oído externo (por ejemplo, infecciones del oído), inflamación del oído medio, que puede dar lugar a acumulación de fluido en el espacio normalmente lleno de aire y asociado a pérdida de audición conductiva, laberintitis, una infección o inflamación del oído interno que causa tanto mareo (vértigo) como pérdida auditiva, neuronitis vestibular, una infección del nervio vestibular, generalmente viral, que causa vértigo, y neuronitis coclear, una infección del nervio coclear, generalmente viral, que causa sordera súbita pero no vértigo. Los receptores de implantes cocleares para pérdida auditiva tienen un riesgo incrementado de meningitis pneumococcal y su inflamación asociada.

Determinadas realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a reducir las respuestas inflamatorias y afecciones asociadas con el sistema respiratorio, incluyendo inflamación, infecciones, y cáncer asociados con la nariz, tráquea, y pulmones. Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas con el sistema respiratorio incluyen, sin limitación, asma atópico, asma no atópico, asma alérgico, asma atópico bronquial mediado por IgE, asma bronquial, asma esencial, asma verdadero, asma intrínseco causado por alteraciones patofisiológicas, asma extrínseco causado por factores medioambientales, asma esencial de causa desconocida o no aparente, asma no atópico, asma bronquítico, asma enfisematoso, asma inducido por ejercicio, asma inducido por alérgeno, asma inducido por aire frío, asma ocupacional, asma infeccioso causado por infección bacteriana, fúngica, de protozoos, o viral, asma no alérgico, asma incipiente, síndrome sibilante de la infancia y bronquiolitis, broncoconstricción crónica o aguda, bronquitis crónica, obstrucción de las vías aéreas pequeñas, y enfisema. Los ejemplos adicionales incluyen enfermedades de las vías aéreas obstructivas o inflamatorias tales como neumonía eosinofílica crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), COPD que incluye bronquitis crónica, enfisema pulmonar o disnea asociado o no asociado con COPD, COPD que se caracteriza por obstrucción de las vías aéreas irreversible, progresiva, y síndrome de distrés respiratorio del adulto (ARDS).

Los ejemplos adicionales de afecciones asociadas con inflamación pulmonar incluyen afecciones relacionadas con la exacerbación de hiper-reactividad en las vías aéreas consecuente de otra terapia con fármacos, enfermedad de las vías aéreas que está asociada con hipertensión pulmonar, bronquitis tal como bronquitis aguda, bronquitis laringotraqueal aguda, bronquitis araquídica, bronquitis catarral, bronquitis croupus, bronquitis seca, bronquitis asmática infecciosa, bronquitis productiva, bronquitis staphylococcus o streptococcal y bronquitis vesicular, daño pulmonar agudo, y bronquiectasia tal como bronquiectasia cilíndrica, bronquiectasia saculada, bronquiectasia fusiforme, bronquiectasia capilar, bronquiectasia quística, bronquiectasia seca y bronquiectasia folicular.

COPD en particular se refiere a un grupo de enfermedades pulmonares que bloquean el flujo de aire y hacen que sea cada vez más difícil para los individuos afectados respirar normalmente. El enfisema y la bronquitis crónica son las dos afecciones principales en el grupo de enfermedades COPD, pero COPD también puede referirse a daño causado por bronquitis asmática crónica, entre otras afecciones conocidas en la técnica. En la mayor parte de los casos, el daño a las vías aéreas interfiere eventualmente con el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono en los pulmones. Los tratamientos estándar se centran principalmente en controlar los síntomas y minimizar el daño adicional.

El enfisema representa un aspecto de COPD. El enfisema da lugar a inflamación en las paredes frágiles de los alveólos, que puede destruir parte de las paredes y fibras elásticas, permitiendo que las vías aéreas pequeñas colapsen después de la exhalación, y alterando el flujo de aire fuera de los pulmones. Los signos y síntomas del enfisema incluyen, por ejemplo, falta de aire, especialmente durante actividades físicas, sibilancia, y opresión en el pecho.

La bronquitis crónica representa otro aspecto de COPD. La bronquitis crónica se caracteriza por una tos en curso, y da lugar a inflamación y estrechamiento de los tubos bronquiales. Esta afección también causa una producción incrementada de moco, que puede bloquear adicionalmente los tubos estrechados. La bronquitis crónica ocurre principalmente en fumadores, y se define típicamente como una tos que dura al menos tres meses a un año durante dos años consecutivos. Los signos y síntomas de la bronquitis crónica incluyen, por ejemplo, tener que aclarar la garganta como primera cosa en la mañana, especialmente para fumadores, una tos crónica, que produce esputo amarillento, falta de aire en los últimos estadios, e infecciones respiratorias frecuentes.

Como se ha indicado anteriormente, COPD se refiere principalmente a la obstrucción en los pulmones que resulta de las dos afecciones pulmonares crónicas indicadas anteriormente. Sin embargo, muchos individuos con COPD tienen estas dos afecciones.

La bronquitis asmática crónica representa otro aspecto de COPD. La bronquitis asmática crónica se caracteriza habitualmente como bronquitis crónica combinada con asma (broncoespasmo). El asma puede ocurrir cuando las

secreciones inflamadas e infectadas irritan los músculos lisos en las vías aéreas. Los síntomas son similares a los de la bronquitis crónica, pero también incluyen episodios de sibilancia intermitentes, o incluso diarios.

En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, COPD está causada finalmente por el humo de cigarrillos y otros irritantes. En la gran mayoría de los casos, el daño pulmonar que da lugar a COPD está causado por el consumo de cigarrillos a largo plazo. Sin embargo, otros irritantes pueden causar COPD, incluyendo humo de cigarro, fumador pasivo, humo de pipa, contaminación del aire y determinados vapores ocupacionales. La enfermedad de reflujo gastroesofágico (GERD), que ocurre cuando los ácidos del estómago retroceden al esófago, no sólo puede agravar COPD, sino que puede incluso causarla en algunos individuos. En casos raros, COPD resulta de un trastorno genético que causa niveles bajos de una proteína denominada alfa-1-antitripsina. Por lo tanto, los factores de riesgo para COPD incluyen la exposición a humo de tabaco, exposición ocupacional a polvos y químicos (la exposición a largo plazo a humos químicos, vapores y polvos irrita e inflama los pulmones), enfermedad de reflujo gastroesofágico (una forma grave de reflujo ácido — el flujo de retorno de ácido y otros contenidos estomacales en el esófago), edad (COPD se desarrolla lentamente durante años, de manera que la mayor parte de la gente tiene al menos 40 años de edad cuando empiezan los síntomas), y genética (un trastorno genético raro conocido como deficiencia en alfa-1-antitripsina es la fuente de unos pocos casos de COPD).

En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, COPD también puede tener un componente autoinmune. Por ejemplo, las células T pulmonares y de sangre periférica en pacientes con enfisema grave secretan citoquinas y quimioquinas Th1 cuando se estimulan con péptidos elastina *in vitro*, y estos pacientes tienen anticuerpo anti-elastina incrementado comparados con controles (véase Goswami et al., *The Journal of Immunology*. 178: 130.41, 2007). También, son prevalentes autoanticuerpos IgG con avidéz por el epitelio pulmonar, y el potencial de mediar citotoxicidad, en pacientes con COPD (véase Feghali-Bostwick et al., *Am J Respir Crit Care Med*. 177:156-63, 2008). Como las respuestas inmunes autoreactivas pueden ser importantes en la etiología de esta enfermedad, incluyendo, por ejemplo, respuestas auto-reactivas a antígenos propios, tales como elastina, pueden jugar un papel en COPD, el uso de polipéptidos HRS para desensibilizar células inmunes frente a estos antígenos puede reducir la inflamación pulmonar.

Como se ha indicado anteriormente, determinadas realizaciones descritas en la presente memoria se refieren al uso de polipéptidos HRS para desensibilizar células inmunes frente a antígenos seleccionados, incluyendo antígenos propios y antígenos extraños, irritantes, alérgenos, o agentes infecciosos relacionados con la inflamación pulmonar. Mediante la desensibilización de estas células inmunes frente a un antígeno seleccionado, los polipéptidos HRS pueden reducir la migración o reclutamiento de estas células a los pulmones, y de esta manera reducen la inflamación. Los ejemplos de células inmunes incluyen linfocitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas, y granulocitos, tales como neutrófilos, eosinófilos, y basófilos. Los ejemplos de antígenos, incluyen, sin limitación, humo tal como humo de cigarrillos, polución del aire, vapores tales como los vapores de soldadura, polvo, incluyendo polvo de sílice y polvo en el lugar de trabajo tal como los encontrados en la minería del carbón y minería de oro, químicos tales como cadmio e isocianatos. También se incluyen alérgenos y agentes infecciosos conocidos, tales como bacterianos y virales o antígenos, incluyendo lipopolisacárido (LPS), que puede exacerbar COPD en individuos sensibles.

Además de otros descritos en la presente memoria, los ejemplos de antígenos propios incluyen, sin limitación, ligandos de receptor, quimioatrayentes, y moléculas de señalización. En determinadas realizaciones, la respuesta al antígeno o antígeno propio señala a través de un receptor CXCR-2. Sin pretender la vinculación a ninguna teoría, determinados polipéptidos AARS pueden unirse a su receptor posible en la superficie de los neutrófilos, tal como el receptor CXCR2, lo que resulta en la desensibilización del receptor (es decir, el receptor se internaliza y no está ya presente en la superficie celular). En éste y en casos similares, existe entonces una población de neutrófilos circulantes que ya no responde a ligandos de CXCR-2, tal como IL-8. Como IL-8 se produce como resultado del humo de cigarrillos en COPD, por ejemplo, la desensibilización de determinados neutrófilos para ligandos de CXCR-2 tal como IL-8 reduce su migración al pulmón, y de esta manera reduce la inflamación asociada con COPD, especialmente la causada por humo de cigarrillos.

Las complicaciones o síntomas asociados con COPD pueden incluir riesgo incrementado de infecciones respiratorias, presión sanguínea alta, problemas cardíacos (por ejemplo, ataques cardíacos, arritmias, cor pulmonale), cáncer de pulmón (los fumadores con bronquitis crónica presentan un mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón que los fumadores que no tienen bronquitis crónica), neumonía, neumotórax, y depresión, entre otros conocidos en la técnica. Los ejemplos adicionales incluyen tos que produce moco y puede estar manchada con sangre, fatiga, infecciones respiratorias frecuentes, dolores de cabeza, falta de aire (disnea) que empeora con actividad suave, hinchazón de los tobillos, pies, o piernas, que afecta a ambos lados del cuerpo, y sibilancia. Los polipéptidos HRS pueden usarse para reducir o gestionar las complicaciones o síntomas asociados con COPD u otras afecciones pulmonares relacionadas con la inflamación.

Los sujetos con COPD pueden identificarse según técnicas de diagnóstico rutinarias conocidas en la técnica. Por ejemplo, ensayos de la función pulmonar, tales como espirometría, miden cuánto aire pueden mantener los pulmones y cómo de rápido puede soplar un individuo el aire fuera de los pulmones. La espirometría puede detectar COPD antes de la aparición de los síntomas, y también puede usarse para seguir la progresión de la enfermedad y monitorizar el tratamiento. Además, los rayos X del pecho muestran enfisema, una de las causas principales de

COPD, y también pueden descartar otros problemas pulmonares o fallo cardíaco. Además, el análisis de gas sanguíneo arterial mide cómo de eficazmente los pulmones llevan oxígeno a la sangre y eliminan el dióxido de carbono, proporcionando una indicación de COPD. El examen de esputos, es decir, el análisis de las células en el esputo, puede identificar la causa de determinados problemas pulmonares y ayudan a descartar determinados cánceres de pulmón. También, el escáner de tomografía computerizada (CT) produce imágenes altamente detalladas de los órganos internos, lo que puede ayudar a detectar enfisema, y, así, COPD.

Como en otro lugar de la presente memoria, la cantidad de polipéptido HRS que puede administrarse a un sujeto con COPD (o con riesgo de COPD) dependerá de las características de ese sujeto, tales como salud general, edad, sexo, peso corporal, y tolerancia a fármacos, así como el grado, gravedad, y tipo de reacción al polipéptido. Por ejemplo, para desensibilizar células inmunes tales como neutrófilos circulantes, pueden utilizarse administraciones múltiples (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc), típicamente a una frecuencia definida (número de administraciones por día, por semana, por mes, etc).

También se describen terapias de combinación. Por ejemplo, pueden utilizarse uno o más polipéptidos HRS en combinación con otros tratamientos para la inflamación pulmonar o COPD. Los ejemplos de dichos tratamientos incluyen, sin limitación, cambios en el estilo de vida, tales como abandonar o reducir el tabaquismo u otra exposición a irritantes pulmonares, rehabilitación pulmonar, el uso de broncodilatadores (por ejemplo, ipratropio, tiotropio, salmeterol, formoterol), esteroides tales como corticosteroides, antibióticos, inhaladores de dosis medida (MDI) e inhaladores de polvo seco (DPI), nebulizadores, terapia génica de reemplazo para deficiencia de alfa-1-antitripsina, terapia de oxígeno, y cirugía, incluyendo bulectomía, cirugía de reducción de volumen pulmonar, y trasplante de pulmón.

Determinadas realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a reducir las respuestas inflamatorias y afecciones asociadas con el sistema gastrointestinal, incluyendo inflamación, infecciones, y cáncer asociado con la boca, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso, y recto. "Inflamación gastrointestinal" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a inflamación de una capa mucosal del tracto gastrointestinal, y engloba afecciones inflamatorias agudas y crónicas. La inflamación aguda se caracteriza generalmente por un tiempo corto de inicio e infiltración o influjo de neutrófilos. La inflamación crónica se caracteriza generalmente por un periodo relativamente largo de inicio e infiltración o influjo de células mononucleares. La inflamación crónica también puede caracterizarse típicamente por periodos de remisión espontánea y aparición espontánea. "Capa mucosal del tracto gastrointestinal" se pretende que incluya la mucosa del intestino (incluyendo el intestino delgado y el intestino grueso), recto, recubrimiento del estómago (gástrico), cavidad oral, y semejantes.

"Inflamación gastrointestinal crónica" se refiere a inflamación de la mucosa del tracto gastrointestinal que se caracteriza por un periodo relativamente largo de inicio, es duradera (por ejemplo, de varios días, semanas, meses, o años hasta la vida del sujeto), y está asociada frecuentemente con infiltración o influjo de células mononucleares, y puede estar asociada además con periodos de remisión espontánea y aparición espontánea. "Afecciones inflamatorias gastrointestinales crónicas" (también referido como "enfermedades inflamatorias gastrointestinales crónicas") que tienen dicha inflamación crónica incluyen pero no están limitadas a, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), colitis inducida por agresiones medioambientales (por ejemplo, inflamación gastrointestinal asociada con un régimen terapéutico tal como quimioterapia, terapia de radiación, y semejantes), colitis en afecciones tales como enfermedad granulomatosa crónica (véase, por ejemplo, Schappi et al., Arch Dis Child. 84:147-151, 2001), enfermedades celíacas, esprúe celíaco (es decir, una enfermedad hereditaria en la que el recubrimiento intestinal se inflama en respuesta a la ingestión de una proteína conocida como gluten), alergias alimentarias, gastritis, gastritis infecciosa o enterocolitis (por ejemplo, gastritis activa crónica infectada con *Helicobacter pylori*) y otras formas de inflamación gastrointestinal causadas por un agente infeccioso, y otras afecciones semejantes.

Tal y como se usa en la presente memoria, "enfermedad inflamatoria del intestino" o "IBD" se refiere a cualquiera de una variedad de enfermedades caracterizadas por inflamación de todo o parte de los intestinos. Los ejemplos de enfermedad inflamatoria del intestino incluyen, pero no están limitadas a, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. El término IBD incluye colitis pseudomembranosa, colitis hemorrágica, síndrome de colitis hemolítica-urémica, colitis colagenosa, colitis isquémica, colitis por radiación, colitis inducida por fármacos y químicamente, colitis de diversión, colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable, síndrome del colon irritable y enfermedad de Crohn; y en la enfermedad de Crohn todos los subtipos incluyendo enfermedad de Crohn activa, refractaria, y fistulizante. Por lo tanto, los polipéptidos HRS pueden emplearse para tratar o gestionar una cualquiera o más de estas afecciones.

Determinadas realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a reducir las respuestas inflamatorias y afecciones asociadas con el sistema vascular, o inflamación vascular, tal como inflamación asociada con los vasos sanguíneos y el corazón. Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas con el sistema vascular incluyen, sin limitación, miocarditis, pericarditis, enfermedad oclusiva, aterosclerosis, infarto de miocardio, trombosis, granulomatosis de Wegener, arteritis de Takayasu, síndrome de Kawasaki, enfermedad autoinmune anti-factor VIII, vasculitis de vasos pequeños necrotizante, poliangiitis microscópica, síndrome de Churg y Strauss, glomerulonefritis autoinmune focal necrotizante, glomerulonefritis crescética, síndrome antifosfolípido, fallo cardíaco inducido por anticuerpo, púrpura trombocitopénica, anemia hemolítica autoinmune, autoinmunidad cardíaca en la enfermedad de Chagas, y autoinmunidad anti-linfocitos T auxiliares. También se incluyen endocarditis, o infección de las válvulas cardíacas con diseminación de agrupaciones pequeñas de bacterias a lo largo de la corriente sanguínea, flebitis o

- vasculitis, inflamación de una o más venas, y tromboflebitis, inflamación de venas relacionada con un trombo. La tromboflebitis puede ocurrir repetidamente en diferentes localizaciones, y se refiere como tromboflebitis migrans, o tromboflebitis migratoria. La flebitis puede estar asociada con una variedad de causas, tales como infección bacteriana, exposición a agentes químicos, tales como disoluciones irritantes o vesicantes, trauma físico de la punción de la piel tal como movimiento de una cánula en la vena durante la inserción, medicaciones tales como Celebrex, Olanzapina, antidepresivos, y otros, y abuso del alcohol. Determinadas realizaciones descritas en la presente memoria pueden referirse a tratar o gestionar inflamación del corazón causada por uno cualquiera o más de fiebre reumática aguda, toxoplasmosis congénita, infección antenatal por enterovirus, enfermedad de Lyme, y fiebre reumática.
- 5 10 Determinadas realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a reducir las respuestas inflamatorias y afecciones asociadas con el hígado o vesícula biliar, incluyendo inflamación del hígado aguda y crónica, y colecistitis aguda y crónica. Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas con el hígado o la vesícula biliar incluyen, sin limitación, hepatitis auto-inmune, hepatitis viral (por ejemplo, virus de la Hepatitis A, virus de la Hepatitis B, virus de la Hepatitis C, virus de la Hepatitis D, virus de la Hepatitis E, mononucleosis, rubéola, virus de Epstein-Barr, y citomegalovirus), otras causas de hepatitis tales como infección bacteriana grave, infecciones por amebas, 15 medicinas (por ejemplo, agomelatina, alopurinol, amitriptilina, amiodarona, asatioprina, paracetamol, halotano, ibuprofeno, indometacina, isoniazid, rifampicina, pirazinamida, ketoconazol, loratadina, metotrexato, metildopa, minociclina, nifedipina, nitrofurantoína, fenitoína, ácido valproico, troglitazona, zidovudina), toxinas (por ejemplo, alcohol, toxinas fúngicas), y trastornos metabólicos (por ejemplo, enfermedad de Wilson, un trastorno del metabolismo del cobre corporal, hemocromatosis, trastorno del metabolismo del hierro corporal, esteatohepatitis no alcohólica, deficiencia de alfa 1-antitripsina). Los ejemplos adicionales incluyen enfermedad de hígado graso no alcohólica, cirrosis tal como cirrosis biliar primaria, ictericia obstructiva, hepatitis isquémica, y enfermedad de vesícula biliar.
- 20 25 Determinadas realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a reducir las respuestas inflamatorias y afecciones asociadas con el sistema linfático/inmune. Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas con el sistema linfático/inmune incluyen, sin limitación, enfermedades auto-inmunes, tales como enfermedad de Chagas, trastorno pulmonar obstructivo crónico (COPD), enfermedad de Crohn, dermatomiositis, diabetes melitus tipo I, endometriosis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hachimoto, hidradenitis supurativa, enfermedad de Kawasaki, nefropatía de IgA, púrpura trombocitopénica idiopática, cistitis intersticial, lupus eritematoso, enfermedad de tejido conectivo mixta, morfea, miastenia grave, 30 narcolepsia, neuromiotonía, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, psoriasis, artritis psoriásica, poliomiositis, cirrosis biliar primaria, artritis reumatoide, esquizofrenia, escleroderma, síndrome de Sjogren, síndrome de la persona rígida, arteritis temporal, colitis ulcerosa, vitiligo, y granulomatosis de Wegener, además de anemia hemolítica autoinmune, y varias linfadenopatías.
- 35 40 También se incluyen afecciones inflamatorias relacionadas con la inmunidad asociadas con el trasplante de un injerto, tejido, célula u órgano, tal como rechazo de injerto, rechazo de injerto crónico, rechazo de injerto subagudo, rechazo de injerto hiperagudo, rechazo de injerto agudo, y enfermedad de injerto frente a huésped. En determinadas realizaciones, los polipéptidos HRS pueden administrarse a un donante de trasplante antes o durante la retirada de tejido. En determinadas realizaciones, los polipéptidos HRS pueden administrarse a un receptor de trasplante antes, 40 durante, y/o después de la terapia de trasplante para reducir las complicaciones relacionadas con inflamación de la terapia de trasplante. Los ejemplos de terapias de trasplante incluyen médula ósea, célula madre, sangre periférica, hígado, pulmón, corazón, piel, y riñón, entre otros conocidos en la técnica. Los ejemplos adicionales incluyen afecciones inflamatorias asociadas con alergias, tales como asma, erupciones, urticaria, alergia al polen, alergia a los ácaros del polvo, alergia a veneno, alergia a cosméticos, alergia al látex, alergia química, alergia a fármacos, 45 alergia a picadura de insecto, alergia a caspa animal, alergia a plantas punzantes, alergia a hiedra venenosa y alergia alimentaria.
- 50 Determinadas realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a reducir las respuestas inflamatorias y afecciones asociadas con el sistema uro-genital. Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas al sistema uro-genital incluyen, sin limitación, inflamaciones, infecciones o cánceres del uréter, vejiga, uretra, cuello uterino, trompas de Falopio, ovarios, útero, matriz, vulva, próstata, glándulas bulbouretrales, epididimitis, próstata, vesículas seminales, testículos, o riñones. También se incluyen nefritis intersticial auto-inmune, absceso renal (intrarenal o extrarenal), prostatitis aguda, hematuria, uretritis (por ejemplo, Chlamydia y otras enfermedades transmitidas sexualmente), enfermedad inflamatoria de la pelvis (PID), y absceso prostático. También se incluye nefritis asociada con uno o más de glomerulonefritis, lupus nefritis, nefropatía, gota, venenos o químicos (por ejemplo, éter, sulfato de talio), determinadas medicaciones (por ejemplo, piroxicam, candil, gel feldene, fensaid, pirox), síndrome de Herrmann, fiebre amarilla, enfermedades de complejo inmune, fiebre tifoidea, constricción uretral, tuberculosis renal, 55 y glomerulonefritis post-streptococcal.
- 60 Determinadas realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a reducir las respuestas inflamatorias y afecciones asociadas con el sistema músculo-esquelético. Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas con el sistema músculo-esquelético incluyen, sin limitación, artritis tal como artritis reumatoide y artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, miositis auto-inmune, síndrome de Sjogren primario, enfermedad auto-inmune del músculo liso, miositis, polimiositis, tendinitis, inflamación de ligamentos, inflamación de cartílago, inflamación de

articulaciones, inflamación sinovial, síndrome del túnel carpiano, inflamación muscular crónica, e inflamación de hueso, incluyendo inflamación de hueso asociada con osteoporosis y osteoartritis. También se incluye el síndrome de Tietze, una hinchazón benigna, dolorosa, no supurativa localizada de las articulaciones costoesternal, esternoclavicular, o costocondral, costocondritis, síndrome esternal, xifoidalgia, subluxación esternoclavicular espontánea, hiperostosis esternocostoclavicular, fibromialgia, tendinitis o bursitis del hombro, artritis gotosa, polimialgia reumática, lupus eritematoso, espolones óseos, y fracturas tales como fracturas por tensión.

Determinadas realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a reducir las respuestas inflamatorias y afecciones asociadas con el sistema endocrino. Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas con el sistema endocrino incluyen, sin limitación, inflamación, infección, o cáncer asociado con el hipotálamo, pituitaria, tiroides, páncreas, glándulas adrenales, enfermedades glandulares tales como enfermedad pancreática, diabetes tal como diabetes de Tipo I, enfermedad tiroidea, enfermedad de Graves, tiroiditis, tiroiditis autoinmune espontánea, tiroiditis de Hashimoto, mixedema idiopático, autoinmunidad de ovarios, infertilidad autoinmune anti-esperma, prostatitis autoinmune y síndrome poliglandular autoinmune de Tipo I.

Determinadas realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a reducir las respuestas inflamatorias y afecciones asociadas con tejidos adiposos, un participante activo en la regulación de procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo inmunidad e inflamación. Los macrófagos son componentes del tejido adiposo y participan activamente en sus actividades. Además, la intercomunicación entre los linfocitos y los adipocitos puede dar lugar a regulación inmune. El tejido adiposo produce y libera una variedad de factores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios, incluyendo las adipocinas leptina, adiponectina, resistina, y visfatina, así como citoquinas y quimioquinas, tal como TNF-alfa, IL-6, proteína quimioatrayente de monocitos 1, y otros. Las moléculas proinflamatorias producidas por el tejido adiposo se han implicado como participantes activos en el desarrollo de resistencia a insulina y el riesgo incrementado de enfermedad cardiovascular asociado con obesidad. Por el contrario, los niveles reducidos de leptina pueden predisponer a susceptibilidad incrementada a infección causada por respuestas reducidas de células T en individuos malnutridos. Los niveles alterados de adipocina se han observado en una variedad de afecciones inflamatorias (véase, por ejemplo, Fantuzzi, J Allergy Clin Immunol. 115:911-19, 2005; y Berg et al., Circulation Research. 96:939, 2005).

Los polipéptidos HRS también pueden emplearse para tratar o gestionar la inflamación asociada con hipersensibilidad. Los ejemplos de dichas afecciones incluyen hipersensibilidad de tipo I, hipersensibilidad de tipo II, hipersensibilidad de tipo III, hipersensibilidad de tipo IV, hipersensibilidad inmediata, hipersensibilidad mediada por anticuerpo, hipersensibilidad mediada por complejo inmune, hipersensibilidad mediada por linfocitos T, e hipersensibilidad de tipo retrasado.

Los polipéptidos HRS también pueden emplearse para tratar o gestionar afecciones auto-inflamatorias. Los ejemplos de afecciones auto-inflamatorias incluyen fiebre mediterránea familiar, síndrome periódico asociado con el receptor de TNF (TRAPS), síndrome de hiper-IgD (HIDS), enfermedades relacionadas con CIAS1 tales como síndrome de Muckle-Wells, síndrome auto-inflamatorio frío familiar, y enfermedad inflamatoria multisistema de inicio neonatal, síndrome PAPA (artritis estéril pirogénica, pioderma gangrenoso, acné), y síndrome de Blau.

Los polipéptidos HRS pueden emplearse para tratar o gestionar la inflamación asociada con una variedad de cánceres. Los ejemplos de dichos cánceres incluyen, sin limitación, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de pulmón, cáncer de ovarios, cáncer testicular, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de cerebro, melanoma, cáncer de piel no melanoma, cáncer de hueso, linfoma, leucemia, cáncer de tiroides, cáncer endometrial, mieloma múltiple, leucemia mieloide aguda, neuroblastoma, glioblastoma, y linfoma no de Hodgkin.

Como se ha indicado anteriormente, determinadas realizaciones descritas en la presente memoria pueden emplear polipéptidos HRS para reducir la inflamación sistémica. En determinadas realizaciones, la inflamación sistémica puede estar asociada con el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), una afección inflamatoria del cuerpo completo con una variedad de causas potenciales. SIRS puede caracterizarse o identificarse según técnicas de diagnóstico rutinarias. Como un ejemplo no limitativo, SIRS puede identificarse por la presencia de dos o más de los siguientes: (i) una temperatura corporal que es menor de 36°C o mayor de 38°C, (ii) una frecuencia cardíaca que es mayor de 90 latidos por minuto, (iii) taquipnea (alta velocidad respiratoria), con más de 20 respiraciones por minuto; o, una presión arterial parcial de dióxido de carbono menor de 4,3 kPa (32 mmHg), y (iv) recuento de células sanguíneas blancas menor de 4.000 células/mm³ (4 x 10⁹ células/L) o mayor de 12.000 células/mm³ (12 x 10⁹ células/L); o la presencia de más de 10% de neutrófilos inmaduros (formas de banda).

SIRS se clasifica ampliamente bien como infeccioso o no infeccioso. Lo más generalmente SIRS infeccioso está asociado con sepsis, un estado inflamatorio del cuerpo completo combinado con una infección conocida o sospechada, que incluye bacteremia, viremia, parasitemia, y síndrome de choque tóxico. La sepsis puede estar asociada con una amplia variedad de agentes infecciosos, incluyendo, sin limitación, bacterias tales como *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus coagulasa negativo*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* especies, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* especies, *S. agalactiae*, *Serratia* especies, *Acinetobacter* especies, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella* especies, y *Neisseria meningitidis*; virus tal como rubella, citomegalovirus, herpes simple y el virus de varicela; parásitos tales

como en la infección de malaria (por ejemplo, *Plasmodium falciparum*), tripanosomiasis, y filariasis; y hongos tales como especies de *Candida*, especies de *Aspergillus*, especies de *Histoplasma*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, y *Pneumocystis carinii*. En determinados casos, las infecciones en los pulmones (por ejemplo, neumonía), vejiga y riñones (por ejemplo, infecciones del tracto urinario), piel (por ejemplo, celulitis), abdomen (por ejemplo, apendicitis), y otras áreas (por ejemplo, meningitis) pueden diseminarse y dar lugar a sepsis. Los polipéptidos HRS pueden usarse para reducir la inflamación asociada con cualquiera de estos agentes infecciosos, ya esté presente sepsis u otra cosa.

SIRS no infeccioso puede estar asociado con trauma, quemaduras, pancreatitis, isquemia, hemorragia, complicaciones quirúrgicas, insuficiencia adrenal, embolismo pulmonar, aneurisma aórtico, taponamiento cardíaco, anafilaxis, y sobredosis de drogas, entre otros. SIRS se complica frecuentemente por el fallo de uno o más órganos o sistemas de órganos, incluyendo los descritos en la presente memoria. Los ejemplos específicos incluyen daño pulmonar agudo, daño renal agudo, choque, y síndrome de disfunción multiorgánico, entre otros. Típicamente, SIRS se trata con el foco en el problema subyacente (por ejemplo, reemplazo adecuado de fluidos para hipovolemia, IVF/NPO para pancreatitis, epinefrina/esteroides/benadril para anafilaxis). En determinados casos, selenio, glutamina, y ácido eicosapentanoico han mostrado eficacia en la mejora de los síntomas de SIRS, y los antioxidantes tales como la vitamina E también pueden ser de ayuda. Por lo tanto, los polipéptidos HRS pueden usarse para tratar o gestionar SIRS y las complicaciones de SIRS, solos o en combinación con otras terapias.

La inflamación sistémica también puede estar asociada con "tormenta de citoquinas," una reacción inmune peligrosa causada por un bucle de retroalimentación positiva entre citoquinas y células inmunes, que resulta en niveles altamente elevados de varias citoquinas. En determinados casos, la tormenta de citoquinas (hipercitoquinemia) incluye la liberación sistémica de numerosos mediadores inflamatorios conocidos tales como citoquinas, radicales libres de oxígeno, y factores de coagulación). Se incluyen niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias tales como TNF-alfa, IL-1, e IL-6, y citoquinas anti-inflamatorias tales como IL-10 y antagonista del receptor de IL-1. Las tormentas de citoquinas pueden ocurrir en varias enfermedades infecciosas y no infecciosas incluyendo enfermedad de injerto frente a huésped (GVHD), síndrome de distrés respiratorio agudo (ARDS), sepsis, influenza aviar, viruela, y SIRS. La tormenta de citoquinas también puede inducirse por determinadas medicaciones. El tratamiento incluye OX40 IG, que reduce las respuestas de células T, inhibidores de ACE, bloqueantes del receptor de angiotensina II, corticoesteroides, gemfibrozil, secuestradores de radicales libres, y bloqueantes de TNF- α . De acuerdo con esto, los polipéptidos HRS pueden emplearse para tratar o gestionar la tormenta de citoquinas, solos o en combinación con otras terapias.

Determinadas realizaciones descritas en la presente memoria pueden emplear polipéptidos HRS para reducir una cualquiera o más de inflamación granulomatosa, inflamación fibrinosa, inflamación purulenta, inflamación serosa, o inflamación ulcerosa. La inflamación granulomatosa se caracteriza por la formación de granulomas, que resultan típicamente de una respuesta a agentes infecciosos tales como tuberculosis, lepra o sífilis. La inflamación fibrinosa resulta de un gran incremento en la permeabilidad vascular, que permite a la fibrina pasar a través de los vasos sanguíneos. Si está presente un estímulo pro-coagulativo apropiado, tal como una célula de cáncer, se deposita un exudado fibrinoso. Este proceso se observa comúnmente en cavidades serosas, en las que la conversión de exudado fibrinoso en una cicatriz puede ocurrir entre membranas serosas, limitando su función. La inflamación purulenta resulta de la formación de una gran cantidad de pus, que consiste en neutrófilos, células muertas, y fluido. La infección por bacterias pirogénicas tales como staphylococci es característica de esta clase de inflamación. Las colecciones grandes, localizadas de pus incluidas por tejidos circundantes se denominan abscesos. La inflamación serosa se caracteriza por la efusión copiosa de fluido seroso no viscoso, producido comúnmente por células mesoteliales de membranas serosas, pero también pueden derivar de plasma sanguíneo. Los ejemplos de este tipo de inflamación incluyen ampollas de la piel. La inflamación ulcerosa, que ocurre típicamente cerca de un epitelio, resulta en la pérdida necrótica de tejido de la superficie, exponiendo de esta manera las capas inferiores del tejido. La excavación posterior del epitelio se conoce como una úlcera.

Los polipéptidos HRS también pueden emplearse en el tratamiento de daños físicos o heridas. Los ejemplos abrasiones, cardenales, cortes, heridas por punción, laceraciones, heridas por impacto, contusiones, quemaduras térmicas, quemaduras por congelación, quemaduras químicas, quemaduras solares, gangrena, necrosis, desecaciones, quemaduras por radiación, quemaduras por radiactividad, inhalación de humo, músculos desgarrados, músculos distendidos, tendones desgarrados, tendones distendidos, ligamentos distendidos, ligamentos desgarrados, hiperextensiones, cartílago desgarrado, fracturas óseas, nervios pinzados, úlceras, y disparo de pistola u otras heridas traumáticas.

Los polipéptidos HRS también pueden emplearse para tratar o gestionar inflamación idiopática o inflamación de etiología desconocida. También se incluyen terapias de combinación, en las que uno o más polipéptidos HRS se administran o utilizan en combinación con una o más terapias adicionales para cualquiera de las enfermedades o afecciones inflamatorias descritas en la presente memoria, incluyendo las terapias que están disponibles comúnmente y son conocidas en la técnica. Los ejemplos de terapias de combinación incluyen el uso de agentes anti-inflamatorios estándar tales como fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAID), derivados anti-inflamatorios inmunes selectivos (ImSAID), y esteroides (por ejemplo, corticoesteroides), antiinfectivos tales como antibióticos y agentes anti-virales, anti-oxidantes, citoquinas, agentes quimioterapéuticos y otras terapias anti-cáncer, y terapias inmunosupresoras.

Los criterios para evaluar los signos y síntomas de afecciones inflamatorias y otras, incluyendo para los propósitos de hacer un diagnóstico diferencial y también para monitorizar tratamientos tales como determinar si una dosis terapéuticamente efectiva se ha administrado en el curso del tratamiento, por ejemplo, determinando la mejoría según criterios clínicos aceptados, serán evidentes para los expertos en la técnica y se ejemplifican por las enseñanzas, por ejemplo, de Berkow et al., eds., *The Merck Manual*, 16^a edición, Merck and Co., Rahway, N.J., 1992; Goodman et al., eds., *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10^a edición, Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y., (2001); Avery's *Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 3^a edición, ADIS Press, Ltd., Williams and Wilkins, Baltimore, MD. (1987); Ebadi, *Pharmacology*, Little, Brown and Co., Boston, (1985); Osolci al., eds., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18^a edición, Mack Publishing Co., Easton, PA (1990); Katzung, *Basic and Clinical Pharmacology*, Appleton and Lange, Norwalk, CT (1992).

En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, por ejemplo, se proporcionan métodos para modular actividades celulares terapéuticamente relevantes incluyendo, pero no limitado a, metabolismo celular, diferenciación celular, proliferación celular, muerte celular, movilización celular, migración celular, transcripción génica, traducción del ARNm, impedancia celular, producción de citoquinas, y semejantes, que comprende poner en contacto una célula con una composición HRS como se describe en la presente memoria. En determinadas realizaciones, los polipéptidos HRS o composiciones de éstos modulan la respuesta a citoquinas de células frente a antígenos que estimulan la inmunidad, incluyendo antígenos relacionados con trastornos autoinmunes y antígenos extraños tales como lipopolisacárido (LPS). En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, los polipéptidos HRS o composiciones de éstos inhiben la respuesta a citoquinas de células frente a antígenos que estimulan la inmunidad, como anteriormente. En determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, las células son células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

En determinadas realizaciones particulares descritas en la presente memoria, se proporcionan polipéptidos HRS o composiciones de éstos para inhibir la producción o secreción de TNF- α en células de mamífero, tales como PBMC, bien in vivo o in vitro. Los polipéptidos HRS para uso de la reivindicación 1 y composiciones de éstos también pueden usarse en cualquiera de varios contextos terapéuticos incluyendo, por ejemplo, los relacionados con el tratamiento o prevención de enfermedades neoplásicas, enfermedades del sistema inmune (por ejemplo, enfermedades autoinmunes e inflamación), enfermedades infecciosas, enfermedades metabólicas, enfermedades neuronales/neurológicas, enfermedades musculares/cardiovasculares, enfermedades asociadas con hematopoyesis aberrante, enfermedades asociadas con angiogénesis aberrante, enfermedades asociadas con supervivencia celular aberrante, y otras.

Los polipéptidos HRS también pueden ser útiles como inmunomoduladores para tratar indicaciones pro-inflamatorias mediante la modulación de las células que median, bien directamente o indirectamente, enfermedades, afecciones y trastornos autoinmunes y/o inflamatorios. La utilidad de las composiciones como inmunomoduladores puede monitorizarse usando cualquiera de varias técnicas conocidas y disponibles en la técnica incluyendo, por ejemplo, ensayos de migración (por ejemplo, usando leucocitos o linfocitos), ensayos de producción de citoquinas (por ejemplo, TNF- α , IL-12), o ensayos de viabilidad celular (por ejemplo, usando células B, células T, monocitos o células NK).

Las enfermedades, trastornos o afecciones del sistema inmune ilustrativos que pueden tratarse según la presente invención incluyen, pero no están limitados a, inmunodeficiencias primarias, trombocitopenia mediada por inmunidad, síndrome de Kawasaki, trasplante de médula ósea (por ejemplo, trasplante reciente de médula ósea en adultos o niños), leucemia linfocítica crónica de células B, infección con VIH (por ejemplo, infección con VIH de adulto o pediátrica), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, púrpura post-transfusión, y semejantes.

Además, las enfermedades, trastornos y afecciones adicionales incluyen síndrome de Guillain-Barre, anemia (por ejemplo, anemia asociada con parvovirus B19, pacientes con mieloma múltiple estable que presentan alto riesgo de infección (por ejemplo, infección recurrente), anemia hemolítica autoinmune (por ejemplo, anemia hemolítica autoinmune de tipo caliente), trombocitopenia (por ejemplo, trombocitopenia neonatal), y neutropenia mediada por inmunidad), trasplante (por ejemplo, receptores citomegalovirus (CMV) negativos de órganos CMV positivos), hipogammaglobulinemia (por ejemplo, neonatos hipogammaglobulinémicos con factor de riesgo para infección o morbilidad), epilepsia (por ejemplo, epilepsia intratable), síndromes vasculíticos sistémicos, miastenia grave (por ejemplo, descompensación en miastenia grave), dermatomiositis, y polimiositis.

Las enfermedades, trastornos y afecciones autoinmunes adicionales incluyen pero no están limitados a, anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia neonatal autoinmune, púrpura trombocitopenia idiopática, autoinmunocitopenia, anemia hemolítica, síndrome antifosfolípido, dermatitis, encefalomiелitis alérgica, miocarditis, policondritis con recaída, enfermedad cardíaca reumática, glomerulonefritis (por ejemplo, nefropatía IgA), esclerosis múltiple, neuritis, uveitis oftalmia, poliendocrinopatías, púrpura (por ejemplo, púrpura Henloch-Schoenlein), enfermedad de Reiter, síndrome del hombre rígido, inflamación pulmonar autoinmune, síndrome de Guillain-Barre, diabetes mellitus dependiente de insulina, y enfermedad ocular inflamatoria autoinmune.

Las enfermedades, trastornos o afecciones autoinmunes adicionales incluyen, pero no están limitadas a, tiroiditis autoinmune; hipotiroidismo, incluyendo tiroiditis de Hashimoto y tiroiditis caracterizada, por ejemplo, por citotoxicidad

tiroide mediada por células y humoral; SLE (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por complejos inmunes circulantes y generados localmente); síndrome de Goodpasture (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por anticuerpos anti-membrana basal); pénfigo (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por anticuerpos acantolíticos epidérmicos); autoinmunidades de receptor tales como, por ejemplo, enfermedad de Graves (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por anticuerpos frente a un receptor de hormona estimulante del tiroides; miastenia grave, que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por anticuerpos del receptor de acetilcolina); resistencia a insulina (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por anticuerpos del receptor de insulina); anemia hemolítica autoinmune (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por fagocitosis de células sanguíneas rojas sensibilizadas por anticuerpo); y púrpura trombocitopénica autoinmune (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por fagocitosis de plaquetas sensibilizadas por anticuerpo).

Las enfermedades, trastornos o afecciones autoinmunes adicionales incluyen, pero no están limitadas a, artritis reumatoide (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por complejos inmunes en las articulaciones); escleroderma con anticuerpos anti-colágeno (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por anticuerpos nucleolares y otros nucleares); enfermedad del tejido conectivo mixta (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por anticuerpos frente a antígenos nucleares extraíbles, por ejemplo, ribonucleoproteína); polimiositis/dermatomiositis (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por anticuerpos anti-nucleares no histona); anemia perniciosa (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por anticuerpos anti célula parietal, antimicrosoma, y anti-factor intrínseco); enfermedad de Addison idiopática (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por citotoxicidad adrenal humoral y mediada por células); infertilidad (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por anticuerpos antiespenatozoides); glomerulonefritis (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por anticuerpos de la membrana basal glomerular o complejos inmunes); por glomerulonefritis primaria, por nefropatía de IgA; pénfigo ampolloso (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por IgG y complemento en la membrana basal); síndrome de Sjogren (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por múltiples anticuerpos de tejido y/o el anticuerpo específico antinuclear no histona (SS-B)); diabetes mellitus (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por anticuerpos de células del islote mediados por células y humoral); y resistencia a fármacos adrenérgicos, incluyendo resistencia a fármacos adrenérgicos con asma o fibrosis quística (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por anticuerpos del receptor beta-adrenérgico).

Las enfermedades, trastornos o afecciones autoinmunes más adicionales incluyen, pero no están limitadas a, hepatitis activa crónica (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por anticuerpos del músculo liso); cirrosis biliar primaria (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por anticuerpos anti-mitocondriales); otro fallo de glándula endocrina (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por anticuerpos específicos de tejido en algunos casos); vitiligo (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por anticuerpos anti-melanocito); vasculitis (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por inmunoglobulina y complemento en las paredes de los vasos y/o complemento sérico bajo); afecciones posteriores al infarto de miocardio (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por anticuerpos anti-miocárdicos); síndrome de cardiotomía (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por anticuerpos anti-miocárdicos); urticaria (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por anticuerpos IgG e IgM frente a IgE); dermatitis atópica (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por anticuerpos IgG e IgM frente a IgE); asma (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por anticuerpos IgG e IgM frente a IgE); miopatías inflamatorias; y otros trastornos inflamatorios, granulomatosos, degenerativos, y atróficos.

También se describen polipéptidos AARS (por ejemplo, polipéptidos QRS) y composiciones que pueden usarse para modular la proliferación y/o supervivencia celular y, de acuerdo con esto, para tratar o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones caracterizadas por anomalías en la proliferación y/o supervivencia celular. Por ejemplo, las composiciones QRS pueden usarse para modular la apoptosis y/o para tratar enfermedades o afecciones asociadas con apoptosis anormal. La apoptosis es el término usado para describir la cascada de señalización celular conocida como muerte celular programada. Existen varias indicaciones terapéuticas para moléculas que inducen apoptosis (por ejemplo, cáncer), así como aquellas que inhiben la apoptosis (es decir, ictus, infarto de miocardio, sepsis, etc.). La apoptosis puede monitorizarse por cualquiera de varias técnicas disponibles conocidas y disponibles en la técnica incluyendo, por ejemplo, ensayos que miden la fragmentación del ADN, alteraciones en la asimetría de las membranas, activación de caspasas apoptóticas y/o liberación de citocromo C y AIF.

Las enfermedades ilustrativas asociadas con supervivencia celular incrementada, o la inhibición de apoptosis incluyen, pero no están limitadas a, cánceres (tales como linfomas foliculares, carcinomas, y tumores dependientes de hormonas, incluyendo, pero no limitado a cáncer de colon, tumores cardíacos, cáncer pancreático, melanoma, retinoblastoma, glioblastoma, cáncer de pulmón, cáncer intestinal, cáncer testicular, cáncer de estómago, neuroblastoma, mixoma, mioma, linfoma, endotelioma, osteoblastoma, osteoclastoma, osteosarcoma, condrosarcoma, adenoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, sarcoma de Kaposi y cáncer de ovario); trastornos autoinmunes (tales como, esclerosis múltiple, síndrome de Sjogren, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, diabetes autoinmune, cirrosis biliar, enfermedad de Behcet, enfermedad de Crohn, polimiositis, lupus eritematoso sistémico y glomerulonefritis relacionada con inmunidad, gastritis autoinmune, púrpura trombocitopénica autoinmune, y artritis reumatoide) e infecciones virales (tales como virus de herpes, virus de viruela y adenovirus), inflamación, enfermedad de injerto frente a huésped (aguda y/o crónica), rechazo de injerto agudo, y rechazo de injerto crónico.

Las enfermedades o afecciones ilustrativas adicionales asociadas con supervivencia celular incrementada incluyen, pero no están limitadas a, progresión y/o metástasis de malignidades y trastornos relacionados tales como leucemia (incluyendo leucemias agudas (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, incluyendo mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, y eritroleucemia)) y leucemias crónicas (por ejemplo, leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica), síndrome mielodisplásico, policitemia vera, linfomas (por ejemplo enfermedad de Hodgkin y enfermedad no de Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedades de cadena pesada, y tumores sólidos incluyendo, pero no limitado a, sarcomas y carcinomas tales como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomyosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorífera, carcinoma de glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, y retinoblastoma.

Las enfermedades ilustrativas asociadas con apoptosis incrementada incluyen, pero no están limitadas a, SIDA (tal como nefropatía inducida por HIV y encefalitis por VIH), trastornos neurodegenerativos (tal como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentosa, degeneración cerebelar y tumor cerebral o enfermedad asociada a prión), trastornos autoinmunes tales como esclerosis múltiple, síndrome de Sjogren, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, diabetes autoinmune, cirrosis biliar, enfermedad de Behcet, enfermedad de Crohn, polimiositis, lupus eritematoso sistémico, glomerulonefritis relacionada con inmunidad, gastritis autoinmune, púrpura trombocitopénica, y artritis reumatoide, síndromes mielodisplásicos (tales como anemia aplásica), enfermedad de injerto frente a huésped (aguda y/o crónica), daño isquémico (tal como el causado por infarto de miocardio, ictus y daño por reperfusión), daño o enfermedad hepática (por ejemplo, daño hepático relacionado con hepatitis, cirrosis, daño por isquemia/reperfusión, colestosis (daño en el conducto biliar) y cáncer de hígado), enfermedad hepática inducida por toxinas (tal como la causada por alcohol), choque séptico, colitis ulcerosa, caquexia, y anorexia.

También se describen composiciones que pueden usarse en el tratamiento de enfermedades o trastornos neuronales/neurológicos, incluyendo los ejemplos ilustrativos de éstos enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, corea de Huntington, hemiplejia alternante, esclerosis lateral amiotrófica, ataxia, parálisis cerebral, síndrome de fatiga crónica, síndromes de dolor crónico, anomalías neurológicas congénitas, enfermedades de los nervios craneales, delirio, demencia, enfermedades desmielinizantes, disautonomía, epilepsia, dolores de cabeza, enfermedad de Huntington, hidrocefalia, meningitis, trastornos del movimiento, enfermedades musculares, neoplasmas del sistema nervioso, síndromes neurocutáneos, enfermedades neurodegenerativas, síndromes de neurotoxicidad, trastornos de motilidad ocular, trastornos del sistema nervioso periférico, trastornos de la pituitaria, pencefalía, síndrome de Rett, trastornos del sueño, trastornos de la médula espinal, ictus, corea de sydenham, síndrome de tourette, trauma y daños del sistema nervioso, etc.

También se describe el uso de las composiciones en el tratamiento de trastornos metabólicos tales como adrenoleucodistrofia, enfermedad de Krabbe (leucodistrofia de células globoides), leucodistrofia metacromática, enfermedad de Alexander, enfermedad de Canavan (leucodistrofia espongiiforme), enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, síndrome de Cockayne, enfermedad de Hurler, síndrome de Lowe, enfermedad de Leigh, enfermedad de Wilson, enfermedad de Hallervorden-Spatz, enfermedad de Tay-Sachs, etc. La utilidad de las composiciones descritas en la presente memoria para modular procesos metabólicos puede monitorizarse usando cualquiera de una variedad de técnicas conocidas y disponibles en la técnica incluyendo, por ejemplo, ensayos que miden la lipogénesis de adipocitos o lipólisis de adipocitos.

También se describe el uso de polipéptidos AARS (por ejemplo, polipéptidos QRS) y composiciones para modular la señalización celular, por ejemplo, a través de proteínas de la señalización celular (por ejemplo, Akt). La señalización celular puede monitorizarse usando cualquiera de varios ensayos muy conocidos. Por ejemplo, la inducción de eventos de señalización celular generales puede monitorizarse a través de patrones alterados de fosforilación de una variedad de proteínas diana. La detección de actividades de señalización celular en respuesta al tratamiento de células con polipéptidos QRS sirve por lo tanto como un indicador de efectos biológicos distintivos. Las proteínas diana usadas para este ensayo pueden seleccionarse de manera que se engloben componentes clave de cascadas principales de señalización celular, proporcionando de esta manera una visión amplia del paisaje de la señalización celular y su relevancia terapéutica. Generalmente, dichos ensayos implican el tratamiento de células con polipéptidos QRS seguido de inmunodetección con anticuerpos que detectan específicamente las formas fosforiladas (activadas) de las proteínas diana.

Las proteínas diana ilustrativas para monitorizar eventos de señalización celular terapéuticamente relevantes pueden incluir, pero no están limitadas a: p38 MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno; activada por estrés

celular y citoquinas inflamatorias; implicada en la diferenciación celular y apoptosis); SAPK/JNK (proteína quinasa activada por estrés/quinasa Jun amino terminal; activada por estreses celulares y citoquinas inflamatorias; Erk1/2, p44/42 MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno Erk1 y Erk2; activada por una amplia variedad de señales extracelulares; implicada en la regulación del crecimiento y diferenciación celulares); y Akt (activada por insulina y varios factores de crecimiento y supervivencia; implicada en la inhibición de la apoptosis, regulación de la síntesis de glucógeno, regulación del ciclo celular y crecimiento celular). La fosforilación general de residuos de tirosina también puede monitorizarse como un indicador general de cambios en la señalización celular mediada por fosforilación.

Por supuesto, se reconocerá que también pueden ensayarse otras clases de proteínas, tales como moléculas de adhesión celular (por ejemplo, cadherinas, integrinas, claudinas, cateninas, selectinas, etc.) y/o proteínas de canales iónicos para monitorizar eventos o actividades celulares moduladas por las composiciones de la invención.

También se describe el uso de polipéptidos AARS (por ejemplo, polipéptidos QRS) y composiciones para modular la producción de citoquinas por las células, por ejemplo, por leucocitos. La producción de citoquinas puede monitorizarse usando cualquiera de una variedad de ensayos conocidos en la técnica (es decir, RT-PCR, ELISA, ELISpot, citometría de flujo, etc.). Generalmente, dichos ensayos implican el tratamiento de células con polipéptidos AARS (por ejemplo, polipéptidos QRS) seguido de detección de ARNm o polipéptidos citoquina para medir cambios en la producción de citoquinas. La detección de incrementos y/o disminuciones en la producción de citoquinas en respuesta al tratamiento de las células con polipéptidos AARS (por ejemplo, polipéptidos QRS) sirve por lo tanto como un indicador de efectos biológicos claros. Los polipéptidos QRS pueden inducir, aumentar, y/o inhibir una respuesta inmune o inflamatoria mediante la modulación de la producción de citoquinas. Por ejemplo, los polipéptidos AARS (por ejemplo, polipéptidos QRS) polipéptidos y composiciones pueden usarse para alterar un perfil de citoquina (es decir, tipo 1 frente a tipo 2) en un sujeto. Las citoquinas ilustrativas que pueden medirse para monitorizar efectos biológicos de las composiciones QRS incluyen, pero no están limitadas a IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23 TGF- β , TNF- α , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , RANTES, MIP-1 α , Mix-1 β , MCP-1, GM-CSF, G-CSF, etc.

Generalmente, se administra una cantidad terapéuticamente efectiva de polipéptido a un sujeto o paciente. En realizaciones particulares, la cantidad de polipéptido administrada estará típicamente en el intervalo de aproximadamente 0,1 μ g/kg a aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal del paciente. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 0,1 μ g/kg a aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal (por ejemplo, aproximadamente 0,1-15 mg/kg/dosis) de polipéptido puede ser una dosificación inicial candidata para administración al paciente, ya sea, por ejemplo, por una o más administraciones separadas, o por infusión continua. Por ejemplo, un régimen de dosificación puede comprender administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del polipéptido, o aproximadamente la mitad de la dosis de carga. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 0,1 μ g/kg a aproximadamente 1 μ g/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que ocurra la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. El progreso de éstas y otras terapias (por ejemplo, terapias ex vivo) puede monitorizarse fácilmente por métodos y ensayos convencionales y basados en criterios conocidos para el médico u otros expertos en la técnica.

Formulaciones y composiciones farmacéuticas

También se describen composiciones que comprenden polipéptidos aminoácil-ARNt sintetasa, incluyendo truncamientos y/o variantes de éstos, formulados en disoluciones farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente aceptables para administración a una célula o un animal, bien solos, o en combinación con una o más modalidades adicionales de terapia. También se entenderá que, si se desea, las composiciones pueden administrarse también en combinación con otros agentes, tales como, por ejemplo, otras proteínas o polipéptidos o varios agentes farmacéuticamente activos. Virtualmente, no existe límite para otros componentes que también pueden incluirse en las composiciones, siempre que los agentes adicionales no afecten de manera adversa las actividades moduladoras de la respuesta inflamatoria u otros efectos que se desea conseguir.

En las composiciones farmacéuticas, la formulación de los excipientes y disoluciones vehiculares farmacéuticamente aceptables es muy conocida para los expertos en la técnica, como lo es el desarrollo de regímenes adecuados de dosificación y tratamiento para usar las composiciones particulares descritas en la presente memoria en una variedad de regímenes de tratamiento, incluyendo, por ejemplo, administración y formulación oral, parenteral, intravenosa, intranasal, e intramuscular.

En determinadas aplicaciones, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden administrarse mediante administración oral a un sujeto. Como tales, estas composiciones pueden formularse con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable, o pueden incluirse en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, o pueden comprimirse en comprimidos, o pueden incorporarse directamente con el alimento de la dieta.

En determinadas circunstancias, será deseable administrar las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria parenteralmente, intravenosamente, intramuscularmente, o incluso intraperitonealmente como se

describe, por ejemplo en Pat. U.S. No. 5.543.158; Pat. U.S. No. 5.641.515 y Pat. U.S. No. 5.399.363. Las disoluciones de compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilen glicoles líquidos, y mezclas de éstos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles (Pat. U.S. No. 5.466.468). En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto que se pueda manejar fácilmente con una jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilen glicol, y polietilen glicol líquido, y semejantes), mezclas adecuadas de éstos, y/o aceites vegetales. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede facilitar con diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timesoral, y semejantes. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Para administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución debe estar adecuadamente tamponada si es necesario y el diluyente líquido se debe hacer isotónico en primer lugar con disolución salina o glucosa suficiente. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, un medio acuoso estéril que puede emplearse será muy conocido para los expertos en la técnica a la vista de la presente descripción. Por ejemplo, una dosificación puede disolverse en 1 ml de disolución isotónica de NaCl y añadirse a 1.000 ml de fluido de hipodermoclasia o inyectarse en el sitio propuesto de infusión (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15^a. Edición, p. 1035-1038 y 1570-1580). Necesariamente se producirá alguna variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto que se está tratando. La persona responsable de administración, determinará, en cualquier evento, la dosis apropiada para el sujeto individual. Además, para administración humana, las preparaciones deben cumplir los estándares generales de esterilidad, pirogenicidad, y de seguridad y pureza según requieren los estándares biológicos de la de FDA Office.

Las disoluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con los diferentes otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diferentes ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio básico de dispersión y los demás ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado en vacío y de liofilización que rinden un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una disolución de éstos previamente esterilizada por filtración.

Las composiciones descritas en la presente memoria pueden formularse en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables, incluyen las sales de adición a ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y semejantes. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y semejantes. Después de la formulación, las disoluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente efectiva. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación tales como disoluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármaco, y semejantes.

Tal y como se usa en la presente memoria, "vehículo" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, tampones, disoluciones vehiculares, suspensiones, coloides, y semejantes. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es muy conocido en la técnica. Excepto si cualquier medio o agente convencional es incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse ingredientes activos suplementarios en las composiciones.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o similar inapropiada cuando se administra a un ser humano. La preparación de una composición acuosa que contiene una proteína como un ingrediente activo es muy conocida en la técnica. Típicamente, dichas composiciones se preparan como inyectables, bien como disoluciones o suspensiones líquidas;

también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por pulverizadores nasales, inhalación, y/o otros vehículos de administración en aerosol. Los métodos para administrar genes, polinucleótidos, y composiciones de péptidos directamente a los pulmones a través de pulverizadores de aerosol nasal se han descrito, por ejemplo, en Pat. U.S. No. 5.756.353 y Pat. U.S. No. 5.804.212. Asimismo, la administración de fármacos usando resinas de micropartículas intranasales (Takenaga et al., 1998) y compuestos lisofosfatidil-glicerol (Pat. U.S. No. 5.725.871) son muy conocidos en las técnicas farmacéuticas. Asimismo, la administración transmucosal de fármacos en la forma de una matriz de soporte de politetrafluoroetileno se describe en Pat. U.S. No. 5.780.045.

También se describen formulaciones tópicas. Los ejemplos de formulaciones tópicas incluyen cremas, pomadas, pastas, lociones, y geles.

La administración puede producirse por el uso de liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas, y semejantes, para la introducción de las composiciones en las células huésped adecuadas. En particular, las composiciones pueden formularse para administración bien encapsuladas en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera, una nanopartícula o semejantes. La formulación y uso de dichos vehículos de administración pueden llevarse a cabo usando técnicas conocidas y convencionales.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

LOS POLIPÉPTIDOS AMINO ACIL-ARN_T SINTETASA REDUCEN LA MIGRACIÓN E INFILTRACIÓN DE NEÚTRÓFILOS EN LOS PULMONES DESPUÉS DE PULSO CON LIPOPOLISACÁRIDO (LPS)

La migración de neutrófilos desde el sistema circulatorio a los pulmones está implicada en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) (véase, por ejemplo, R.A. Stockley, Chest 121:151 S-155S, 2002). La expresión de CXCR-2 puede jugar un papel en la migración de neutrófilos (véase, por ejemplo, Rios-Santos et al., American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 175:490-497, 2007). Para determinar si los polipéptidos tirosil-ARN_T sintetasa (YRS) y los polipéptidos histidil-ARN_T sintetasa (HisRS) pueden usarse para tratar trastornos mediados por neutrófilos, se anestesiaron ratones macho C57BL/6, se les inyectaron intra-nasalmente 50 µl de un lipopolisacárido 200 µg/ml (LPS, Sigma-Aldrich Cat# L2880) y se sacrificaron aproximadamente 8 horas después de la administración de LPS. Antes de la exposición a LPS, los ratones se trataron con polipéptidos YRS, polipéptidos HisRS, o control. Se insertó un catéter traqueal para recoger muestras de lavado broncoalveolar (BAL) lavando los pulmones cinco veces con 1 ml de disolución salina enfriada en hielo. El fluido de lavado se recogió para la tinción y recuento celular posteriores.

Como se muestra en la Figura 1A, los neutrófilos están ausentes típicamente del fluido BAL recuperado de animales, sanos, no tratados. La administración intra-nasal de LPS resultó en la infiltración de neutrófilos circulantes en los pulmones y en un incrementado marcado en neutrófilos BAL (Figura 1A, grupo LPS). El pretratamiento intraperitoneal con dexametasona, un corticosteroide sintético usado como control positivo en este experimento, resultó en una capacidad disminuida de los neutrófilos de relocarse a los pulmones después del pulso con LPS (Figura 1A, grupo Dex). De manera similar, la administración intravenosa de dos dosis de los polipéptidos YRS y HisRS sintetasa a las 7-8 horas y 1,5 horas antes de la administración de LPS, respectivamente, resultó en una reducción drástica en neutrófilos BAL. Los resultados para YRS se muestran en la Figura 1 (Figura 1A, grupo Y341A; y Figura 1B, grupo Mini-YRS). El polipéptido HisRS de longitud completa ejerció efectos similares en los neutrófilos (Figura 2A), y también fue capaz de disminuir la migración de los eosinófilos a los pulmones (Figura 2B). Se observaron resultados similares para polipéptidos triptofanil-ARN_T sintetasa (WRS).

EJEMPLO COMPARATIVO 2

LOS POLIPÉPTIDOS TIROSIL-ARN_T SINTETASA ESTIMULAN LA MIGRACIÓN DE LÍNEAS CELULARES 293 Y CHO TRANSFECTADAS CON EL RECEPTOR CXCR-2

Los efectos de polipéptidos tirosil-ARN_T sintetasa en la señalización de CXCR-2 se ensayaron midiendo la migración de células que expresan CXCR-2 en respuesta a dichos polipéptidos. Las células 293/CXCR-2 se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 10% FBS inactivado con calor, 1% Penicilina-Estreptomicina y 800µg/ml Geneticina, todos adquiridos en Invitrogen, Carlsbad, CA. El medio DMEM con 0,1% BSA se usó como tampón de migración. Antes del ensayo de migración, se quitó el suero a las células durante 30 minutos en tampón de migración, se centrifugaron a 200g durante 5 minutos y se resuspendieron en tampón de migración a una densidad final de 1×10^6 células/ml. Se añadieron 100µl a insertos de filtro transpocillo de 6,5mm (Costar, Cambridge, MA) y se añadieron 600µl de tampón de migración que contenía una quimioquina control, los polipéptidos tirosil-ARN_T sintetasa o tampón solo a las cámaras inferiores de la placa. Se dejó que las células migraran durante 4 horas y las células remanentes en la cámara superior (insertos de filtro transpocillo) se retiraron con una torunda de algodón. Los insertos de filtro se transfirieron a una nueva placa de 24 pocillos que contenía 500µl de tampón de disociación celular (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 12µg/ml de Calceína AM (Invitrogen, Carlsbad, CA). Después de 1 hora de

incubación a 37°C, las células se recogieron y se resuspendieron en 100µl PBS, se transfirieron a una placa opaca de 384 pocillos Greiner, y se contaron por fluorescencia en un lector de placas.

Las células CHO-K1/CXCR-2 se mantuvieron en medio F12 suplementado con 10% FBS inactivado con calor, 1% Penicilina-Estreptomicina-Glutamina y 800µg/ml Geneticina. El medio F12 con 0,5% BSA se usó como tampón de migración. Antes de la migración, se quitó el suero a las células durante 30 minutos en tampón de migración, se recogieron usando tampón de disociación celular, se centrifugaron a 200g durante 5 minutos y se resuspendieron en tampón de migración a la densidad final de 1×10^6 células/ml. Se añadieron 100µl a insertos de filtro transpocillo de 6,5mm y se añadieron 600µl de tampón de migración que contenía una quimioquina control, los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa o tampón solo a las cámaras inferiores de la placa. Se dejó que las células migraran durante 3 horas y las células remanentes en la cámara superior (insertos de filtro transpocillo) se retiraron con una torunda de algodón. Los insertos de filtro se transfirieron a una nueva placa de 24 pocillos que contenía 500µl PBS y 12 µg/ml Calceína AM. Después de 30 minutos de incubación a 37°C, los filtros se transfirieron de nuevo a una nueva placa de 24 pocillos que contenía 500µl tripsina sin rojo de fenol. Después de 2 a 5 minutos de incubación, las células despegadas se recogieron y se resuspendieron en 100µl PBS, se transfirieron a una placa opaca de 384 pocillos Greiner, y se contaron por fluorescencia en un lector de placas.

La Figura 3 muestra la capacidad de los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa para inducir migración de células transfectadas con CXCR-2.

EJEMPLO COMPARATIVO 3

LOS POLIPÉPTIDOS TIROSIL-ARN_t SINTETASA ESTIMULAN LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES (PMN)

Para ensayar los efectos de los polipéptidos YRS en la migración de las células PMN, se purificaron células granulocitos humanos de sangre periférica humana fresca usando el Kit de Enriquecimiento de Granulocitos Humanos RosetteSep[®] (StemCell Technologies, Vancouver, BC) según las instrucciones del fabricante. Se usó medio RPMI sin suero, suplementado con 0,5% FBS como tampón de migración. Se resuspendieron 4×10^7 células en 1 ml de tampón de migración y se incubaron durante 30 minutos con 8µl of de una disolución 1mg/ml Calceína AM (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células se recogieron, se centrifugaron a 200g durante 5 minutos sin freno, se lavaron una vez con tampón de migración y se resuspendieron en el mismo tampón a una densidad final de 1×10^7 /ml.

Se añadieron 100µl a insertos de filtro transpocillo de 6,5mm (Costar, Cambridge, MA) y se añadieron 600µl de tampón de migración que contenía una quimioquina control, los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa o tampón solo a las cámaras inferiores de la placa. Se dejó que las células migraran durante 45 minutos en el incubador y las células que migraron a la cámara inferior se recogieron, se resuspendieron en 100µl PBS, se transfirieron a una placa opaca de 384 pocillos Greiner y se contaron por fluorescencia en un lector de placas.

La Figura 4 muestra la curva de migración con forma de campana observada típicamente con quimioquinas. Los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa indujeron una migración bifásica de PMN tanto a concentraciones de pM bajo como a µM mayores.

EJEMPLO COMPARATIVO 4

EL POLIPÉPTIDO ASPARTIL-ARN_t SINTETASA D1 INDUCE LA SECRECIÓN TANTO DE CITOQUINAS PRO-COMO ANTI-INFLAMATORIAS

Para ensayar la posible conexión entre el fragmento D1 (residuos 1-154) de AspRS de longitud completa y la inflamación, se inyectó proteína recombinante intravenosamente en ratones sanos, y se observaron los cambios en citoquinas inflamatorias (tanto pro- como anti-inflamatorias) secretadas en la corriente sanguínea respecto a controles con vehículo. Se recogió suero 2 y 6 horas después de la inyección y se midieron los niveles de TNF-α e IL-10 por ELISA.

Después del examen a las 2 horas después de la inyección de D1, se observó una secreción incrementada de citoquinas tanto pro-inflamatorias (TNF-α, MIP-1b, IL-12(p40), KC, MIP-2), como de IL-10, una citoquina anti-inflamatoria (Figura 5A y 5B). A las 6 después de la inyección de D1, las citoquinas pro-inflamatorias no pudieron detectarse más, pero los niveles de IL-10 anti-inflamatoria en el suero continuaron incrementándose (véanse las Figuras 5A y B).

Para confirmar estos resultados, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que representan una mezcla tanto de monocitos como linfocitos aisladas de donantes humanos se expusieron a la proteína D1 in vitro (así como la proteína AspRS de longitud completa), y los medios se ensayaron para la secreción de TNF-α o IL-10 en respuesta al tratamiento. De manera similar a los efectos observados in vivo, el tratamiento con D1 resultó en la secreción tanto de TNF-α (después de 4 horas de tratamiento) como de IL-10 (después de 24 horas de tratamiento) de la población celular mixta (véanse las Figuras 5C y D).

EJEMPLO COMPARATIVO 5**LAS VARIANTES DE CORTE Y EMPALME HRS-SV9 Y HRS-SV11 INCREMENTAN LA SECRECIÓN DE IL-2 EN CÉLULAS T ACTIVADAS**

5 Cuando el antígeno es presentado por las células presentadoras de antígeno (APC), la respuesta detectable más temprana de la activación de las células T es la secreción de citoquinas, tales como IL-2. A través de la secreción autocrina, IL-2 desencadena la proliferación de las células T generando de esta manera células requeridas para eliminar el antígeno. Así, los reguladores de la secreción de IL-2 sirven como inmunomoduladores para las respuestas inmunes mediadas por linfocitos T.

10 Las células T de leucemia Jurkat (ATCC No: TIB-152) se usan ampliamente para la investigación sobre la activación de las células T, usando la expresión y liberación de IL-2 como una indicación de la activación. Para la activación de las células T, las células T Jurkat se estimularon con ésteres de forbol (PMA) y ionomicina (IOM). La secreción de IL-2 en el medio se evaluó por ELISA. Como se esperaba, PMA e ionomicina estimularon a las células T Jurkat para liberar IL-2 de una manera dependiente de la dosis.

15 Como se muestra en la Figura 6, HRS-SV9 y HRS-SV11, cuando se co-aplicaron con PMA e IOM incrementaron significativamente la secreción de IL-2. Así, tanto HRS-SV9 como HRS-SV11 presentaron actividad inmunomoduladora.

EJEMPLO COMPARATIVO 6**LA VARIANTE DE CORTE Y EMPALME HRS-SV9 ESTIMULA LA SECRECIÓN DE TNF-ALFA EN PBMC**

20 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre humana. Las células se resuspendieron en medio RPMI con 10% FBS hasta 1×10^6 células/mL. Se trató un millón de células durante 24 horas con HRS-SV9 a 6,25, 12,5, 25, 50, 100, y 250 nM. Las PBMC también se trataron con Lipopolisacárido (LPS) a 1 EU/mL, PBS, ó 100 nM Proteína Control Negativo 1 ó 2. Después de 24 horas, el sobrenadante celular se recogió por centrifugación a 2.000xg durante 10 min y se evaluó en un ELISA de TNF- α (R&D Systems; Cat. DTA00C).

25 Como se muestra en la Figura 7 PBMC estimuladas con HRS-SV9 secretan TNF- α de una manera dependiente de la dosis. Por el contrario, las células tratadas con PBS o proteínas control negativo secretaron una cantidad mínima o ninguna de TNF- α (PBS, Ctrl. Neg. 1 y Ctrl. Neg. 2). LPS, un inductor conocido de la secreción de TNF- α , dio lugar a una señal positiva a 1 EU/ml. Aunque estaba presente una cantidad mínima de LPS en la proteína HRS-SV9 (~0,11 EU/mL a 250 nM), la señal de TNF- α observada para HRS-SV9 está por encima de lo que podía atribuirse a LPS. Así, los resultados de este ejemplo demuestran que HRS-SV9 actúa como un modulador de la secreción de aTNF- α .

30

EJEMPLO COMPARATIVO 7**GENERACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE GLUTAMINIL-ARN_T SINTETASA (QRS) ENDÓGENA HUMANA**

35 Se expresó QRS humano recombinante de longitud completa (SEQ ID NO:25) y se purificó de E. coli usando cromatografía IMAC de níquel. Se generaron fragmentos proteolíticos endógenos mediante el proceso de purificación y posteriormente se caracterizaron usando LC/MS/MS. Sin pretender la vinculación a ninguna teoría, se cree que estos fragmentos son indicativos de aquellos que se crearían en células humanas a través del proceso de proteólisis natural.

40 Para identificar los residuos en los que se produce la proteólisis para QRS humano, las proteínas se separaron por SDS-PAGE corrida en 4-12% MOPS, las partes de gel que contenían los fragmentos se escindieron y se sometieron a digestión con tripsina en gel seguido de análisis LC/MS/MS. Este proceso permitió la identificación tanto de la parte de la proteína de longitud completa a partir de la que se generaron los fragmentos como los sitios de escisión distintos de tripsina que podrían atribuirse a escisión proteolítica endógena. Todos los fragmentos de proteína identificados representaban la parte N-terminal de QRS. Véase la Tabla 1 siguiente, y la Figura 8 (A-C).

45

Tabla 1: Fragmentos proteolíticos de QRS endógenos

	Masa completa (Da)	Límite N-term.	Límite C-term.	Péptido no triptico encontrado
Q1	22.200	1	183	
Q2	26.500	1	220	DVVENGETADQTL ²²⁰ (SEQ ID NO:26)
Q3	29.800	1	249	TPGYVVT ²⁴⁹ (SEQ ID NO:27)
Q4	25.000	1	181-293 (200)	
Q5	24.000	1	181-293	

Los fragmentos de QRS que concuerdan de cerca con los identificados por LC/MS/MS en la Tabla 1 anterior se clonaron en un vector de expresión de proteínas de E. coli para la sobre-expresión y purificación. Las proteínas se purificaron usando cromatografía Níquel IMAC y los contaminantes se eliminaron usando una membrana Sartobind Q (Sartorius). Véase la Figura 9.

EJEMPLO COMPARATIVO 8

LOS FRAGMENTOS PROTEOLÍTICOS N-TERMINALES DE QRS INHIBEN LA SECRECIÓN DE TNF-ALFA INDUCIDA POR LPS DE PBMC

Para medir los efectos de los polipéptidos QRS en la secreción de TNF- α , se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre humana obtenida de donantes sanos y se trataron con polipéptidos QRS. Las células se resuspendieron en medio RPMI con 10% FBS hasta 1×10^6 células/mL. Se pre-trataron un millón de células durante 30 minutos con una dosis de respuesta de 63 nM, 125 nM, 250 nM y 500 nM (463 nM para Q3) de cada fragmento de Q. Después de 30 minutos, se añadió lipopolisacárido (LPS, 0,5 EU/mL) a células pretratadas y no tratadas. Después de 24h, el sobrenadante celular se recogió por centrifugación a 2.000xg durante 10 minutos y se evaluó en un ELISA de TNF- α (R&D Systems; Cat. DTA00C) según las directrices del kit.

Como se muestra en la Figura 10, el pretratamiento con los cuatro fragmentos de QRS inhibió la cantidad de TNF- α liberada de PBMC después de estimulación con 0,5 EU/ml LPS.

EJEMPLO COMPARATIVO 9

EL FRAGMENTO PROTEOLÍTICO N-TERMINAL DE QRS INHIBE LA SECRECIÓN DE TNF-ALFA INDUCIDA POR LPS DE PBMC A 4 Y 24 HORAS

Para medir los efectos a largo plazo de los polipéptidos QRS en la secreción de TNF- α , se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre humana obtenida de donantes sanos y se trataron con polipéptidos QRS. Las células se resuspendieron en medio RPMI con 10% FBS hasta 1×10^6 células/mL. Se pre-trataron un millón de células durante 30 minutos con 500nM Q4. Después de 30 minutos, se añadió lipopolisacárido (LPS, 0,5 EU/mL) a células pretratadas con Q4 y no tratadas. Después de 4 horas y 24 horas, el sobrenadante celular se recogió por centrifugación a 2.000xg durante 10 minutos y se evaluó en un ELISA de TNF- α (R&D Systems; Cat. DTA00C) según las directrices del kit.

Como se muestra en la Figura 11 el pretratamiento con el fragmento Q4 inhibió la cantidad de TNF- α liberada de PBMC después de estimulación con 0,5 EU/ml de LPS, incluso después de 4 a 24 horas.

EJEMPLO COMPARATIVO 10

EI FRAGMENTO PROTEOLÍTICO N-TERMINAL DE QRS INHIBE LA SECRECIÓN DE IL-12 (p40) INDUCIDA POR LPS DE PBMC-12

Para medir los efectos de los polipéptidos QRS en la secreción de IL-12, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre humana obtenida de donantes sanos y se trataron con polipéptidos QRS. Las células se resuspendieron en medio RPMI con 10% FBS hasta 1×10^6 células/mL. Se pre-trataron un millón de células durante 30 minutos con 500nM Q4. Después de 30 minutos, se añadió lipopolisacárido (LPS, 0,5 EU/mL) a células pretratadas con Q4 y no tratadas. Después de 24 horas de incubación el sobrenadante celular se recogió y se congeló rápidamente en nitrógeno líquido. Las muestras se transportaron congeladas a MD Biosciences (St. Paul, MN) para análisis de citoquinas multiplex para detectar niveles de IL-12 (p40).

Como se muestra en la figura 12 el pretratamiento con el fragmento Q4 de QRS inhibió la cantidad de IL-12(p40) liberada de PBMC después de estimulación con LPS.

EJEMPLO 11

LOS POLIPÉPTIDOS HISTIDIL-ARN_T SINTETASA, ASPARTIL-ARN_T SINTETASA Y P43 REDUCEN LA MIGRACIÓN DE THP-1

Se cultivaron células THP-1 (ATCC No. de catálogo TIB-202) en medio RPMI-1640 (ATCC No. de catálogo 30-2001) suplementado con 10% FBS inactivado con calor (Invitrogen, No. de Catálogo 10082147) y 0,05 mM 2-mercaptoetanol. La densidad celular se mantuvo a $\leq 1 \times 10^6$ células/ml. La migración se hizo en Soportes Permeables Transpocillo Corning en placas de 24 pocillos (6,5mm Diámetro; 8,0 μ m tamaño de poro; Fisher Scientific No. de catálogo 07-200-150).

Antes del ensayo de migración, las células se recogieron por centrifugación a 300g durante 10 minutos, se lavaron con PBS y se resuspendieron en medio de migración (medio RPMI-1640, 0,1% BSA) suplementado con la concentración deseada de histidil-ARN_T sintetasa (HisRS), aspartil-ARN_T sintetasa (AspRS), polipéptido p43, o con PBS como control, a una densidad de 6×10^6 células/ml. Las células se marcaron fluorescentemente con 6 μ g/ml de Calceína AM (Invitrogen, No. de catálogo C3099) y se pusieron en un incubador de cultivo tisular a 37°C en 5% CO₂ durante 45 minutos. Se añadieron 100 μ l de células (que contenían 6×10^5 células) a la cámara superior de la unidad de migración, se añadieron 600 μ l de medio de migración que contenía el quimioatrayente CCL-5 o CCL-23 (R&D Systems, No. de catálogo 278-RN-010 y 131-M1-025, respectivamente) o tampón solo (como control negativo) a cada cámara inferior, y las células migraron durante 2 horas en el incubador a 37°C en 5% CO₂.

Las células que migraron a la cámara inferior se recogieron, se resuspendieron en 100 μ l PBS, se pusieron en una placa opaca de 384 pocillos Greiner, y se cuantificó la fluorescencia (485/538/530) en un lector de placas. Los resultados se muestran en las Figuras 13A a 13C. La Figura 13A muestra los efectos inhibidores de HisRS en la migración de THP-1 a CCL-23, la Figura 13B muestra los efectos inhibidores de AspRS en la migración de THP-1 a CCL-23, y la Figura 13C muestra los efectos inhibidores del polipéptido p43 en la migración de THP-1 a CCL-5.

EJEMPLO COMPARATIVO 12

IDENTIFICACIÓN POR LC/MS/MS DE FRAGMENTOS DE QRS ENDÓGENOS EN MACRÓFAGOS

Para identificar los fragmentos de QRS proteolíticos endógenos que tienen actividades no canónicas, se trataron líneas celulares de macrófagos (RAW 264.7) con medio DMEM sin suero a una densidad de 15×10^6 células/matraz. Después de 48 horas, el medio y los sedimentos celulares se recogieron y procesaron. Se separaron 200 μ g de proteína de las fracciones proteómicas secretadas y citosólicas por SDS-PAGE y se prepararon secciones de gel para análisis por espectrometría de masa.

Se analizaron digeridos en gel por espectrómetro de masa con trampa de iones LTQ XL (ThermoFisher) equipado con sistema último 3000 μ LC (Dionex). Las muestras se cargaron en primer lugar en PepTrap (michrom) durante 10 min con 5% Acetonitrilo en 0,1% ácido fórmico usando automuestreador Dionex. Las muestras se analizaron con una columna capilar de sílice fusionada de 100 μ m (diámetro interno) que contenía 10 cm de resina C18 (michrom). Los péptidos se eluyeron de la columna en espectrómetro de masa con una velocidad de flujo de 0,45 μ l/min usando un gradiente lineal de 5-33,5% acetonitrilo en 0,1% ácido fórmico en 110 min.

LTQ se operó en modo de escaneo dependiente de datos de manera que un escaneo completo MS es seguido de siete escaneos MS/MS de los siete iones más abundantes. Se permitió la exclusión dinámica con cómputo de repetición igual a 1, duración de repetición igual a 20 segundos, tamaño de la lista de exclusión es 300 y la duración de exclusión es 60 segundos.

Después del análisis LC-MS/MS, los datos brutos se buscaron con BioWorks 3.3.1 (SEQUEST) usando una variante diana/señuelo concatenada de la base de datos de ratón IPI. Los datos SEQUEST se filtraron y clasificaron con DTASelect. Los datos proteómicos filtrados se organizaron y ensamblaron en peptografías usando secuencias de comandos PROTOMAP diseñadas en el laboratorio del Profesor Benjamin Cravatt en Scripps Research Institute (véase, por ejemplo, Dix et al., Cell. 134:679-691, 2008).

La Figura 14 muestra una Plataforma de Análisis de Topografía y Migración de Proteínas (PROTOMAP) de fracciones citosólicas (azul) y de medio condicionado (rojo), junto con una representación de la secuencia del polipéptido QRS; (morado) indica que el péptido se encontró tanto en fracciones citosólicas como de medio condicionado. Las Figuras 15A-15D muestran los fragmentos de péptido que corresponden al PROTOMAP de la Figura 14. En estas figuras, (azul; en *italica*) corresponde a péptidos detectados en el citosol, (rojo; subrayado) corresponde a péptidos detectados en el medio condicionado, y (morado; en *italica* y subrayado) corresponde a péptidos detectados en ambas muestras. La Figura 15A muestra los fragmentos de péptido para la banda 6 (QRS de longitud completa), la Figura 15B muestra el fragmento de péptido para la banda 9 (fragmento QRS C-terminal), y las Figuras 15C-D muestran los péptidos de las bandas 19 y 20 (fragmento QRS N-terminal).

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> aTyr Pharma Inc.
Watkins, Jeffry Dean
5 Vasserot, Alain P.
Greene, Leslie Ann
Adams, Ryan Andrew
Chiang, Kyle P.
Zhang, Wei
10 Piehl, Kristi Helen
Hong, Fei
He, Alina
- <120> AMINO ACIL-ARNt SINTETASAS PARA
15 MODULAR LA INFLAMACIÓN
- <130> 120161.420PC
- <140> PCT
20 <141> 10-12-2010
- <150> US 61/285.913
<151> 11-12-2009
- 25 <150> US 61/285.923
<151> 11-12-2009
- <150> US 61/285.919
<151> 11-12-2009
30
- <160> 117
- <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- 35 <210> 1
<211> 528
<212> PRT
<213> Homo sapiens
- 40 <400> 1

```

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

```

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

<210> 2
 <211> 528
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Asp Ala Pro Ser Pro Glu Glu Lys Leu His Leu Ile Thr Arg
 1 5 10 15
 Asn Leu Gln Glu Val Leu Gly Glu Glu Lys Leu Lys Glu Ile Leu Lys
 20 25 30
 Glu Arg Glu Leu Lys Ile Tyr Trp Gly Thr Ala Thr Thr Gly Lys Pro
 35 40 45
 His Val Ala Tyr Phe Val Pro Met Ser Lys Ile Ala Asp Phe Leu Lys
 50 55 60
 Ala Gly Cys Glu Val Thr Ile Leu Phe Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu
 65 70 75 80
 Asp Asn Met Lys Ala Pro Trp Glu Leu Leu Glu Leu Arg Val Ser Tyr
 85 90 95
 Tyr Glu Asn Val Ile Lys Ala Met Leu Glu Ser Ile Gly Val Pro Leu

10

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	Ala	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	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				

<210> 3
<211> 364
<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	
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				
	355						360								

<210> 4
 <211> 1683
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 4

atgggggacg	ctcccagccc	tgaagagaaa	ctgcacctta	tcacccggaa	cctgcaggag	60
gttctggggg	aagagaagct	gaaggagata	ctgaaggagc	gggaacttaa	aatttactgg	120
ggaacggcaa	ccacgggcaa	accacatgtg	gcttactttg	tgcccatgtc	aaagattgca	180
gacttcttaa	aggcagggtg	tgaggttaaca	attctgtttg	cggacctcca	cgcatacctg	240
gataacatga	aagccccatg	ggaacttcta	gaactccgag	tcagttacta	tgagaatgtg	300
atcaaagcaa	tgctggagag	cattgggtgtg	cccttggaga	agctcaagtt	catcaaaggc	360
actgattacc	agctcagcaa	agagtacaca	ctagatgtgt	acagactctc	ctccgtgggtc	420
acacagcacg	attccaagaa	ggctggagct	gaggtggtaa	agcaggtgga	gcaccctttg	480
ctgagtggcc	tcttatcccc	cggactgcag	gctttggatg	aagagtattt	aaaagtagat	540
gcccattttg	gaggcattga	tcagagaaaag	attttcacct	ttgcagagaa	gtacctccct	600
gcacttggct	attcaaaaacg	gtccatctcg	atgaatccta	tggttccagg	attaacaggc	660
agcaaaatga	gctcttcaga	agaggagtcc	aagattgatc	tccttgatcg	gaaggaggat	720
gtgaagaaaa	aactgaagaa	ggccttctgt	gagccaggaa	atgtggagaa	caatggggtt	780
ctgtccttca	tcaagcatgt	cctttttccc	cttaagtccg	agtttgatgat	cctacgagat	840
gagaaatggg	gtggaacaaa	aacctacaca	gcttacgtgg	acctggaaaa	ggactttgct	900

10

```

gctgaggttg tacatcctgg agacctgaag aattctgttg aagtcgcact gaacaagttg 960
ctggatccaa tccgggaaaa gtttaataacc cctgccctga aaaaactggc cagcgctgcc 1020
taccagatc cctcaaagca gaagccaatg gccaaaggcc ctgccaagaa ttcagaacca 1080
gaggaggtca tcccatcccg gctggatatc cgtgtgggga aaatcatcac tgtggagaag 1140
caccagatg cagacagcct gtatgtagag aagattgacg tgggggaagc tgaaccacgg 1200
actgtggtga gcggcctggt acagtctgtg cccaaggagg aactgcagga caggctggta 1260
gtggtgctgt gcaacctgaa accccagaag atgagaggag tcgagtccca aggcattgctt 1320
ctgtgtgctt ctatagaagg gataaacgcg caggttgaac ctctggaccg tccggcaggc 1380
tctgctcctg gtgagcacgt gtttgtgaag ggctatgaaa agggccaacc agatgaggag 1440
ctcaagccca agaagaaagt cttcgagaag ttgcaggctg acttcaaaat ttctgaggag 1500
tgcacgcac agtggaagca aaccaacttc atgaccaagc tgggctccat ttcctgtaaa 1560
tcgctgaaag gggggaacat tagctagcca gcccagcatc ttccccctt cttccaccac 1620
tgagtcacat gctgtctctt cagtctgtc catccatcac ccatttacc atctctcagg 1680
aca
1683

```

<210> 5

<211> 8

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Etiqueta C-terminal

10

<400> 5

```

Leu Glu His His His His His His
1 5

```

15 <210> 6

<211> 348

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <220>

<221> VARIANTE

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

<223> Xaa = Cualquier Aminoácido

25 <400> 6

```

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Ile Phe Thr Phe Ala Glu
1 5 10 15
Lys Tyr Leu Pro Ala Leu Gly Tyr Ser Lys Arg Val His Leu Met Asn
20 25 30
Pro Met Val Pro Gly Leu Thr Gly Ser Lys Met Ser Ser Ser Glu Glu
35 40 45
Glu Ser Lys Ile Asp Leu Leu Asp Arg Lys Glu Asp Val Lys Lys Lys
50 55 60
Leu Lys Lys Ala Phe Cys Glu Pro Gly Asn Val Glu Asn Asn Gly Val
65 70 75 80
Leu Ser Phe Ile Lys His Val Leu Phe Pro Leu Lys Ser Glu Phe Val
85 90 95
Ile Leu Arg Asp Glu Lys Trp Gly Gly Asn Lys Thr Tyr Thr Ala Tyr
100 105 110
Val Asp Leu Glu Lys Asp Phe Ala Ala Glu Val Val His Pro Gly Asp
115 120 125
Leu Lys Asn Ser Val Glu Val Ala Leu Asn Lys Leu Leu Asp Pro Ile
130 135 140
Arg Glu Lys Phe Asn Thr Pro Ala Leu Lys Lys Leu Ala Ser Ala Ala
145 150 155 160
Tyr Pro Asp Pro Ser Lys Gln Lys Pro Met Ala Lys Gly Pro Ala Lys
165 170 175
Asn Ser Glu Pro Glu Glu Val Ile Pro Ser Arg Leu Asp Ile Arg Val
180 185 190
Gly Lys Ile Ile Thr Val Glu Lys His Pro Asp Ala Asp Ser Leu Tyr
195 200 205

```

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

<210> 7
 <211> 2178
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 7

```

ttcagaaagt ggtggagggg agacttcctt tttcccagag acagaagggt atgcacccag 60
tggcctggga ccattgttct gggctttttt tcccttcgac atggatttgc ttctcactgt 120
gtacccaac caccaaaacc accctgagat caatgctggt gtcctcgcat cagatggcct 180
agagatcctt ccacctctta acacaagcat ctagggtccac ttactcaaaa tctggcctca 240
gttgagagca gagtatacca tcagagccca ttctcctgtc tgctgtctgg gacgtggaaa 300
gaaagttagc tctagggggt ctttcagggt gcctctgtaa ggactggatg ctcctttccg 360
gaatccaaga gttcaccagg ctgcttctct aatggacgat gatcctcttc ctctgacgt 420
ctctccctgg cagcaccag atgcagacag cctgtatgta gagaagattg acgtggggga 480
agctgaacca cggactgtgg tgaagggcct ggtacagttc gtgccaagg aggaactgca 540
ggacaggctg gtagtgggtc tgtgcaacct gaaacccag aagatgagag gactcgagtc 600
ccaaggcatg cttctgtgtg cttctatgtg agtgaggact tggagtgggg cacaggacct 660
ggggaggcca ggaagagtga ggaatcagcc catatgatgt ccttcacac accaggtgga 720
agctctgaga acacgtgcct cttccttgct gatgccaaa gttgatgcat gaaggactta 780
tcgtacaagt actgttaatg aagcatttta cctacagtta attttgtaa aatagaaatg 840
gagggctcaa accagtacat acccaagtct tactactagt aaggagtgga gcagggattc 900
aaatcccagt tttgatgtct ataaagtctc cgctacgtta ttttatactt cctcccctag 960
aaacacagat tttggtatct tgacacacaa ttttggtata gcctgggtta atgtaacct 1020
ggtgatatgc agggatgtag caagataaga ggacctcctg gggctctggt actgaggatg 1080
ccctaaatcc catcagggcc cctgtgtaaa ggcccggtt gctttggcct ccacagtcac 1140
tggaacccat ccatagcctc actcttctct tgtcctgtgt cttcccagag aagggataaa 1200
ccgccaggtt gaacctctgg accctccggc aggctctgct cctggtgagc acgtgtttgt 1260
gaagggtcat gaaaagggcc aaccagatga ggagctcaag cccaagagga aagtcttcga 1320
gaagtgcag gctgacttca aaatttctga ggagtgcac gcacagtgga agcaaaccaa 1380
cttcatgacc aagctgggct ccatttctctg taaatcgctg aaagggggga acattagcta 1440
gccagcccag catcttcccc cttcttccca cactgagtc atctgctgtc tcttcagtct 1500
gctccaccca tcaccattt acccatctct caggacacgg aagcagcggg tttggactct 1560
ttattcggtg cagaactcgg caaggggcag cttaccctcc ccagaaccca ggatcatcct 1620
gtctggctgc agtgagagac caaccctaa caagggctgg gccacagcag ggagtccagc 1680
cctaccttct tcccttgga gctggagaaa tctggtttca atataactca tttaaaaatt 1740
tatgccacag tccttataat tggaaaaata ctggtgccca ggttttcttg gattatcca 1800
agcagctgcg cccctagctg ggatctggta cctggactag gctaattaca gcttctcccc 1860
aacaggaaac tgtgggattt gaaaaggaaa gggaagggaa aacagagaac ctagtgggtct 1920
accaagtggg tggcaacttt cccaatgtct gcttactctg aggcctggca ctggggggcca 1980
gggctgccc cagggtctct ggaatttccc ttgatccagc taggctggga cactccctaa 2040
atcagctgcg tgttgttagc atcaggcaga atgaatggca gagagtgatt ctgtcttcat 2100
agagggtggg gtacttctcc ataaggcatc tcagtcacaa ccccatcact gtcataaatt 2160
caaataaaaa gtctgaac
    
```

<210> 8
 <211> 388
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> VARIANTE

<222> 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388

<223> Xaa = Cualquier Aminoácido

5 <400> 8

```

Met Gly Asp Ala Pro Ser Pro Glu Glu Lys Leu His Leu Ile Thr Arg
 1      5      10      15
Asn Leu Gln Glu Val Leu Gly Glu Glu Lys Leu Lys Glu Ile Leu Lys
 20      25      30
Glu Arg Glu Leu Lys Ile Tyr Trp Gly Thr Ala Thr Thr Gly Lys Pro
 35      40      45
His Val Ala Tyr Phe Val Pro Met Ser Lys Ile Ala Asp Phe Leu Lys
 50      55      60
Ala Gly Cys Glu Val Thr Ile Leu Phe Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu
 65      70      75      80
Asp Asn Met Lys Ala Pro Trp Glu Leu Leu Glu Leu Arg Val Ser Tyr
 85      90      95
Tyr Glu Asn Val Ile Lys Ala Met Leu Glu Ser Ile Gly Val Pro Leu
 100     105     110
Glu Lys Leu Lys Phe Ile Lys Gly Thr Asp Tyr Gln Leu Ser Lys Glu
 115     120     125
Tyr Thr Leu Asp Val Tyr Arg Leu Ser Ser Val Val Thr Gln His Asp
 130     135     140
Ser Lys Lys Ala Gly Ala Glu Val Val Lys Gln Val Glu His Pro Leu
 145     150     155     160
Leu Ser Gly Leu Leu Tyr Pro Gly Leu Gln Ala Leu Asp Glu Glu Tyr
 165     170     175
Leu Lys Val Asp Ala Gln Phe Gly Gly Ile Asp Gln Arg Lys Ile Phe
 180     185     190
Thr Phe Ala Glu Lys Tyr Leu Pro Ala Leu Gly Tyr Ser Lys Arg Val
 195     200     205
His Leu Met Asn Pro Met Val Pro Gly Leu Thr Gly Ser Lys Met Ser
 210     215     220
Ser Ser Glu Glu Glu Ser Lys Ile Asp Leu Leu Asp Arg Lys Glu Asp
 225     230     235     240
Val Lys Lys Lys Leu Lys Lys Ala Phe Cys Glu Pro Gly Asn Val Glu
 245     250     255
Asn Asn Gly Val Leu Ser Phe Ile Lys His Val Leu Phe Pro Leu Lys
 260     265     270
Ser Glu Phe Val Ile Leu Arg Asp Glu Lys Trp Gly Gly Asn Lys Thr
 275     280     285
Tyr Thr Ala Tyr Val Asp Leu Glu Lys Asp Phe Ala Ala Glu Val Val
 290     295     300
His Pro Gly Asp Leu Lys Asn Ser Val Glu Val Ala Leu Asn Lys Leu
 305     310     315     320
Leu Asp Pro Ile Arg Glu Lys Phe Asn Thr Pro Ala Leu Lys Lys Leu
 325     330     335
Ala Ser Ala Ala Tyr Pro Asp Pro Ser Lys Gln Lys Pro Met Ala Lys
 340     345     350
Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 355     360     365
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 370     375     380
Xaa Xaa Xaa Xaa
 385

```

<210> 9

10 <211> 1167

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 9

15

```

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

```

<210> 10

<211> 318

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

```

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

```

<210> 11

<211> 1736

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 11

```

gaaagatttt cacctttgca gagaagtacc tccctgcact tggctattca aaacgggtcc 60
atctgatgaa tcctatggtt ccaggattaa caggcagcaa aatgagctct tcagaagagg 120
agtccaagat tgatctcctt gatcggaaagg aggatgtgaa gaaaaaactg aagaaggcct 180
tctgtgagcc aggaaatgtg gagaacaatg ggggtctgtc cttcatcaag catgtccttt 240
ttccccttaa gtccgagttt gtgacacctac gagatgagaa atgggggtgga aacaaaacct 300
acacagctta cgtggacctg gaaaaggact ttgctgctga ggttgtagacat cctggagacc 360
tgaagaattc tgttgaagtc gcaactgaaca agttgctgga tccaatccgg gaaaagttaa 420
ataccctgc cctgaaaaaa ctggccagcg ctgcctaccc agatccctca aagcagaagc 480
caatggccaa aggcctgccc aagaattcag aaccagagga ggtcatccca tcccggctgg 540
atatccgtgt ggggaaaatc atcactgtgg agaagcaccg agatgcagac agcctgtatg 600
tagagaagat tgacgtgggg gaagctgaac cacggactgt ggtgagcggc ctggtacagt 660
tcgtgcccaa ggaggaactg caggacagggc tggtagtggg gctgtgcaac ctgaaacccc 720
agaagatgag aggagtcgag tccaaggca tgcttctgtg tgcttctata gaagggataa 780
accgccaggt tgaacctctg gacctccggc caggctctgc tcctggtgag cacgtgtttg 840
tgaagggcta tgaaaagggc caaccagatg aggagctcaa gccaagaag aaagtcttcg 900
agaagtgcga ggctgacttc aaaatctctg aggagtgcac cgacagtgga aagcaaacca 960
acttcatgac caagctgggc tccatttctt gtaaatcgct gaaagggggg aacattagct 1020
agccagccca gcatcttccc cccttcttcc accactgagt catctgctgt ctcttcagtc 1080
tgctccatcc atcacccatt taccatctc tcaggacacg gaagcagcgg gtttgactc 1140
tttattcggg gcagaactcg gcaaggggca gcttaccctc cccagaacctc aggatcatcc 1200
tgtctggctg cagtgcagaga ccaaccccta acaagggtcg ggccacagca gggagtccag 1260
ccctaccttc ttcccttggc agctggagaa atctggtttc aatataactc atttaaaaat 1320
ttatgccaca gtccttataa ttggaaaaat actggtgccc aggttttctt ggagttatcc 1380
aagcagctgc gccctagct gggtatctggg acctggacta ggctaattac agcttctccc 1440
caacaggaaa ctgtgggatt tgaaaaggaa aggggaaggga aaacagagaa cctagtggtc 1500
taccaagtgg ttggcaactt tccaatgtc tgcttactct gaggcttggc actggggggc 1560
agggcctgcc ccagggtccc tggaatttcc cttgatccag ctaggctggg acactcccta 1620
aatcagctgc gtgttgtag catcaggcag aatgaatggc agagagtgat tctgtcttca 1680
tagagggtgg ggtacttctc cataaggcat ctcagtcaaa tccccatcac tgtcat 1736

```

<210> 12

<211> 179

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

```

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

```

<210> 13

<211> 1167

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 13

```

atgggggacg ctccagccc tgaagagaaa ctgcacctta tcacccggaa cctgcaggag 60
gttctggggg aagagaagct gaaggagata ctgaaggagc ggaacttaa aatttactgg 120
ggaacggcaa ccacgggcaa accacatgtg gcttactttg tgcccatgtc aaagattgca 180
gacttcttaa aggcagggtg tgaggtaaca attctgtttg cggacctcca cgcataacctg 240
gataacatga aagcccatg ggaacttcta gaactccgag tcagttacta tgagaatgtg 300
atcaaagcaa tgctggagag cattggtgtg cccttggaga agctcaagtt catcaaaggc 360
actgattacc agctcagcaa agagtacaca ctagatgtgt acagactctc ctccgtgggtc 420
acacagcacg attccaagaa ggctggagct gaggtggtaa agcaggtgga gcaccctttg 480
ctgagtggcc tcttatacc cggactgcag gctttggatg aagagtattt aaaagtagat 540
gcccaatttg gaggcattga tcagagaaag attttcacct ttgcagagaa gtacctccct 600
gcacttggct attcaaaacg ggtccatctg atgaatccta tggttccagg attaacaggc 660
agcaaaatga gctcttcaga agaggagtcc aagattgatc tccttgatcg gaaggaggat 720
gtgaagaaaa aactgaagaa ggccttctgt gagccaggaa atgtggagaa caatggggtt 780
ctgtccttca tcaagcatgt cctttttccc ctttaagtcc agtttgtgat cctacgagat 840
gagaaatggg gtggaacaaa aacctacaca gcttacgtgg acctggaaaa ggactttgct 900
gctgaggttg tacatcctgg agacctgaag aattctgttg aagtcgcact gaacaagttg 960
ctggatccaa tccgggaaaa gtttaatacc cctgccctga aaaaactggc cagcgctgcc 1020
taccagatc tcccaaagca gaagccaatg gccaaaggcc tgccaagaat tcagaaccag 1080
aggaggtcat cccatcccgg ctggatatcc gtgtggggaa aatcatcact gtggagaagc 1140
accagatgc agacagcctg tatgtag 1167

```

<210> 14

<211> 188

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANTE

10 <222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8

<223> Xaa = Cualquier Aminoácido

<400> 14

```

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

```

<210> 15

<211> 2262

20 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 15

```

gccagacaca gtggctcaca cctgtaatct taacactttg gaaggctgag gcaggcggat 60
cacttgagcc caaaagttag agaccaaacc ccagtctcta cccaaaaaaa aaaaaaaaaa 120
aaaaattagc caggcatagt agcacatgcc tgtagtccca gctacttggg aggctgaggt 180
gagaggatca cctgagcatg ggaagttaga gactgcagtg agccatgac gcaccactgc 240
actccagcct gggcaacaga gtgagactct atgtctcaaa aaaagaaaaa tgatagaaat 300
tagattagac ctattatacc caaccggtat atagggtatc gatagtttct tacacagctg 360
ttgggcagag cctgcagagc tttagagaagc ttatctttag attctcccag tttccttcta 420
tgtgcatggg cctggctcct agttggccat ccacttgtgc gtaatgctaa gatattggca 480
ttgatagctt tgtgcgaccc ttccagaaaa aaactcagta actcagtaaa attttttttt 540
ttttttctaa aagagacaga gtctggctct gttgccagc ctggctctga agtcctgggc 600
ttaagcaatc ctcccgctct agcctcccaa agtgctagaa ttacagggtg gagctaccac 660
acctggccaa gactcagtaa attctatgtg gaatgcatga atggaaatac ctaaaggagg 720
caaagctact actgctccct ccccgctagt ctaataattg agggagagaa cagatgaaaa 780
tcaggtatgt catgtctgaa aggttgccaa ccaggtatta aagaagttac aactcagttg 840
ttagactctg gggattctac actaaatctt acctaactct agtgtcttaa cgtggtggga 900
tcagcagctg acctgccaca ggaagaattt ctacctcatg ggttcttctt cattcccaga 960
gccaatggcc aaaggccctg ccaagaattc agaaccagag gaggtcatcc catcccggct 1020
ggatatccgt gtggggaaaa tcatcactgt ggagaagcac ccagatgcag acagcctgta 1080
ttagagaag attgacgtgg ggaagctga accacggact gtggtgagcg gcctggtaca 1140
gttcgtgccc aaggaggaac tgcaggacag gctggtagtg gtgctgtgca acctgaaacc 1200
ccagaagatg agaggagtgc agtcccaagg catgcttctg tgtgcttcta tagaagggat 1260
aaacgcccag gttgaacctc tggaccctcc ggcaggctct gctcctggtg agcacgtgtt 1320
tgtgaaggcg tatgaaaagg gccaaccaga tgaggagctc aagcccaaga agaaagtctt 1380
cgagaagttg caggctgact tcaaaatttc tgaggagtgc atcgcacagt ggaagcaaac 1440
caacttcatg accaagctgg gctccatttc ctgtaaatcg ctgaaagggg ggaacattag 1500
ctagccagcc cagcatcttc ccccttctt ccaccactga gtcactctgt gtctcttcag 1560
tctgctccat ccatcaccca ttaccctatc tctcaggaca cggaagcagc ggttttggac 1620
tctttattcg gtgcagaact cggcaagggg cagcttacc cccccagaa ccaggatcat 1680
cctgtctggc tgcagtgaga gaccaacccc taacaagggc tgggccacag caggaggtcc 1740
agccctacct tcttcccttg gcagctggag aaatctgggt tcaatataac tcatttaaaa 1800
atttatgcca cagtcttat aattggaaaa atactggtgc ccaggtttct ttggagttat 1860
ccaagcagct gcgcccctag ctgggatctg gtacctggac taggctaatt acagcttctc 1920
cccaacagga aactgtggga tttgaaaagg aaagggaagg gaaaacagag aacctagtgg 1980
tctaccaagt ggttggaac tttcccaatg tctgcttact ctgaggcttg gcactggggg 2040
ccagggcctg cccagggtc cctggaattt cccttgatcc agctaggctg ggacactccc 2100
taaatcagct gcgtgttgtt agcatcaggc agaataatg gcagagagtg attctgtctt 2160
catagagggg ggggtacttc tccataaggc atctcagtc aatccccatc actgtcataa 2220
attcaaataa aatgtctgaa caagggaaaa aaaaaaaaaa aa 2262

```

<210> 16
 <211> 685
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16

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
	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
Lys Cys Ser Val Leu Pro Leu Ser Gln Asn Gln Glu Phe Met Pro Phe				560
		565		570
Val Lys Glu Leu Ser Glu Ala Leu Thr Arg His Gly Val Ser His Lys				575
		580		585
Val Asp Asp Ser Ser Gly Ser Ile Gly Arg Arg Tyr Ala Arg Thr Asp				590
		595		600
Glu Ile Gly Val Ala Phe Gly Val Thr Ile Asp Phe Asp Thr Val Asn				605
		610		615
Lys Thr Pro His Thr Ala Thr Leu Arg Asp Arg Asp Ser Met Arg Gln				620
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> 17
 <211> 2058
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 17

```

atggacggcg cgggggctga ggaggtgctg gcacctctga ggctagcagt ggcgcagcag 60
ggagatcttg tgcgaaaact caaagaagat aaagcacccc aagtagacgt agacaaaagca 120
gtggctgagc tcaaaagccg caagagggtt ctggaagcaa aggagctggc gttacagccc 180
aaagatgata ttgtagaccg agcaaaaatg gaagatcccc tgaagaggag gtttttctat 240
gatcaagctt ttgctattta tggaggtgtt agtggctctg atgactttgg gccagttggc 300
tgtgctttga agaacaatat tattcagacc tggaggcagc actttatcca agaggaacag 360
atcctggaga tcgattgcac catgctcacc cctgagccag ttttaagac ctctggccat 420
gtagacaaat ttgctgactt catggtgaaa gacgtaaaaa atggagaatg ttttcgtgct 480
gaccatctat taaaagctca tttacagaaa ttgatgtctg ataagaagtg ttctgtcgaa 540
aagaaatcag aaatggaaaag tgttttggcc cagcttgata actatggaca gcaagaactt 600
gcggatcttt ttgtgaacta taatgtaaaa tctccatta ctggaatga tctatcccct 660
ccagtgtctt ttaacttaat gttcaagact ttcattgggc ctggaggaaa catgcctggg 720
tacttgagac cagaaactgc acaggggatt ttcttgaatt tcaaacgact tttggagttc 780
aaccaaggaa agttgccttt tgctgctgcc cagattggaa attcttttag aaatgagatc 840
tcccctcgat ctggactgat cagagtcaga gaattcaca tggcagaaat tgagcacttt 900
gtagatcca gtagaaga ccacccaag ttccagaatg tggcagacct tcacctttat 960
ttgtattcag caaaagccca ggtcagcgga cagtccgctc ggaaaatgcg cctgggagat 1020
gctgttgaa cagggtgtgat taataacaca gtattaggct atttcattgg ccgcatctac 1080
ctctacctca cgaaggttgg aatatctcca gataaactcc gcttcgggca gcacatggag 1140
aatgagatgg cccattatgc ctgtgactgt tgggatgcag aatccaaaac atcctacggt 1200
tggattgaga ttgttgatg tgctgatcgt tcctgttatg acctctcctg tcatgcacga 1260
gccaccaaag tcccacttgt agctgagaaa cctctgaaag aacccaaaac agtcaatgtt 1320
gttcagtttg aacccagtaa gggagcaatt ggtaaggcat ataagaagga tgcaaaactg 1380
gtgatggagt atcttgccat ttgtgatgag tgctacatta cagaaatgga gatgctgctg 1440
aatgagaaa ggggaattcac aattgaaact gaagggaaaa catttcagtt aacaaaagac 1500
atgatcaatg tgaagagatt ccagaaaaca ctatatgtgg aagaagttgt tccgaatgta 1560
attgaacctt ccttcggcct gggtaggatc atgtatacgg tatttgaaca tacattccat 1620
gtacgagaag gagatgaaca gagaacattc ttcagtttcc ctgctgtagt tgctccattc 1680
aaatgttccg tcctcccact gagccaaaac caggagttca tgccatttgt caaggaatta 1740
tcggaagccc tgaccaggca tggagtatct cacaaagtag acgattcctc tgggtcaatc 1800
ggaaggcgct atgccaggac tgatgagatt ggcgtggctt ttggtgtcac cattgacttt 1860
gacacagtga acaagacccc ccacactgca actctgaggg accgtgactc aatgcggcag 1920
ataagagcag agatctctga gctgcccagc atagtccaag acctagccaa tggcaacatc 1980
acatgggctg atgtggaggc caggtatcct ctgtttgaag ggcaagagac tggtaaaaaa 2040
gagacaatcg aggaatga                                     2058
    
```

<210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Pro Gly Tyr Leu Arg Pro Glu Thr Ala Gln Gly Ile Phe Leu Asn Phe
1 5 10 15
Lys
 <210> 19
 <211> 16
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 19
Thr Gly Asn Asp Leu Ser Pro Pro Val Ser Phe Asn Leu Met Phe Lys
 10 **1 5 10 15**
 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 20
Asn Val Val Gln Phe Glu Pro Ser Lys
 20 **1 5**
 <210> 21
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 21
Leu Tyr Val Glu Glu Val Val Pro Asn Val Ile Glu Pro Ser Phe Gly
1 5 10 15
Leu Gly Arg
 30 <210> 22
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 22
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> 23
 40 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23
 45 **Gln His Phe Ile Gln Glu Glu Gln Ile Leu Glu Ile Asp Cys Thr**
1 5 10 15
 <210> 24
 50 <400> 24
 000
 <210> 25
 55 <211> 775
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25

```

Met Ala Ala Leu Asp Ser Leu Ser Leu Phe Thr Ser Leu Gly Leu Ser
 1      5      10      15
Glu Gln Lys Ala Arg Glu Thr Leu Lys Asn Ser Ala Leu Ser Ala Gln
 20      25      30
Leu Arg Glu Ala Ala Thr Gln Ala Gln Gln Thr Leu Gly Ser Thr Ile
 35      40      45
Asp Lys Ala Thr Gly Ile Leu Leu Tyr Gly Leu Ala Ser Arg Leu Arg
 50      55      60
Asp Thr Arg Arg Leu Ser Phe Leu Val Ser Tyr Ile Ala Ser Lys Lys
 65      70      75      80
Ile His Thr Glu Pro Gln Leu Ser Ala Ala Leu Glu Tyr Val Arg Ser
 85      90      95
His Pro Leu Asp Pro Ile Asp Thr Val Asp Phe Glu Arg Glu Cys Gly
100     105     110
Val Gly Val Ile Val Thr Pro Glu Gln Ile Glu Glu Ala Val Glu Ala
115     120     125
Ala Ile Asn Arg His Arg Pro Gln Leu Leu Val Glu Arg Tyr His Phe
130     135     140
Asn Met Gly Leu Leu Met Gly Glu Ala Arg Ala Val Leu Lys Trp Ala
145     150     155     160
Asp Gly Lys Met Ile Lys Asn Glu Val Asp Met Gln Val Leu His Leu
165     170     175
Leu Gly Pro Lys Leu Glu Ala Asp Leu Glu Lys Lys Phe Lys Val Ala
180     185     190
Lys Ala Arg Leu Glu Glu Thr Asp Arg Arg Thr Ala Lys Asp Val Val
195     200     205
Glu Asn Gly Glu Thr Ala Asp Gln Thr Leu Ser Leu Met Glu Gln Leu
210     215     220
Arg Gly Glu Ala Leu Lys Phe His Lys Pro Gly Glu Asn Tyr Lys Thr
225     230     235     240
Pro Gly Tyr Val Val Thr Pro His Thr Met Asn Leu Leu Lys Gln His
245     250     255
Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gln Val Arg Thr Arg Phe Pro Pro Glu Pro
260     265     270
Asn Gly Ile Leu His Ile Gly His Ala Lys Ala Ile Asn Phe Asn Phe
275     280     285
Gly Tyr Ala Lys Ala Asn Asn Gly Ile Cys Phe Leu Arg Phe Asp Asp
290     295     300
Thr Asn Pro Glu Lys Glu Glu Ala Lys Phe Phe Thr Ala Ile Cys Asp
305     310     315     320
Met Val Ala Trp Leu Gly Tyr Thr Pro Tyr Lys Val Thr Tyr Ala Ser
325     330     335
Asp Tyr Phe Asp Gln Leu Tyr Ala Trp Ala Val Glu Leu Ile Arg Arg
340     345     350
Gly Leu Ala Tyr Val Cys His Gln Arg Gly Glu Glu Leu Lys Gly His
355     360     365
Asn Thr Leu Pro Ser Pro Trp Arg Asp Arg Pro Met Glu Glu Ser Leu
370     375     380
Leu Leu Phe Glu Ala Met Arg Lys Gly Lys Phe Ser Glu Gly Glu Ala
385     390     395     400
Thr Leu Arg Met Lys Leu Val Met Glu Asp Gly Lys Met Asp Pro Val
405     410     415
Ala Tyr Arg Val Lys Tyr Thr Pro His His Arg Thr Gly Asp Lys Trp
420     425     430
Cys Ile Tyr Pro Thr Tyr Asp Tyr Thr His Cys Leu Cys Asp Ser Ile

```

	435		440		445										
Glu	His	Ile	Thr	His	Ser	Leu	Cys	Thr	Lys	Glu	Phe	Gln	Ala	Arg	Arg
	450					455					460				
Ser	Ser	Tyr	Phe	Trp	Leu	Cys	Asn	Ala	Leu	Asp	Val	Tyr	Cys	Pro	Val
465					470					475					480
Gln	Trp	Glu	Tyr	Gly	Arg	Leu	Asn	Leu	His	Tyr	Ala	Val	Val	Ser	Lys
				485					490					495	
Arg	Lys	Ile	Leu	Gln	Leu	Val	Ala	Thr	Gly	Ala	Val	Arg	Asp	Trp	Asp
			500					505				510			
Asp	Pro	Arg	Leu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ala	Leu	Arg	Arg	Arg	Gly	Phe	Pro
		515					520					525			
Pro	Glu	Ala	Ile	Asn	Asn	Phe	Cys	Ala	Arg	Val	Gly	Val	Thr	Val	Ala
	530					535					540				
Gln	Thr	Thr	Met	Glu	Pro	His	Leu	Leu	Glu	Ala	Cys	Val	Arg	Asp	Val
545					550				555						560
Leu	Asn	Asp	Thr	Ala	Pro	Arg	Ala	Met	Ala	Val	Leu	Glu	Ser	Leu	Arg
				565					570					575	
Val	Ile	Ile	Thr	Asn	Phe	Pro	Ala	Ala	Lys	Ser	Leu	Asp	Ile	Gln	Val
			580					585					590		
Pro	Asn	Phe	Pro	Ala	Asp	Glu	Thr	Lys	Gly	Phe	His	Gln	Val	Pro	Phe
	595						600					605			
Ala	Pro	Ile	Val	Phe	Ile	Glu	Arg	Thr	Asp	Phe	Lys	Glu	Glu	Pro	Glu
	610					615					620				
Pro	Gly	Phe	Lys	Arg	Leu	Ala	Trp	Gly	Gln	Pro	Val	Gly	Leu	Arg	His
625					630				635						640
Thr	Gly	Tyr	Val	Ile	Glu	Leu	Gln	His	Val	Val	Lys	Gly	Pro	Ser	Gly
				645					650					655	
Cys	Val	Glu	Ser	Leu	Glu	Val	Thr	Cys	Arg	Arg	Ala	Asp	Ala	Gly	Glu
		660					665					670			
Lys	Pro	Lys	Ala	Phe	Ile	His	Trp	Val	Ser	Gln	Pro	Leu	Met	Cys	Glu
	675						680					685			
Val	Arg	Leu	Tyr	Glu	Arg	Leu	Phe	Gln	His	Lys	Asn	Pro	Glu	Asp	Pro
	690					695					700				
Thr	Glu	Val	Pro	Gly	Gly	Phe	Leu	Ser	Asp	Leu	Asn	Leu	Ala	Ser	Leu
705					710					715					720
His	Val	Val	Asp	Ala	Ala	Leu	Val	Asp	Cys	Ser	Val	Ala	Leu	Ala	Lys
				725					730					735	
Pro	Phe	Asp	Lys	Phe	Gln	Phe	Glu	Arg	Leu	Gly	Tyr	Phe	Ser	Val	Asp
		740					745					750			
Pro	Asp	Ser	His	Gln	Gly	Lys	Leu	Val	Phe	Asn	Arg	Thr	Val	Thr	Leu
	755					760						765			
Lys	Glu	Asp	Pro	Gly	Lys	Val									
	770					775									

<210> 26
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26

Asp	Val	Val	Glu	Asn	Gly	Glu	Thr	Ala	Asp	Gln	Thr	Leu	Ser	Leu
1				5					10					15

<210> 27
 <211> 10
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

<400> 27

Thr	Pro	Gly	Tyr	Val	Val	Thr	Pro	His	Thr
1				5					10

<210> 28
 <211> 509
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28

Met	Ala	Glu	Arg	Ala	Ala	Leu	Glu	Glu	Leu	Val	Lys	Leu	Gln	Gly	Glu
1				5					10					15	
Arg	Val	Arg	Gly	Leu	Lys	Gln	Gln	Lys	Ala	Ser	Ala	Glu	Leu	Ile	Glu
			20					25					30		
Glu	Glu	Val	Ala	Lys	Leu	Leu	Lys	Leu	Lys	Ala	Gln	Leu	Gly	Pro	Asp
		35					40					45			
Glu	Ser	Lys	Gln	Lys	Phe	Val	Leu	Lys	Thr	Pro	Lys	Gly	Thr	Arg	Asp
	50				55					60					
Tyr	Ser	Pro	Arg	Gln	Met	Ala	Val	Arg	Glu	Lys	Val	Phe	Asp	Val	Ile
65				70					75						80
Ile	Arg	Cys	Phe	Lys	Arg	His	Gly	Ala	Glu	Val	Ile	Asp	Thr	Pro	Val
			85					90					95		
Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Lys	Tyr	Gly	Glu	Asp	Ser	Lys
			100					105					110		
Leu	Ile	Tyr	Asp	Leu	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Arg
		115					120					125			
Tyr	Asp	Leu	Thr	Val	Pro	Phe	Ala	Arg	Tyr	Leu	Ala	Met	Asn	Lys	Leu
	130					135				140					
Thr	Asn	Ile	Lys	Arg	Tyr	His	Ile	Ala	Lys	Val	Tyr	Arg	Arg	Asp	Asn
145				150						155					160
Pro	Ala	Met	Thr	Arg	Gly	Arg	Tyr	Arg	Glu	Phe	Tyr	Gln	Cys	Asp	Phe
				165					170					175	
Asp	Ile	Ala	Gly	Asn	Phe	Asp	Pro	Met	Ile	Pro	Asp	Ala	Glu	Cys	Leu
		180						185					190		
Lys	Ile	Met	Cys	Glu	Ile	Leu	Ser	Ser	Leu	Gln	Ile	Gly	Asp	Phe	Leu
		195					200					205			
Val	Lys	Val	Asn	Asp	Arg	Arg	Ile	Leu	Asp	Gly	Met	Phe	Ala	Ile	Cys
	210					215					220				
Gly	Val	Ser	Asp	Ser	Lys	Phe	Arg	Thr	Ile	Cys	Ser	Ser	Val	Asp	Lys
225					230					235					240
Leu	Asp	Lys	Val	Ser	Trp	Glu	Glu	Val	Lys	Asn	Glu	Met	Val	Gly	Glu
				245					250					255	
Lys	Gly	Leu	Ala	Pro	Glu	Val	Ala	Asp	Arg	Ile	Gly	Asp	Tyr	Val	Gln
		260						265					270		
Gln	His	Gly	Gly	Val	Ser	Leu	Val	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln	Asp	Pro	Lys
		275					280					285			
Leu	Ser	Gln	Asn	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	Leu	Gly	Asp	Leu	Lys	Leu
	290					295					300				
Leu	Phe	Glu	Tyr	Leu	Thr	Leu	Phe	Gly	Ile	Asp	Asp	Lys	Ile	Ser	Phe
305					310					315					320
Asp	Leu	Ser	Leu	Ala	Arg	Gly	Leu	Asp	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Val	Ile	Tyr
				325					330					335	
Glu	Ala	Val	Leu	Gln	Thr	Pro	Ala	Gln	Ala	Gly	Glu	Glu	Pro	Leu	
			340				345					350			
Gly	Val	Gly	Ser	Val	Ala	Ala	Gly	Gly	Arg	Tyr	Asp	Gly	Leu	Val	Gly
		355					360					365			
Met	Phe	Asp	Pro	Lys	Gly	Arg	Lys	Val	Pro	Cys	Val	Gly	Leu	Ser	Ile
	370					375					380				
Gly	Val	Glu	Arg	Ile	Phe	Ser	Ile	Val	Glu	Gln	Arg	Leu	Glu	Ala	Leu
385					390					395					400
Glu	Glu	Lys	Ile	Arg	Thr	Thr	Glu	Thr	Gln	Val	Leu	Val	Ala	Ser	Ala
				405					410					415	
Gln	Lys	Lys	Leu	Leu	Glu	Glu	Arg	Leu	Lys	Leu	Val	Ser	Glu	Leu	Trp
			420					425					430		
Asp	Ala	Gly	Ile	Lys	Ala	Glu	Leu	Leu	Tyr	Lys	Lys	Asn	Pro	Lys	Leu
		435					440					445			
Leu	Asn	Gln	Leu	Gln	Tyr	Cys	Glu	Glu	Ala	Gly	Ile	Pro	Leu	Val	Ala
	450					455					460				
Ile	Ile	Gly	Glu	Gln	Glu	Leu	Lys	Asp	Gly	Val	Ile	Lys	Leu	Arg	Ser
465					470					475					480
Val	Thr	Ser	Arg	Glu	Glu	Val	Asp	Val	Arg	Arg	Glu	Asp	Leu	Val	Glu
				485					490					495	
Glu	Ile	Lys	Arg	Arg	Thr	Gly	Gln	Pro	Leu	Cys	Ile	Cys			
			500					505							

<210> 29
 5 <211> 183
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 29

atggcagagc gtgctggcgt ggaggagctg gtgaaacttc agggagagcg cgtgctgagc 60
ctcaagcagc agaagggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120
ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc aaacagaaat ttgtgctcaa aacccccaaag 180
tag 183

<210> 30
<211> 60
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

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

<210> 31
<211> 516
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 31

atggcagagc gtgctggcgt ggaggagctg gtgaaacttc agggagagcg cgtgctgagc 60
ctcaagcagc agaagggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120
ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc aaacagaaat ttgtgctcaa aacccccaaag 180
gctttggagg agaagatacg gaccacggag acacaggtgc ttgtggcatc tgcacagaag 240
aagctgctag aggaaagact aaagcttctc tcagaactgt gggatgctgg gatcaaggct 300
gagctgctgt acaagaagaa cccaaagcta ctgaaccagt tacagtactg tgaggaggca 360
ggcatcccac tgggtggctat catcggcgag caggaactca aggatggggt catcaagctc 420
cgttcagtga cgagcaggga agaggtggat gtccgaagag aagaccttgt ggaggaaatc 480
aaaaggagaa caggccagcc cctctgcatc tgctga 516

<210> 32
<211> 171
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

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

<210> 33
<211> 471

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33

5

```

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

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

```

10 <210> 34
 <211> 379
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34

```

Met Ser Ala Lys Gly Ile Asp Tyr Asp Lys Leu Ile Val Arg Phe Gly
 1      5      10      15
Ser Ser Lys Ile Asp Lys Glu Leu Ile Asn Arg Ile Glu Arg Ala Thr
 20      25      30
Gly Gln Arg Pro His His Phe Leu Arg Arg Gly Ile Phe Phe Ser His
 35      40      45
Arg Asp Met Asn Gln Val Leu Asp Ala Tyr Glu Asn Lys Lys Pro Phe
 50      55      60
Tyr Leu Tyr Thr Gly Arg Gly Pro Ser Ser Glu Ala Met His Val Gly
 65      70      75      80
His Leu Ile Pro Phe Ile Phe Thr Lys Trp Leu Gln Asp Val Phe Asn
 85      90      95
Val Pro Leu Val Ile Gln Met Thr Asp Asp Glu Lys Tyr Leu Trp Lys
100      105      110
Asp Leu Thr Leu Asp Gln Ala Tyr Ser Tyr Ala Val Glu Asn Ala Lys
115      120      125
Asp Ile Ile Ala Cys Gly Phe Asp Ile Asn Lys Thr Phe Ile Phe Ser
130      135      140
Asp Leu Asp Tyr Met Gly Met Ser Ser Gly Phe Tyr Lys Asn Val Val
145      150      155      160
Lys Ile Gln Lys His Val Thr Phe Asn Gln Val Lys Gly Ile Phe Gly
165      170      175
Phe Thr Asp Ser Asp Cys Ile Gly Lys Ile Ser Phe Pro Ala Ile Gln
180      185      190
Ala Ala Pro Ser Phe Ser Asn Ser Phe Pro Gln Ile Phe Arg Asp Arg
195      200      205
Thr Asp Ile Gln Cys Leu Ile Pro Cys Ala Ile Asp Gln Asp Pro Tyr
210      215      220
Phe Arg Met Thr Arg Asp Val Ala Pro Arg Ile Gly Tyr Pro Lys Pro
225      230      235      240
Ala Leu Leu His Ser Thr Phe Phe Pro Ala Leu Gln Gly Ala Gln Thr
245      250      255
Lys Met Ser Ala Ser Asp Pro Asn Ser Ser Ile Phe Leu Thr Asp Thr
260      265      270
Ala Lys Gln Ile Lys Thr Lys Val Asn Lys His Ala Phe Ser Gly Gly
275      280      285
Arg Asp Thr Ile Glu Glu His Arg Gln Phe Gly Gly Asn Cys Asp Val
290      295      300
Asp Val Ser Phe Met Tyr Leu Thr Phe Phe Leu Glu Asp Asp Asp Lys
305      310      315      320
Leu Glu Gln Ile Arg Lys Asp Tyr Thr Ser Gly Ala Met Leu Thr Gly
325      330      335
Glu Leu Lys Lys Ala Leu Ile Glu Val Leu Gln Pro Leu Ile Ala Glu
340      345      350
His Gln Ala Arg Arg Lys Glu Val Thr Asp Glu Ile Val Lys Glu Phe
355      360      365
Met Thr Pro Arg Lys Leu Ser Phe Asp Phe Gln
370      375

```

5

<210> 35
 <211> 424
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 35

```

Met Ser Tyr Lys Ala Ala Ala Gly Glu Asp Tyr Lys Ala Asp Cys Pro
 1      5      10      15
Pro Gly Asn Pro Ala Pro Thr Ser Asn His Gly Pro Asp Ala Thr Glu
      20      25      30
Ala Glu Glu Asp Phe Val Asp Pro Trp Thr Val Gln Thr Ser Ser Ala
      35      40      45
Lys Gly Ile Asp Tyr Asp Lys Leu Ile Val Arg Phe Gly Ser Ser Lys
      50      55      60
Ile Asp Lys Glu Leu Ile Asn Arg Ile Glu Arg Ala Thr Gly Gln Arg
65      70      75      80
Pro His His Phe Leu Arg Arg Gly Ile Phe Phe Ser His Arg Asp Met
      85      90      95
Asn Gln Val Leu Asp Ala Tyr Glu Asn Lys Lys Pro Phe Tyr Leu Tyr
      100      105      110
Thr Gly Arg Gly Pro Ser Ser Glu Ala Met His Val Gly His Leu Ile
      115      120      125
Pro Phe Ile Phe Thr Lys Trp Leu Gln Asp Val Phe Asn Val Pro Leu
130      135      140
Val Ile Gln Met Thr Asp Asp Glu Lys Tyr Leu Trp Lys Asp Leu Thr
145      150      155      160
Leu Asp Gln Ala Tyr Ser Tyr Ala Val Glu Asn Ala Lys Asp Ile Ile
      165      170      175
Ala Cys Gly Phe Asp Ile Asn Lys Thr Phe Ile Phe Ser Asp Leu Asp
      180      185      190
Tyr Met Gly Met Ser Ser Gly Phe Tyr Lys Asn Val Val Lys Ile Gln
      195      200      205
Lys His Val Thr Phe Asn Gln Val Lys Gly Ile Phe Gly Phe Thr Asp
210      215      220
Ser Asp Cys Ile Gly Lys Ile Ser Phe Pro Ala Ile Gln Ala Ala Pro
225      230      235      240
Ser Phe Ser Asn Ser Phe Pro Gln Ile Phe Arg Asp Arg Thr Asp Ile
      245      250      255
Gln Cys Leu Ile Pro Cys Ala Ile Asp Gln Asp Pro Tyr Phe Arg Met
260      265      270
Thr Arg Asp Val Ala Pro Arg Ile Gly Tyr Pro Lys Pro Ala Leu Leu
275      280      285
His Ser Thr Phe Phe Pro Ala Leu Gln Gly Ala Gln Thr Lys Met Ser
290      295      300
Ala Ser Asp Pro Asn Ser Ser Ile Phe Leu Thr Asp Thr Ala Lys Gln
305      310      315      320
Ile Lys Thr Lys Val Asn Lys His Ala Phe Ser Gly Gly Arg Asp Thr
      325      330      335
Ile Glu Glu His Arg Gln Phe Gly Gly Asn Cys Asp Val Asp Val Ser
340      345      350
Phe Met Tyr Leu Thr Phe Phe Leu Glu Asp Asp Asp Lys Leu Glu Gln
355      360      365
Ile Arg Lys Asp Tyr Thr Ser Gly Ala Met Leu Thr Gly Glu Leu Lys
370      375      380
Lys Ala Leu Ile Glu Val Leu Gln Pro Leu Ile Ala Glu His Gln Ala
385      390      395      400
Arg Arg Lys Glu Val Thr Asp Glu Ile Val Lys Glu Phe Met Thr Pro
      405      410      415
Arg Lys Leu Ser Phe Asp Phe Gln
      420

```

<210> 36
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 36

```

Glu Thr Leu Lys Asn Glu Ala Leu Ser Thr Gln Leu Arg
 1      5      10

```

<210> 37
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 37

Glu Ala Ala Thr Gln Ala His Gln Ile Leu Gly Ser Thr Ile Asp Lys
1 5 10 15
Ala Thr Gly Val Leu Leu Tyr Asp Leu Val Ser Arg
20 25

<210> 38
 <211> 41
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 38

Glu Thr Leu Lys Asn Glu Ala Leu Ser Thr Gln Leu Arg Glu Ala Ala
1 5 10 15
Thr Gln Ala His Gln Ile Leu Gly Ser Thr Ile Asp Lys Ala Thr Gly
20 25 30
Val Leu Leu Tyr Asp Leu Val Ser Arg
35 40

10
 <210> 39
 <211> 27
 <212> PRT
 15 <213> Mus musculus

<400> 39

Asp Phe Glu Gln Glu Cys Gly Val Gly Val Val Val Thr Pro Glu Gln
1 5 10 15
Ile Glu Glu Ala Val Glu Ser Thr Ile Asn Lys
20 25

20
 <210> 40
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 25 <400> 40

Phe Asn Met Gly Leu Leu Met Gly Glu Ala Arg
1 5 10

30 <210> 41
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

35 <400> 41

Met Ile Lys Asn Glu Val Asp Met Gln Val Leu His Leu Leu Gly Pro
1 5 10 15
Lys

40 <210> 42
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 42

45
Asn Glu Val Asp Met Gln Val Leu His Leu Leu Gly Pro Lys
1 5 10

50 <210> 43
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 43

Thr Pro Gly Tyr Val Ile Thr Pro Tyr Thr Met Asp Leu Leu Lys
1 5 10 15

5 <210> 44
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 44

Phe Asp Asp Thr Asn Pro Glu Lys Glu Glu Ala Lys
1 5 10

10 <210> 45
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> Mus musculus
 <400> 45

Val Glu Glu Leu Lys Gly His Asn Pro Leu Pro Ser Pro Trp Arg
1 5 10 15

20 <210> 46
 <211> 15
 <212> PRT
 25 <213> Mus musculus
 <400> 46

Asp Arg Pro Lys Glu Glu Ser Leu Leu Leu Phe Glu Ala Met Arg
1 5 10 15

30 <210> 47
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 35 <400> 47

Val Glu Glu Leu Lys Gly His Asn Pro Leu Pro Ser Pro Trp Arg Asp
1 5 10 15
Arg Pro Lys Glu Glu Ser Leu Leu Leu Phe Glu Ala Met Arg
20 25 30

40 <210> 48
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 48

Leu Val Met Glu Asp Gly Lys Met Asp Pro Val Ala Tyr Arg
1 5 10

45 <210> 49
 <211> 11
 50 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 49

Val Tyr Cys Pro Val Gln Trp Glu Tyr Gly Arg
1 5 10

55 <210> 50
 <211> 11

<212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 50

5 **Ile Leu Gln Leu Val Ala Ala Gly Ala Val Arg**
 1 5 10

<210> 51
 <211> 28
 10 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 51

Asp Val Leu Asn Asp Ala Ala Pro Arg Ala Met Ala Val Leu Glu Pro
 1 5 10 15
 15 **Leu Gln Val Val Ile Thr Asn Phe Pro Ala Pro Lys**
 20 25

<210> 52
 <211> 38
 20 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 52

Gly Phe His Gln Val Pro Phe Ala Ser Thr Val Phe Ile Glu Arg Ser
 1 5 10 15
 Asp Phe Lys Glu Ser Glu Pro Gly Tyr Lys Arg Leu Ala Ser Gly
 20 25 30
 Gln Pro Val Gly Leu Arg
 35

25 <210> 53
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

30 <400> 53

Ala Phe Ile His Trp Val Ser Gln Pro Leu Val Cys Glu Ile Arg
 1 5 10 15

35 <210> 54
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

40 <400> 54

Leu Gly Tyr Phe Ser Val Asp Pro Asp Ser His Gln Gly Gln Ile Val
 1 5 10 15
 Phe Asn Arg

45 <210> 55
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 55

50 **Thr Pro Gly Tyr Val Ile Thr Pro Tyr Thr Met Asp Leu Leu Lys**
 1 5 10 15

<210> 56
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 56

5 **Ala Ile Asn Phe Asn Phe Gly Tyr Ala Lys**
 1 5 10

<210> 57
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 57

15 **Phe Asp Asp Thr Asn Pro Glu Lys Glu Glu Ala Lys**
 1 5 10

<210> 58
 <211> 18
 20 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 58

25 **Phe Phe Thr Ala Ile Tyr Asp Met Val Thr Trp Leu Gly Tyr Thr Pro**
 1 5 10 15
 Tyr Lys

<210> 59
 <211> 30
 30 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 59

35 **Phe Asp Asp Thr Asn Pro Glu Lys Glu Glu Ala Lys Phe Phe Thr Ala**
 1 5 10 15
 Ile Tyr Asp Met Val Thr Trp Leu Gly Tyr Thr Pro Tyr Lys
 20 25 30

<210> 60
 <211> 15
 40 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 60

45 **Asp Arg Pro Lys Glu Glu Ser Leu Leu Leu Phe Glu Ala Met Arg**
 1 5 10 15

<210> 61
 <211> 11
 50 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 61

55 **Val Tyr Cys Pro Val Gln Trp Glu Tyr Gly Arg**
 1 5 10

<210> 62
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 62

Leu Asn Leu His Tyr Ala Val Val Ser Lys
1 5 10
 <210> 63
 <211> 21
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 63
Val Tyr Cys Pro Val Gln Trp Glu Tyr Gly Arg Leu Asn Leu His Tyr
1 5 10 15
Ala Val Val Ser Lys
 10 **20**
 <210> 64
 <211> 11
 <212> PRT
 15 <213> Mus musculus
 <400> 64
Ile Leu Gln Leu Val Ala Ala Gly Ala Val Arg
1 5 10
 20 <210> 65
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 25 <400> 65
Ala Met Ala Val Leu Glu Pro Leu Gln Val Val Ile Thr Asn Phe Pro
1 5 10 15
Ala Pro Lys
 30 <210> 66
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 35 <400> 66
Pro Leu Asp Ile Arg Val Pro Asn Phe Pro Ala Asp Glu Thr Lys
1 5 10 15
 40 <210> 67
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 67
 45 **Ala Met Ala Val Leu Glu Pro Leu Gln Val Val Ile Thr Asn Phe Pro**
1 5 10 15
Ala Pro Lys Pro Leu Asp Ile Arg Val Pro Asn Phe Pro Ala Asp Glu
20 25 30
Thr Lys
 50 <210> 68
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 68

Ser Asp Phe Lys Glu Glu Ser Glu Pro Gly Tyr Lys Arg Leu Ala Ser
1 5 10 15
Gly Gln Pro Val Gly Leu Arg His Thr Gly Tyr Val Ile Glu Leu Gln
20 25 30
Asn Ile Val Arg
35
 <210> 69
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 69
Ala Phe Ile His Trp Val Ser Gln Pro Leu Val Cys Glu Ile Arg
 10 **1 5 10 15**
 <210> 70
 <211> 19
 <212> PRT
 15 <213> Mus musculus
 <400> 70
Leu Gly Tyr Phe Ser Val Asp Pro Asp Ser His Gln Gly Gln Ile Val
 20 **1 5 10 15**
Phe Asn Arg
 <210> 71
 <211> 13
 25 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 71
Lys Ala Thr Gly Val Leu Leu Tyr Asp Leu Val Ser Arg
 30 **1 5 10**
 <210> 72
 <211> 10
 <212> PRT
 35 <213> Mus musculus
 <400> 72
Ser Phe Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys
 40 **1 5 10**
 <210> 73
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 45 <400> 73
Asp Phe Glu Gln Glu Cys Gly Val Gly Val Val Val Thr Pro Glu Gln
1 5 10 15
Ile Glu Glu Ala Val Glu Ser Thr Ile Asn Lys
20 25
 <211> 17
 50 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 74

Met Ile Lys Asn Glu Val Asp Met Gln Val Leu His Leu Leu Gly Pro
1 5 10 15
Lys
 5 <210> 75
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 75
Glu Ala Ala Thr Gln Ala His Gln Ile Leu Gly Ser Thr Ile Asp Lys
1 5 10 15
Ala Thr Gly Val Leu Leu Tyr Asp Leu Val Ser Arg
 10 20 25
 <210> 76
 <211> 13
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 76
Glu Thr Leu Lys Asn Ser Ala Leu Ser Ala Gln Leu Arg
1 5 10
 20 <210> 77
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 77
Glu Ala Ala Thr Gln Ala Gln Gln Thr Leu Gly Ser Thr Ile Asp Lys
1 5 10 15
Ala Thr Gly Ile Leu Leu Tyr Gly Leu Ala Ser Arg
 20 25
 30 <210> 78
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 78
Glu Thr Leu Lys Asn Ser Ala Leu Ser Ala Gln Leu Arg Glu Ala Ala
1 5 10 15
Thr Gln Ala Gln Thr Leu Gly Ser Thr Ile Asp Lys Ala Thr Gly
 20 25 30
Ile Leu Leu Tyr Gly Leu Ala Ser Arg
 35 40
 40 <210> 79
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 79
 45 **Asp Phe Glu Arg Glu Cys Gly Val Gly Val Ile Val Thr Pro Glu Gln**
1 5 10 15
Ile Glu Glu Ala Val Glu Ala Ala Ile Asn Arg
 20 25
 50 <210> 80
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 80

Thr Pro Gly Tyr Val Val Thr Pro His Thr Met Asn Leu Leu Lys
1 5 10 15

5 <210> 81
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 81

Gly Glu Glu Leu Lys Gly His Asn Thr Leu Pro Ser Pro Trp Arg
1 5 10 15

15 <210> 82
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 82

Asp Arg Pro Met Glu Glu Ser Leu Leu Leu Phe Glu Ala Met Arg
1 5 10 15

25 <210> 83
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 83

Gly Glu Glu Leu Lys Gly His Asn Thr Leu Pro Ser Pro Trp Arg Asp
1 5 10 15
Arg Pro Met Glu Glu Ser Leu Leu Leu Phe Glu Ala Met Arg
20 25 30

30 <210> 84
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 84

Ile Leu Gln Leu Val Ala Thr Gly Ala Val Arg
1 5 10

40 <210> 85
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 85

Asp Val Leu Asn Asp Thr Ala Pro Arg Ala Met Ala Val Leu Glu Ser
1 5 10 15
Leu Arg Val Ile Thr Asn Phe Pro Ala Ala Lys
20 25

50 <210> 86
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55 <400> 86

Gly Phe His Gln Val Pro Phe Ala Pro Ile Val Phe Ile Glu Arg Thr
1 5 10 15
Asp Phe Lys Glu Glu Pro Glu Pro Gly Phe Lys Arg Leu Ala Trp Gly
20 25 30
Gln Pro Val Gly Leu Arg
35
 <210> 87
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 87
Ala Phe Ile His Trp Val Ser Gln Pro Leu Met Cys Glu Val Arg
 10 **1 5 10 15**
 <210> 88
 <211> 19
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 88
Leu Gly Tyr Phe Ser Val Asp Pro Asp Ser His Gln Gly Lys Leu Val
1 5 10 15
Phe Asn Arg
 20 <210> 89
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 89
Thr Pro Gly Tyr Val Val Thr Pro His Thr Met Asn Leu Leu Lys
1 5 10 15
 30 <210> 90
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 90
Phe Phe Thr Ala Ile Cys Asp Met Val Ala Trp Leu Gly Tyr Thr Pro
1 5 10 15
Tyr Lys
 40 <210> 91
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 91
 45 **Phe Asp Asp Thr Asn Pro Glu Lys Glu Glu Ala Lys Phe Phe Thr Ala**
1 5 10 15
Ile Tyr Asp Met Val Thr Trp Leu Gly Tyr Thr Pro Tyr Lys
20 25 30
 <210> 92
 <211> 15
 50 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 92

ES 2 535 951 T3

Asp Arg Pro Met Glu Glu Ser Leu Leu Leu Phe Glu Ala Met Arg
1 5 10 15
 <210> 93
 <211> 11
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 93
Ile Leu Gln Leu Val Ala Thr Gly Ala Val Arg
 10 **1 5 10**
 <210> 94
 <211> 19
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 94
Ala Met Ala Val Leu Glu Ser Leu Arg Val Ile Ile Thr Asn Phe Pro
1 5 10 15
Ala Ala Lys
 20 <210> 95
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 95
Ser Leu Asp Ile Gln Val Pro Asn Phe Pro Ala Asp Glu Thr Lys
1 5 10 15
 30 <210> 96
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 96
Ala Met Ala Val Leu Glu Ser Leu Arg Val Ile Ile Thr Asn Phe Pro
1 5 10 15
Ala Ala Lys Ser Leu Asp Ile Gln Val Pro Asn Phe Pro Ala Asp Glu
20 25 30
Thr Lys
 40 <210> 97
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 97
 45 **Thr Asp Phe Lys Glu Glu Pro Glu Pro Gly Phe Lys Arg Leu Ala Trp**
1 5 10 15
Gly Gln Pro Val Gly Leu Arg His Thr Gly Tyr Val Ile Glu Leu Gln
20 25 30
His Val Val Lys
35
 50 <210> 98
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 98

Ala Phe Ile His Trp Val Ser Gln Pro Leu Met Cys Glu Val Arg
1 5 10 15

5 <210> 99
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 99

Leu Gly Tyr Phe Ser Val Asp Pro Asp Ser His Gln Gly Lys Leu Val
1 5 10 15

10 **Phe Asn Arg**
 <210> 100
 <211> 13
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 100

Lys Ala Thr Gly Ile Leu Leu Tyr Gly Leu Ala Ser Arg
1 5 10

20 <210> 101
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 101

Ser Phe Leu Val Ser Tyr Ile Ala Ser Lys
1 5 10

30 <210> 102
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 102

Asp Phe Glu Arg Glu Cys Gly Val Gly Val Ile Val Thr Pro Glu Gln
1 5 10 15
Ile Glu Glu Ala Val Glu Ala Ala Ile Asn Arg
20 25

40 <210> 103
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 103

45 **Glu Ala Ala Thr Gln Ala Gln Gln Thr Leu Gly Ser Thr Ile Asp Lys**
1 5 10 15
Ala Thr Gly Ile Leu Leu Tyr Gly Leu Ala Ser Arg
20 25

50 <210> 104
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 104

```

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

Ser Leu Ser Thr Asp His Gln His Arg Cys Val Trp Pro Ile Lys Lys
 50      55      60
Ala Ala Ser Tyr Gln Glu Lys Thr Gly Ala Ile Gln Cys Thr Val Glu
65      70      75      80
Gly Glu Ser Gly Thr Asn
      85

```

5 <210> 105
 <211> 501
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 105

```

Met Pro Ser Ala Ser Ala Ser Arg Lys Ser Gln Glu Lys Pro Arg Glu
 1      5      10      15
Ile Met Asp Ala Glu Asp Tyr Ala Lys Glu Arg Tyr Gly Ile Ser
      20      25      30
Ser Met Ile Gln Ser Gln Glu Lys Pro Asp Arg Val Leu Val Arg Val
      35      40      45
Arg Asp Leu Thr Ile Gln Lys Ala Asp Glu Val Val Trp Val Arg Ala
50      55      60
Arg Val His Thr Ser Arg Ala Lys Gly Lys Gln Cys Phe Leu Val Leu
65      70      75      80
Arg Gln Gln Gln Phe Asn Val Gln Ala Leu Val Ala Val Gly Asp His
      85      90      95
Ala Ser Lys Gln Met Val Lys Phe Ala Ala Asn Ile Asn Lys Glu Ser
100      105      110
Ile Val Asp Val Glu Gly Val Val Arg Lys Val Asn Gln Lys Ile Gly
115      120      125
Ser Cys Thr Gln Gln Asp Val Glu Leu His Val Gln Lys Ile Tyr Val
130      135      140
Ile Ser Leu Ala Glu Pro Arg Leu Pro Leu Gln Leu Asp Asp Ala Val
145      150      155      160
Arg Pro Glu Ala Glu Gly Glu Glu Glu Gly Arg Ala Thr Val Asn Gln
165      170      175
Asp Thr Arg Leu Asp Asn Arg Val Ile Asp Leu Arg Thr Ser Thr Ser
180      185      190
Gln Ala Val Phe Arg Leu Gln Ser Gly Ile Cys His Leu Phe Arg Glu
195      200      205
Thr Leu Ile Asn Lys Gly Phe Val Glu Ile Gln Thr Pro Lys Ile Ile
210      215      220
Ser Ala Ala Ser Glu Gly Gly Ala Asn Val Phe Thr Val Ser Tyr Phe
225      230      235      240
Lys Asn Asn Ala Tyr Leu Ala Gln Ser Pro Gln Leu Tyr Lys Gln Met
245      250      255
Cys Ile Cys Ala Asp Phe Glu Lys Val Phe Ser Ile Gly Pro Val Phe
260      265      270
Arg Ala Glu Asp Ser Asn Thr His Arg His Leu Thr Glu Phe Val Gly
275      280      285
Leu Asp Ile Glu Met Ala Phe Asn Tyr His Tyr His Glu Val Met Glu
290      295      300
Glu Ile Ala Asp Thr Met Val Gln Ile Phe Lys Gly Leu Gln Glu Arg
305      310      315      320
Phe Gln Thr Glu Ile Gln Thr Val Asn Lys Gln Phe Pro Cys Glu Pro
325      330      335
Phe Lys Phe Leu Glu Pro Thr Leu Arg Leu Glu Tyr Cys Glu Ala Leu
340      345      350
Ala Met Leu Arg Glu Ala Gly Val Glu Met Gly Asp Glu Asp Asp Leu
355      360      365
Ser Thr Pro Asn Glu Lys Leu Leu Gly His Leu Val Lys Glu Lys Tyr
370      375      380
Asp Thr Asp Phe Tyr Ile Leu Asp Lys Tyr Pro Leu Ala Val Arg Pro
385      390      395      400
Phe Tyr Thr Met Pro Asp Pro Arg Asn Pro Lys Gln Ser Asn Ser Tyr

```

```

                405                410                415
Asp Met Phe Met Arg Gly Glu Glu Ile Leu Ser Gly Ala Gln Arg Ile
                420                425                430
His Asp Pro Gln Leu Leu Thr Glu Arg Ala Leu His His Gly Ile Asp
                435                440                445
Leu Glu Lys Ile Lys Ala Tyr Ile Asp Ser Phe Arg Phe Gly Ala Pro
                450                455                460
Pro His Ala Gly Gly Gly Ile Gly Leu Glu Arg Val Thr Met Leu Phe
465                470                475                480
Leu Gly Leu His Asn Val Arg Gln Thr Ser Met Phe Pro Arg Asp Pro
                485                490                495
Lys Arg Leu Thr Pro
                500

```

<210> 106
 <211> 471
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 106

```

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

```

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

<210> 107

<211> 424

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

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

10

```

          325          330          335
Ile Glu Glu His Arg Gln Phe Gly Gly Asn Cys Asp Val Asp Val Ser
          340          345          350
Phe Met Tyr Leu Thr Phe Phe Leu Glu Asp Asp Asp Lys Leu Glu Gln
          355          360          365
Ile Arg Lys Asp Tyr Thr Ser Gly Ala Met Leu Thr Gly Glu Leu Lys
          370          375          380
Lys Ala Leu Ile Glu Val Leu Gln Pro Leu Ile Ala Glu His Gln Ala
          385          390          395          400
Arg Arg Lys Glu Val Thr Asp Glu Ile Val Lys Glu Phe Met Thr Pro
          405          410          415
Arg Lys Leu Ser Phe Asp Phe Gln
          420

```

<210> 108
 <211> 401
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 108

```

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

```

Gly Ala Met Leu Thr Gly Glu Leu Lys Lys Ala Leu Ile Glu Val Leu
 355 360 365
 Gln Pro Leu Ile Ala Glu His Gln Ala Arg Arg Lys Glu Val Thr Asp
 370 375 380
 Glu Ile Val Lys Glu Phe Met Thr Pro Arg Lys Leu Ser Phe Asp Phe
 385 390 395 400
 Gln

<210> 109
 <211> 25
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 109

Asn Ser Ala Leu Ser Ala Gln Leu Arg Glu Ala Ala Thr Gln Ala Gln
 1 5 10 15
 Gln Thr Leu Gly Ser Thr Ile Asp Lys
 20 25

<210> 110
 <211> 37
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

<400> 110

Ser His Pro Leu Asp Pro Ile Asp Thr Val Asp Phe Glu Arg Glu Cys
 1 5 10 15
 Gly Val Gly Val Ile Val Thr Pro Glu Gln Ile Glu Glu Ala Val Glu
 20 25 30
 Ala Ala Ile Asn Arg
 35

<210> 111
 <211> 11
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens

<400> 111

Leu Ser Phe Leu Val Ser Tyr Ile Ala Ser Lys
 1 5 10

<210> 112
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 112

Glu Cys Gly Val Gly Val Ile Val Thr Pro Glu Gln Ile Glu Glu Ala
 1 5 10 15
 Val Glu Ala Ala Ile Asn Arg
 20

<210> 113
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 113

Glu Ala Ala Thr Gln Ala Gln Gln Thr Leu Gly Ser Thr Ile Asp Lys
 1 5 10 15
 Ala Thr Gly Ile Leu Leu Tyr Gly Leu Ala Ser Arg
 20 25

<210> 114
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5
 <400> 114

Ile His Thr Glu Pro Gln Leu Ser Ala Ala Leu Glu Tyr Val Arg
 1 5 10 15

10
 <210> 115
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15
 <400> 115

Asn Glu Val Asp Met Gln Val Leu His Leu Leu Gly Pro Lys
 1 5 10

20
 <210> 116
 <211> 775
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

25
 <400> 116

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

Gly	Tyr	Ala	Lys	Ala	Asn	Asn	Gly	Ile	Cys	Phe	Leu	Arg	Phe	Asp	Asp
290						295					300				
Thr	Asn	Pro	Glu	Lys	Glu	Glu	Ala	Lys	Phe	Phe	Thr	Ala	Ile	Tyr	Asp
305					310					315					320
Met	Val	Thr	Trp	Leu	Gly	Tyr	Thr	Pro	Tyr	Lys	Val	Thr	Tyr	Ala	Ser
				325					330					335	
Asp	Tyr	Phe	Asp	Gln	Leu	Tyr	Ala	Trp	Ala	Val	Glu	Leu	Ile	His	Gly
			340					345					350		
Gly	Leu	Ala	Tyr	Val	Cys	His	Gln	Arg	Val	Glu	Glu	Leu	Lys	Gly	His
		355					360					365			
Asn	Pro	Leu	Pro	Ser	Pro	Trp	Arg	Asp	Arg	Pro	Lys	Glu	Glu	Ser	Leu
370						375					380				
Leu	Leu	Phe	Glu	Ala	Met	Arg	Lys	Gly	Lys	Phe	Ala	Glu	Gly	Glu	Ala
385					390					395					400
Thr	Leu	Arg	Met	Lys	Leu	Val	Met	Glu	Asp	Gly	Lys	Met	Asp	Pro	Val
				405					410					415	
Ala	Tyr	Arg	Val	Lys	Tyr	Thr	Pro	His	His	Arg	Thr	Gly	Asp	Lys	Trp
				420				425					430		
Cys	Ile	Tyr	Pro	Thr	Tyr	Asp	Tyr	Thr	His	Cys	Leu	Cys	Asp	Ser	Ile
		435				440					445				
Glu	His	Ile	Thr	His	Ser	Leu	Cys	Thr	Lys	Glu	Phe	Gln	Ala	Arg	Arg
		450				455				460					
Ser	Ser	Tyr	Phe	Trp	Leu	Cys	Asn	Ala	Leu	Lys	Val	Tyr	Cys	Pro	Val
465					470					475					480
Gln	Trp	Glu	Tyr	Gly	Arg	Leu	Asn	Leu	His	Tyr	Ala	Val	Val	Ser	Lys
				485					490					495	
Arg	Lys	Ile	Leu	Gln	Leu	Val	Ala	Ala	Gly	Ala	Val	Arg	Asp	Trp	Asp
			500					505					510		
Asp	Pro	Arg	Leu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ala	Leu	Arg	Arg	Arg	Gly	Phe	Pro
		515					520					525			
Pro	Glu	Ala	Ile	Asn	Asn	Phe	Cys	Ala	Arg	Val	Gly	Val	Thr	Val	Ala
		530				535					540				
Gln	Thr	Thr	Met	Glu	Pro	His	Leu	Leu	Glu	Ala	Cys	Val	Arg	Asp	Val
545					550					555					560
Leu	Asn	Asp	Ala	Ala	Pro	Arg	Ala	Met	Ala	Val	Leu	Glu	Pro	Leu	Gln
				565					570					575	
Val	Val	Ile	Thr	Asn	Phe	Pro	Ala	Pro	Lys	Pro	Leu	Asp	Ile	Arg	Val
		580						585					590		
Pro	Asn	Phe	Pro	Ala	Asp	Glu	Thr	Lys	Gly	Phe	His	Gln	Val	Pro	Phe
		595					600					605			
Ala	Ser	Thr	Val	Phe	Ile	Glu	Arg	Ser	Asp	Phe	Lys	Glu	Glu	Ser	Glu
		610				615					620				
Pro	Gly	Tyr	Lys	Arg	Leu	Ala	Ser	Gly	Gln	Pro	Val	Gly	Leu	Arg	His
625					630					635					640
Thr	Gly	Tyr	Val	Ile	Glu	Leu	Gln	Asn	Ile	Val	Arg	Gly	Ser	Ser	Gly
				645					650					655	
Cys	Val	Glu	Arg	Leu	Glu	Val	Thr	Cys	Arg	Arg	Ala	Asp	Ala	Gly	Glu
		660						665					670		
Lys	Pro	Lys	Ala	Phe	Ile	His	Trp	Val	Ser	Gln	Pro	Leu	Val	Cys	Glu
		675					680					685			
Ile	Arg	Leu	Tyr	Glu	Arg	Leu	Phe	Gln	His	Lys	Asn	Pro	Glu	Asp	Pro
		690				695					700				
Val	Glu	Val	Pro	Gly	Gly	Phe	Leu	Ser	Asp	Leu	Asn	Pro	Ala	Ser	Leu
705					710					715					720
Gln	Val	Val	Glu	Gly	Ala	Leu	Val	Asp	Cys	Ser	Val	Ala	Leu	Ala	Lys
				725					730					735	
Pro	Phe	Asp	Lys	Phe	Gln	Phe	Glu	Arg	Leu	Gly	Tyr	Phe	Ser	Val	Asp
		740						745					750		
Pro	Asp	Ser	His	Gln	Gly	Gln	Ile	Val	Phe	Asn	Arg	Thr	Val	Thr	Leu
		755					760						765		
Lys	Glu	Asp	Pro	Gly	Glu	Ile									
770						775									

<210> 117

<211> 2437

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 117

ctgcaatggc	ggctctagac	tccctgtcgc	tcttcaactag	cctcggcctg	agcgagcaga	60
aggcccgcga	gacgctcaag	aactcggctc	tgagcgcgca	gctgcgcgag	gccgctaactc	120
aggctcagca	gaccctgggt	tccaccattg	acaaagctac	cgggatccctg	ttatatggct	180
tggcctcccc	actcagggat	acccggcgctc	tctccttcct	tgtaaagctac	atagccagta	240
agaagatcca	cactgagccc	cagctaagcg	ctgcccttga	gtatgtgcgg	agtcacccct	300
tggaccccat	cgacactgtg	gacttcgagc	gggaatgtgg	cgtgggtgtc	attgtgaccc	360
cagagcagat	tgaggaggct	gtggaggctg	ctattaacag	gcaccggccc	cagctcctgg	420
tggaaactgt	ccatttcaac	atggggctgc	tgatgggaga	ggctcgggct	gtgctgaagt	480
gggcagatgg	caaaatgatc	aagaatgaag	tggacatgca	ggtcctccac	cttctgggcc	540
ccaagtggga	ggctgatctg	gagaagaagt	tcaagggtggc	aaaagctcgg	ctagaagaaa	600
cagaccggag	gacggcaaag	gatgtggtgg	agaatggcga	gactgctgac	cagaccctgt	660
ctctgatgga	gcagctccgg	ggggaggccc	ttaagttcca	caagcctggt	gagaactaca	720
agaccccagg	ctatgtgggc	actccacaca	ccatgaatct	actaaagcag	cacctggaga	780
ttactgggtg	gcaggtacgt	acccggttcc	cgccagaacc	caatggaatc	ctgcatattg	840
gacatgccaa	agccatcaat	ttcaactttg	gctatgccaa	ggccaacaat	ggcatctgtt	900
ttctgctgtt	tgatgacacc	aaccttgaga	aggaggaagc	aaagtctctc	acggccatct	960
gtgacatggt	agcctggcta	ggctacacac	cttacaaggt	cacatatgcg	tctgactatt	1020
ttgaccagct	atatgcgtgg	gctgtggagc	tcacccgcag	gggtctggct	tatgtgtgcc	1080
accagcgagg	agaggagctc	aaaggccata	atactctgcc	ttcaccctgg	agagaccgtc	1140
ccatggagga	gtcactgctg	ctctttgagg	caatgcgcaa	gggcaagttt	tcagaggggcg	1200
aggccaact	acggatgaag	ctggtgatgg	aggatggcaa	gatggaccct	gtagcctatc	1260
gagccaagta	tacaccacag	caccgcacag	gggacaaatg	gtgcatctat	cccacctacg	1320
actacacaca	ctgcctctgt	gactccatcg	agcacatcac	tcactcactc	tgcaccaagg	1380
aattccaggc	ccgacgctct	tcctacttct	ggctttgcaa	tgcactggac	gtctattgcc	1440
ctgtgcagtg	ggagtatggc	cgcctcaacc	tgcactatgc	tgttgtctct	aagaggaaga	1500
tcctccagct	tgtagcaact	ggtgctgtgc	gggactggga	tgaccacagg	ctctttacac	1560
tcacggccct	gcgacggcgg	ggcttcccac	ctgaggccat	caacaacttc	tgtgcccggg	1620
tgggagtga	tgtggcacaa	accacaatgg	agccacatct	tctagaagcc	tgtgtgcgtg	1680
atgtgtgtaa	tgacacagcc	ccacgagcca	tggctgtgct	ggagtcaacta	cgggtcatca	1740
tcaccaactt	tcctgctgcc	aagtccttgg	acatccagg	gcccacttc	ccagctgatg	1800
agaccaaagg	cttccatcag	gttccctttg	cacccattgt	cttcattgag	aggactgact	1860
tcaaggagga	gccagagcca	ggatttaagc	gcctggcttg	gggccagcct	gtgggcctga	1920
ggcatacagg	ctacgtcatt	gagctgcagc	atgttgtcaa	gggccccagt	ggttgtgtag	1980
agagtctgga	ggtgacctgc	agacggcgag	atgctggaga	gaagccaaaag	gcctttattc	2040
actgggtgtc	acagcctttg	atgtgtgagg	ttcgcctcta	tgagcgacta	ttccagcaca	2100
agaaccctga	agatcctact	gaggtgcctg	gtggattttt	aagtgcctg	aacctggcat	2160
cactacacgt	ggtggatgca	gcattagtgg	actgctctgt	ggccctggca	aaacccttcg	2220
acaagttcca	gtttgagcgt	cttggatatt	tctccgtgga	tccagacagc	catcagggaa	2280
agcttgtctt	taaccgaact	gtcacactga	aggaagaccc	aggaaggtg	tgagctggaa	2340
gcactgaacc	tacctcatcc	tcctggaggg	tgtggctacc	ctcgccaccc	caaattccat	2400
gtcaataaa	aacagctaaa	ttctcctaga	aaaaaaaa			2437

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido histidil-ARNt sintetasa (HRS) para uso en la reducción de una respuesta inflamatoria, en el que el polipéptido HRS se selecciona del grupo que consiste en
 - a. SEQ ID NO:28,
 - 5 b. un fragmento de SEQ ID NO:28 que comprende al menos 400 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO:28,
 - c. una variante que se diferencia de SEQ ID NO:28 por al menos 1% pero menos de 20% de los residuos de SEQ ID NO:28, y
 - d. una variante que se diferencia de SEQ ID NO:28 por al menos uno pero menos de 50 residuos de aminoácidos.
- 10 2. El polipéptido HRS para uso según la reivindicación 1, en el que el polipéptido HRS comprende al menos el dominio WHEP de HRS.
3. El polipéptido HRS para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido HRS es un fragmento de SEQ ID NO:28 que comprende al menos 500 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO:28.
- 15 4. El polipéptido HRS para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido HRS es una variante que se diferencia de SEQ ID NO:28 por al menos 1% pero menos de 10% de los residuos de SEQ ID NO:28, tal como por menos de 5% de los residuos de SEQ ID NO:28.
5. El polipéptido HRS para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido HRS está unido a un polipéptido heterólogo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a una proteína que es diferente de una proteína aminoacil-ARNt sintetasa (AARS), y que deriva del mismo organismo o uno diferente.
- 20 6. El polipéptido HRS para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido HRS está modificado por pegilación.
7. El polipéptido HRS para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la respuesta inflamatoria está asociada con el sistema músculo-esquelético.
8. El polipéptido HRS para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la respuesta inflamatoria está asociada con el sistema respiratorio.
- 25 9. El polipéptido HRS para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la respuesta inflamatoria está asociada con el sistema gastrointestinal.
10. El polipéptido HRS para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la respuesta inflamatoria está asociada con la piel.
- 30 11. El polipéptido HRS para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la respuesta inflamatoria está asociada con el sistema linfático/inmune.
12. El polipéptido HRS para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para tratar una enfermedad o afección inflamatoria.
13. El polipéptido HRS para uso según la reivindicación 12, en el que la enfermedad o afección inflamatoria es una enfermedad auto-inmune.
- 35 14. El polipéptido HRS para uso según la reivindicación 12, en el que la afección se selecciona del grupo que consiste en miositis auto-inmune, síndrome de Sjogren, enfermedad auto-inmune del músculo liso, miositis, polimiositis, escleroderma, inflamación muscular crónica, enfermedad pulmonar inflamatoria, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfermedad intestinal inflamatoria (IBD), colitis inducida por agresiones medioambientales, colitis en afecciones tales como enfermedad granulomatosa crónica, enterocolitis, dermatitis irritante, dermatitis alérgica por contacto, dermatitis inducida por fármacos, dermatomiositis, pénfigo vulgar y dermatitis autoinmune.
- 40

**LOS POLIPÉPTIDOS TIROSIL-ARNt SINTETASA REDUCEN
la MIGRACIÓN DE NEUTRÓFILOS a los PULMONES**

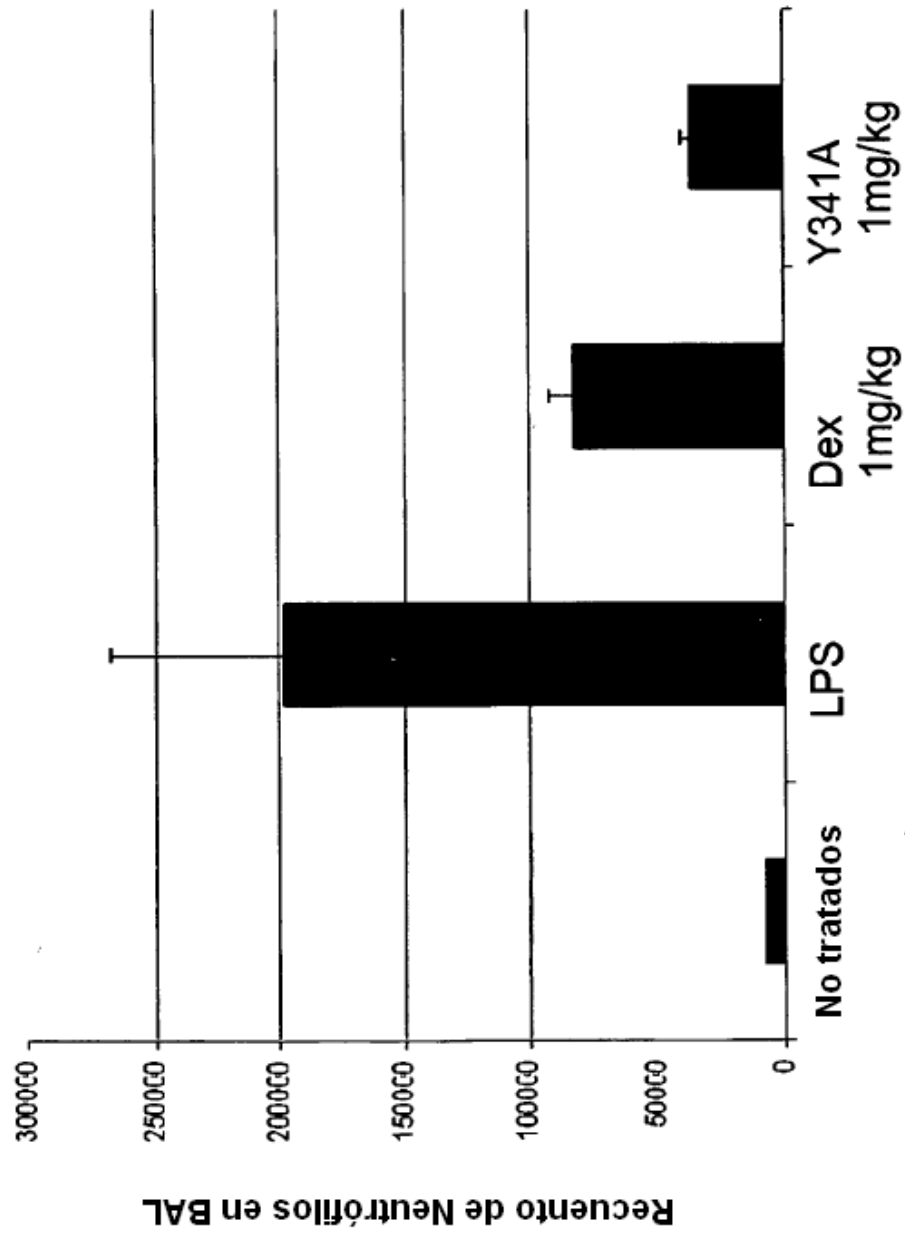


Figura 1A

**LOS POLIPÉPTIDOS TIROSIL-ARNt SINTETASA REDUCEN
la MIGRACIÓN DE NEUTRÓFILOS a los PULMONES**

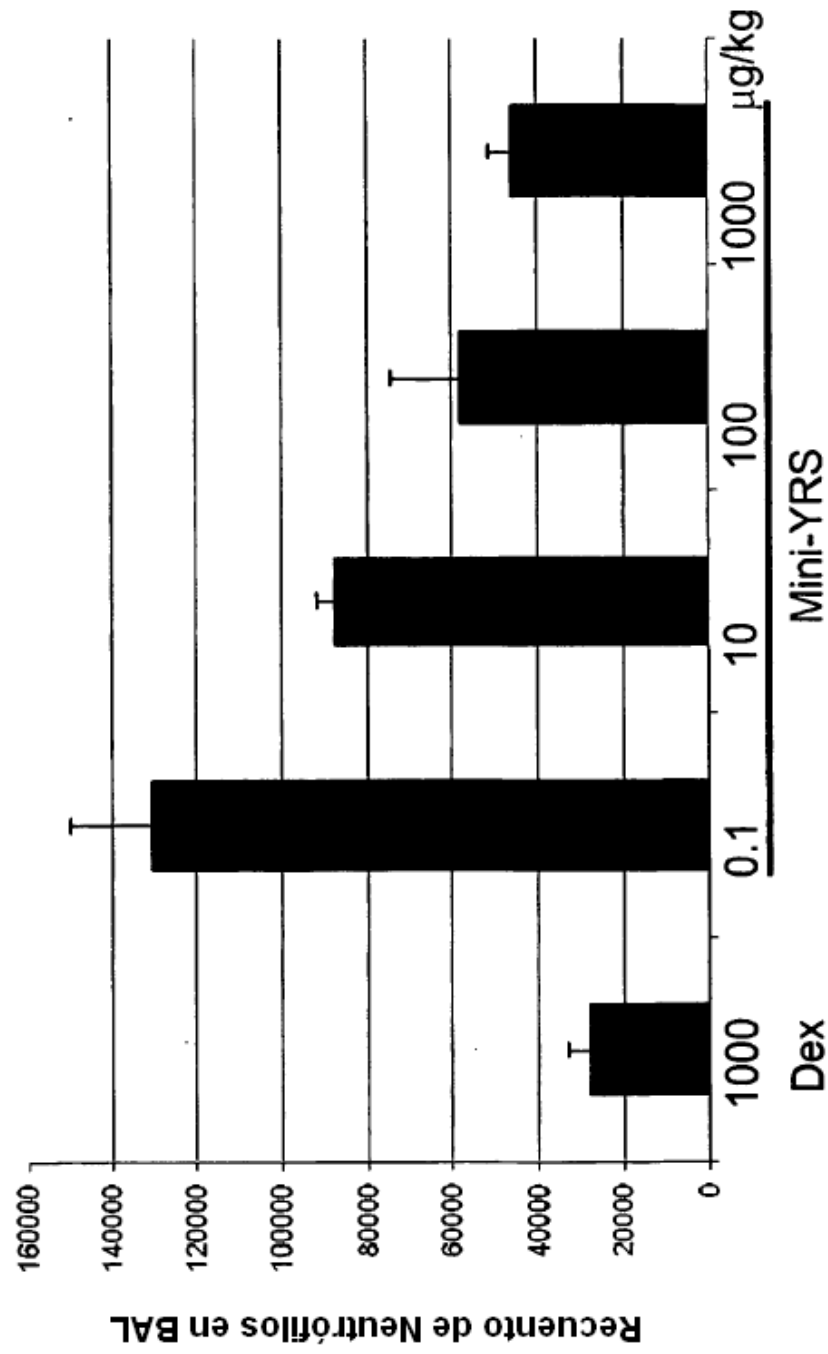


Figura 1B

**LOS POLIPÉPTIDOS HISTIDIL-ARNt SINTETASA REDUCEN
la MIGRACIÓN DE NEUTRÓFILOS a los PULMONES**

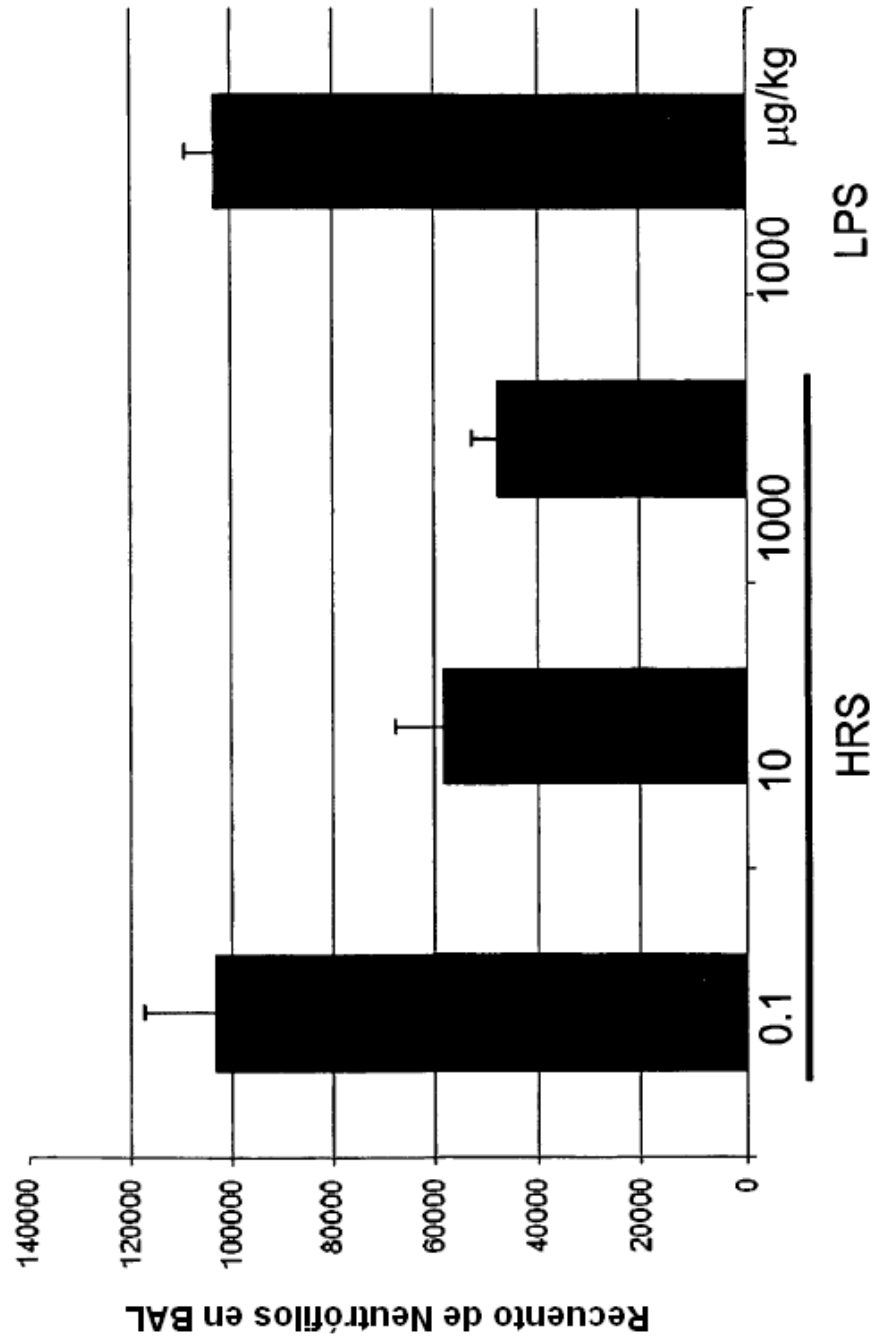


Figura 2A

**LOS POLIPÉPTIDOS HISTIDIL-ARNt SINTETASA REDUCEN
la MIGRACIÓN DE EOSINÓFILOS a los PULMONES**

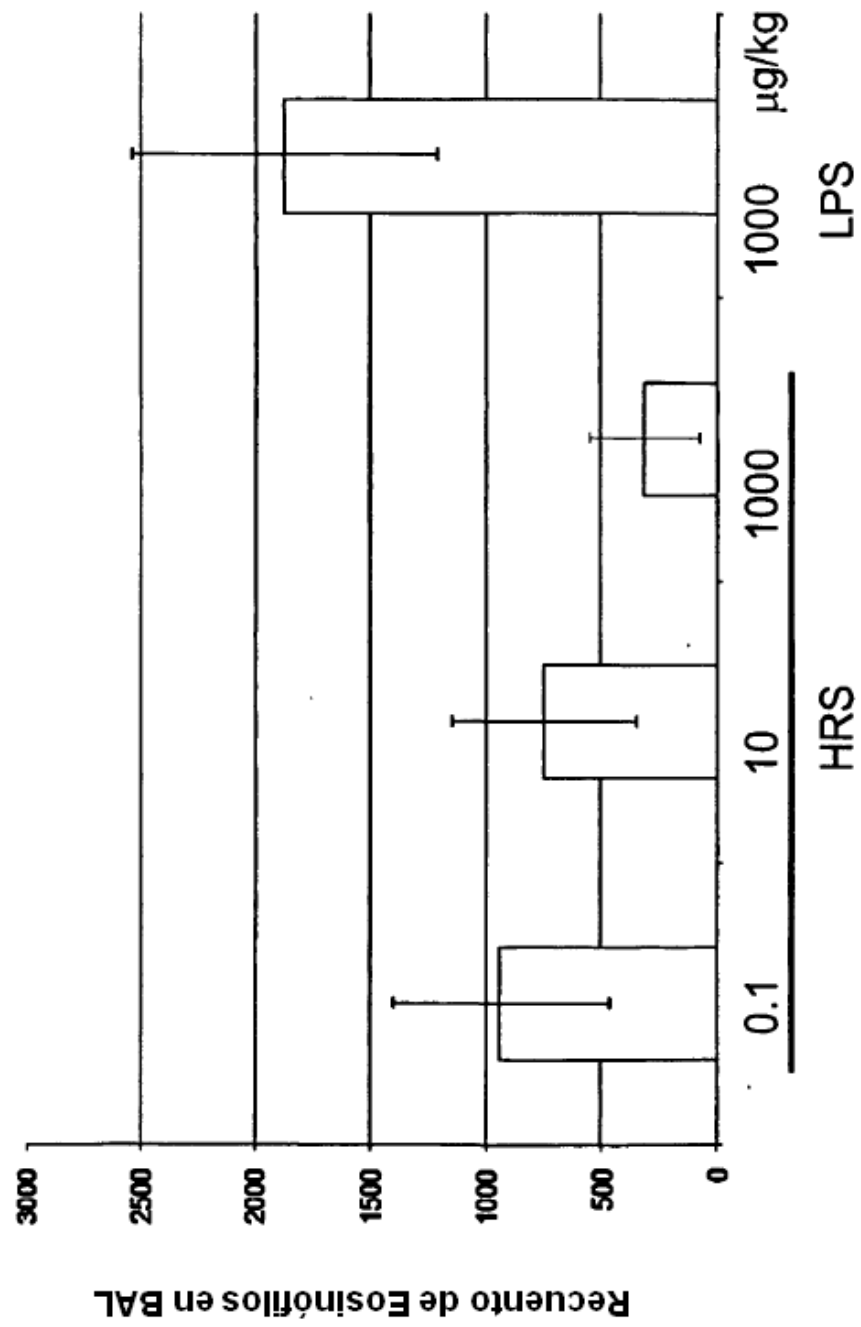


Figura 2B

Los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa estimulan la migración de
líneas celulares 293 y CHO transfectadas con el receptor CXCR-2

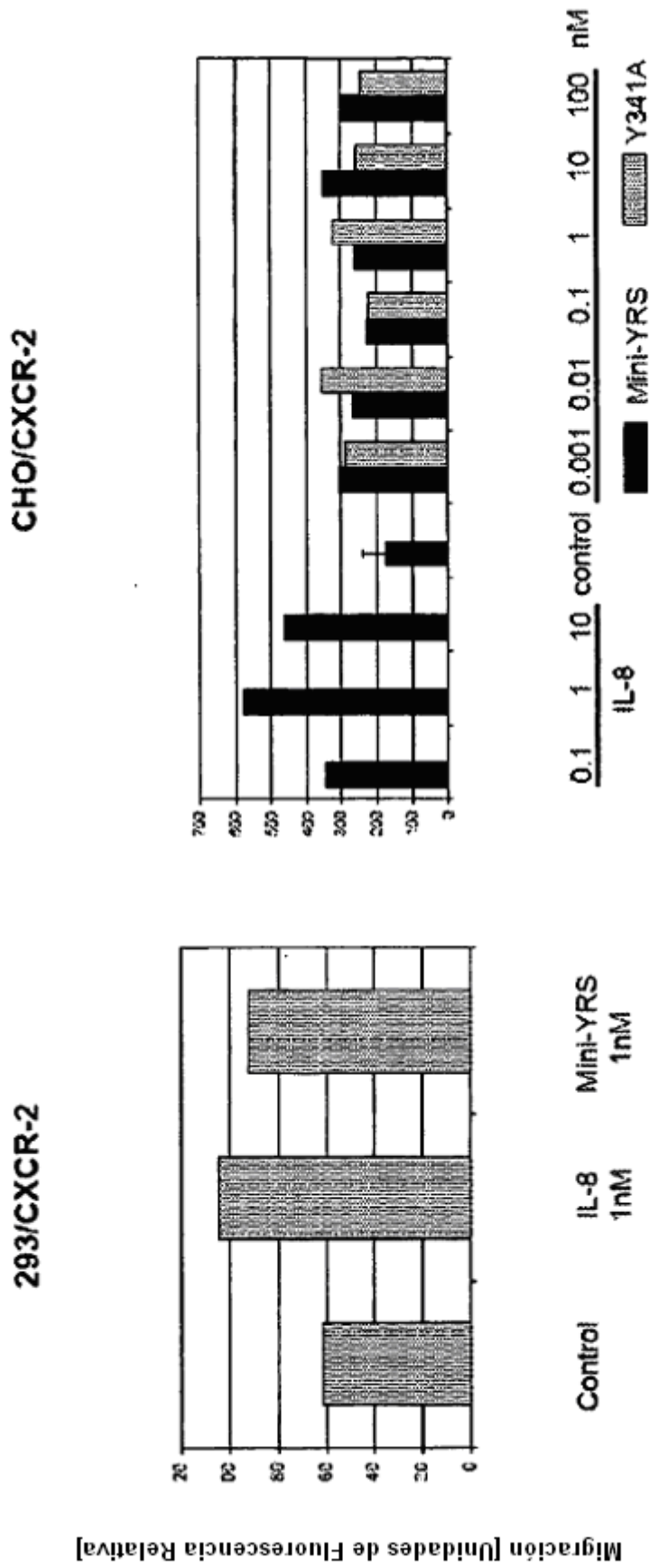


Figura 3

Los polipéptidos Tirozil-ARNt Sintetasa Estimulan la Migración de Células Polimorfonucleares (PMN)

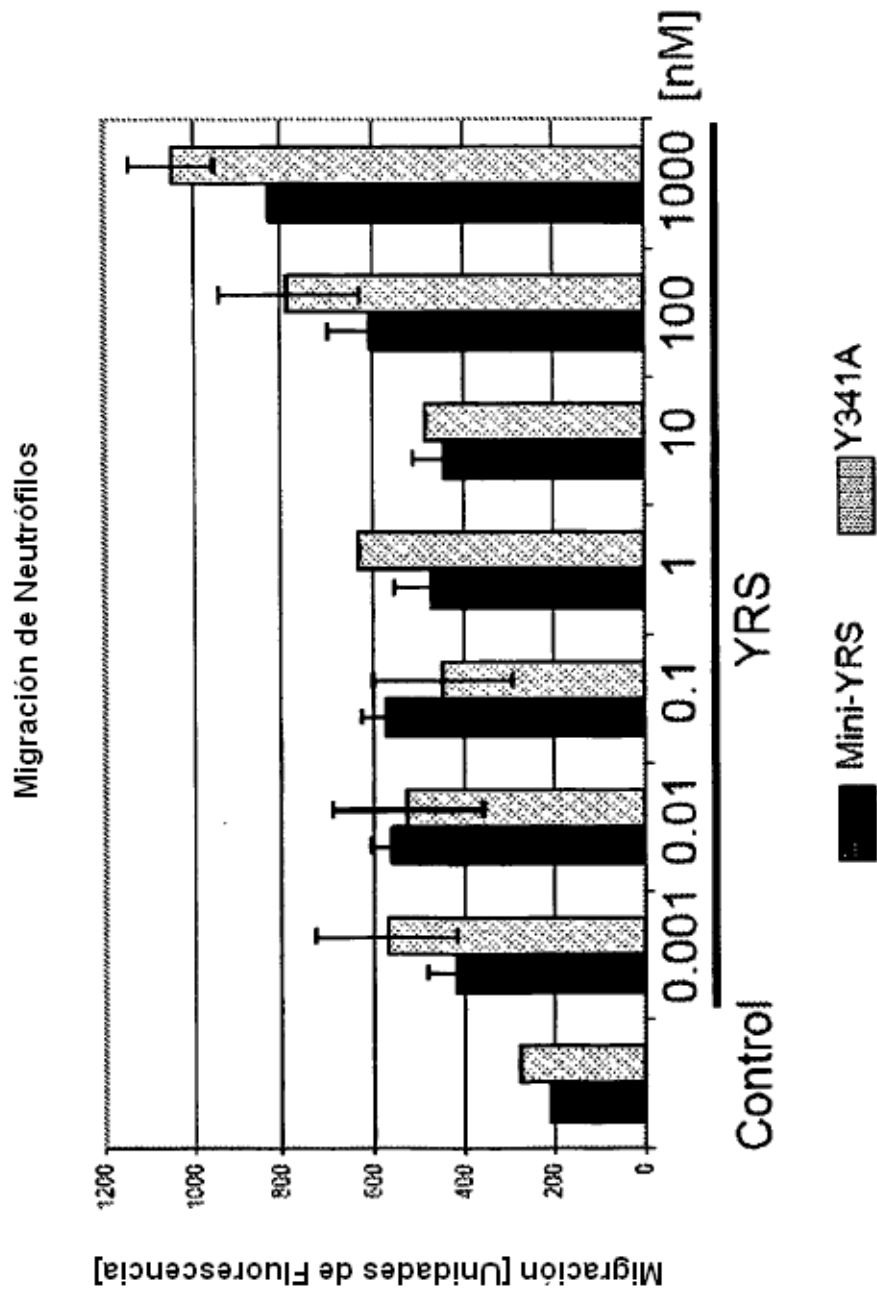


Figura 4

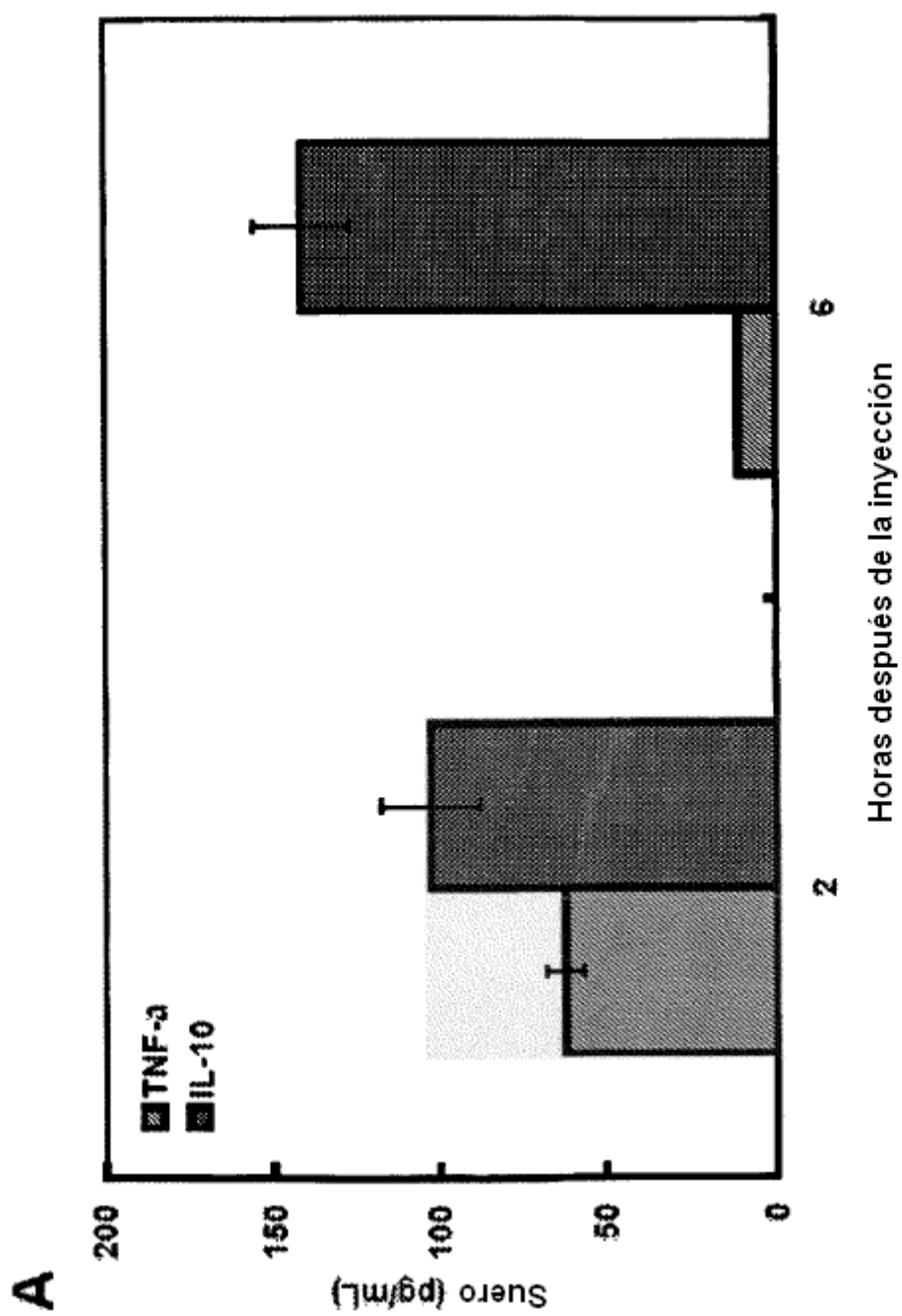


Figura 5A

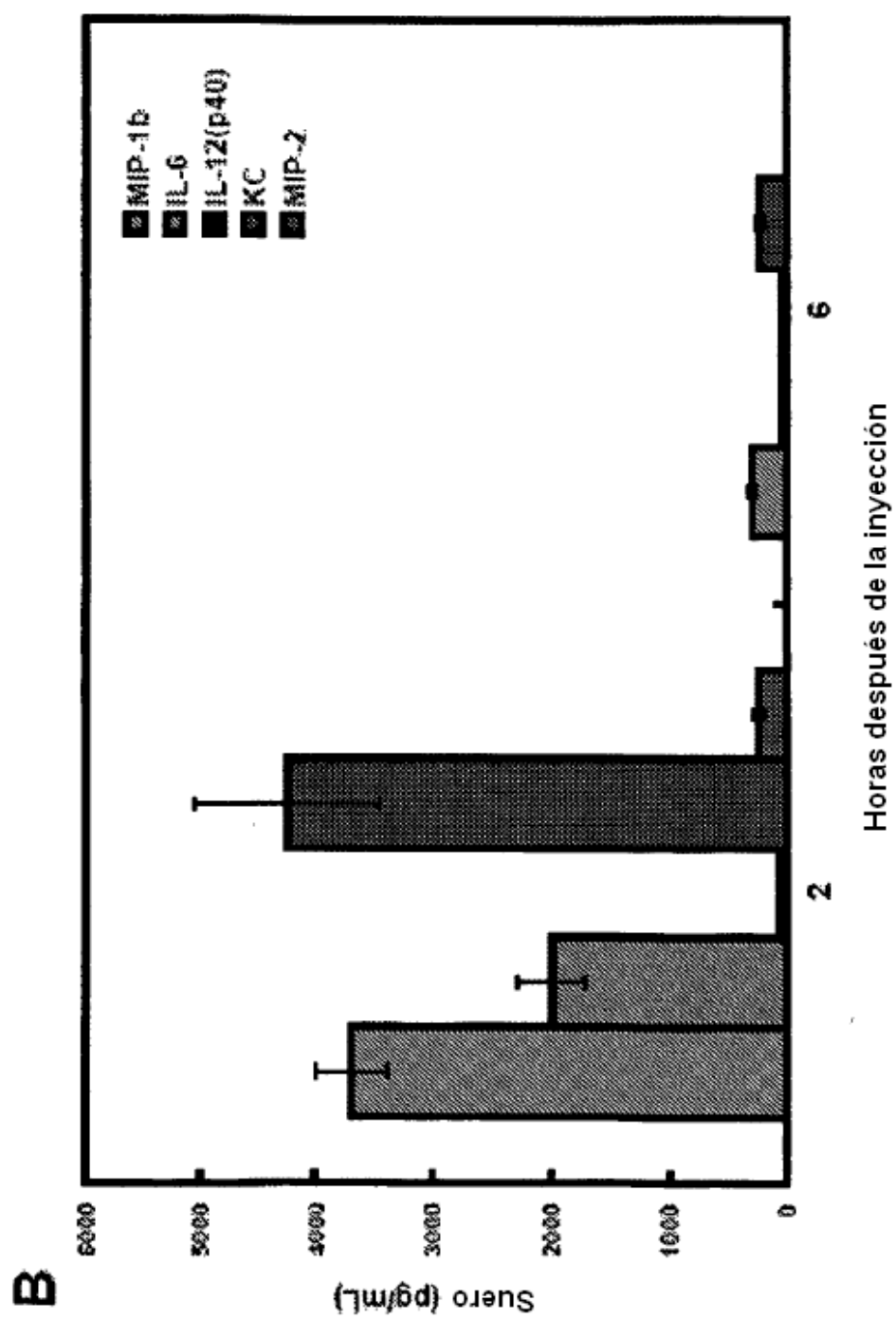
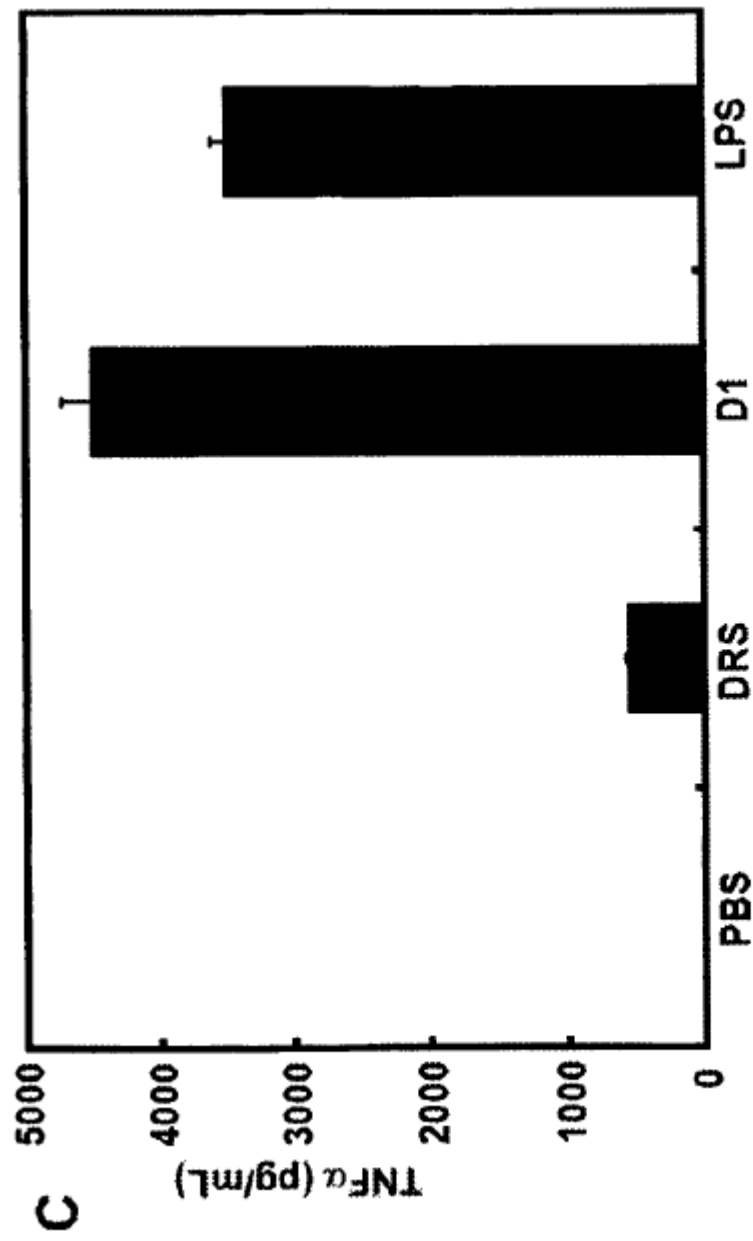
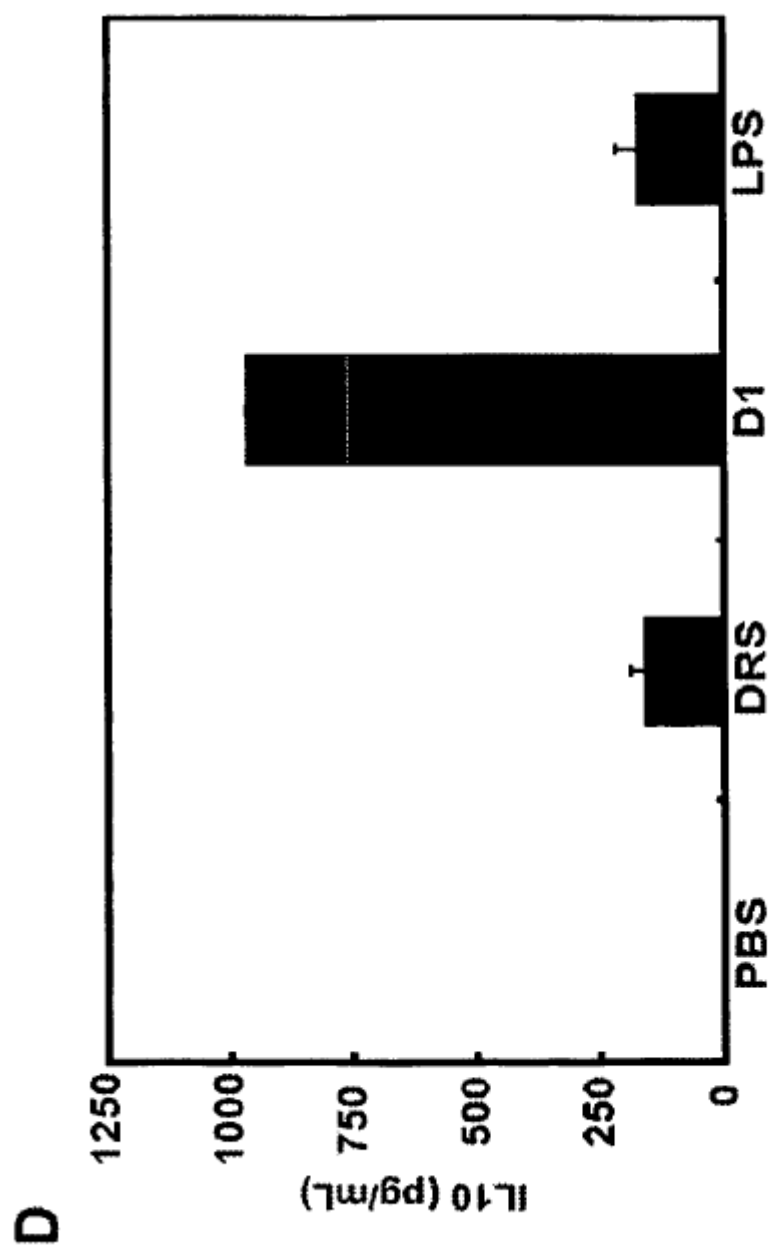


Figura 5B

*Figura 5C*

*Figura 5D*

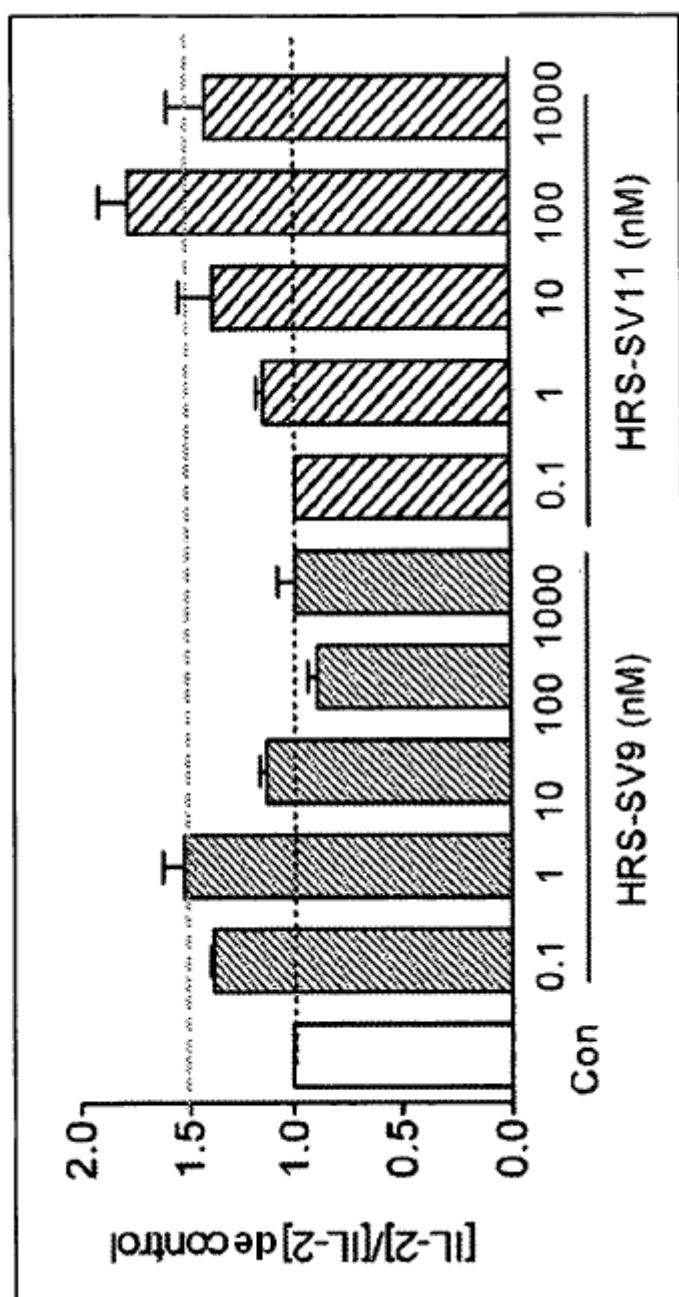


Figura 6

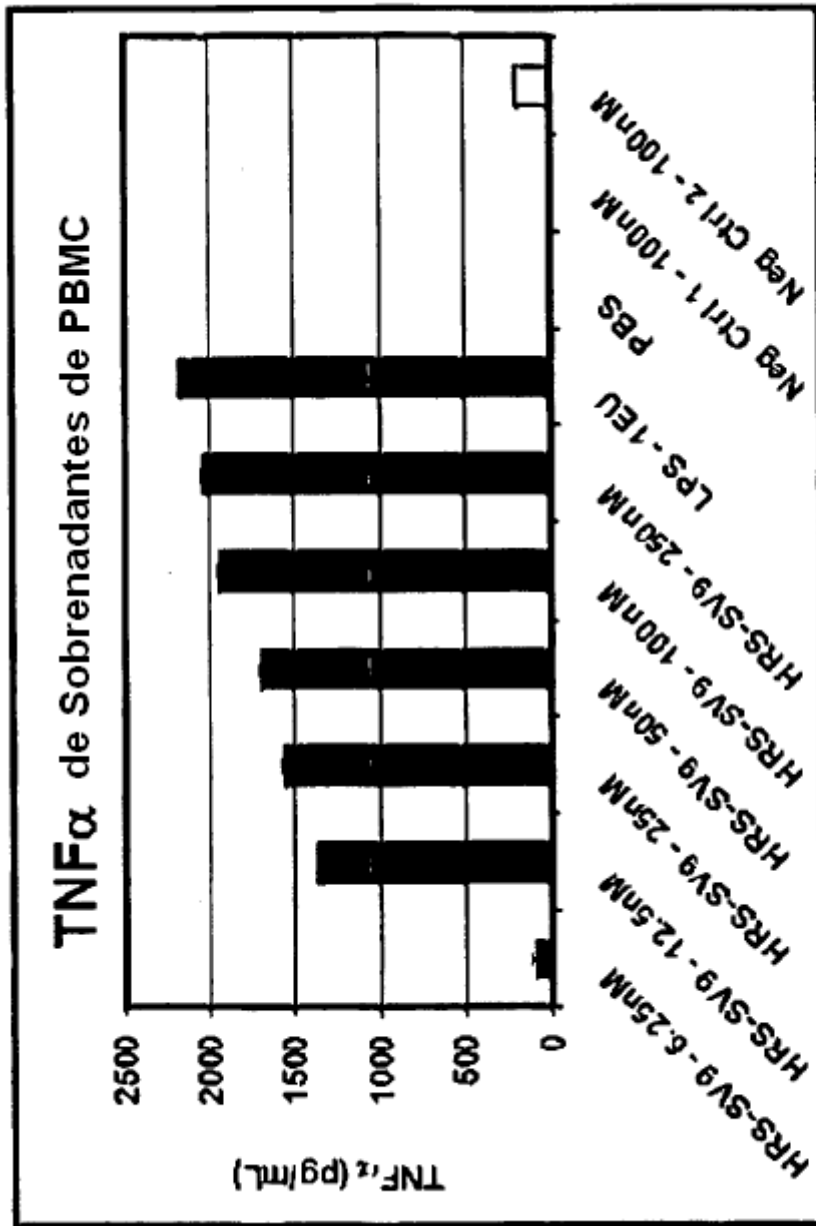
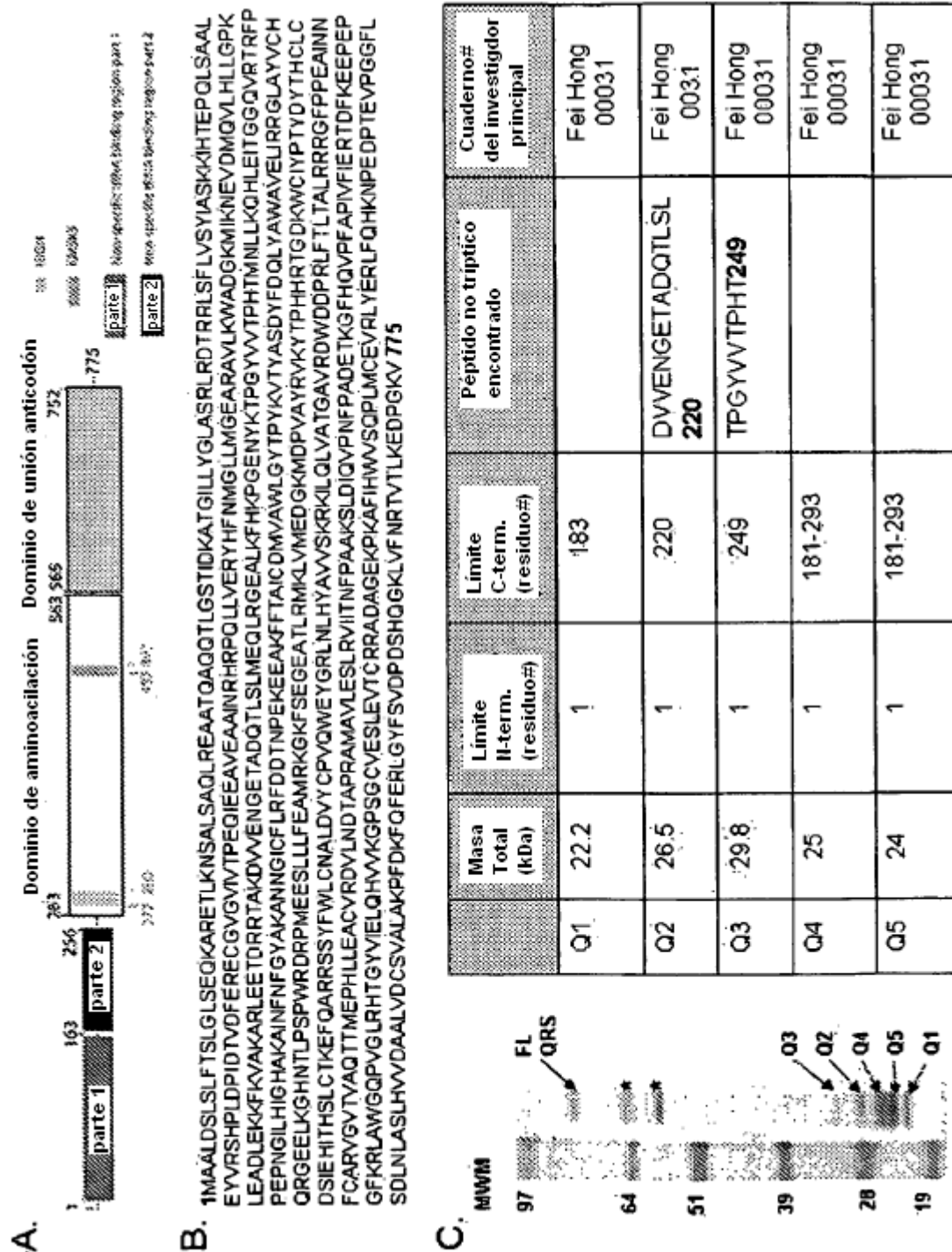


Figura 7



Figuras 8A-8C

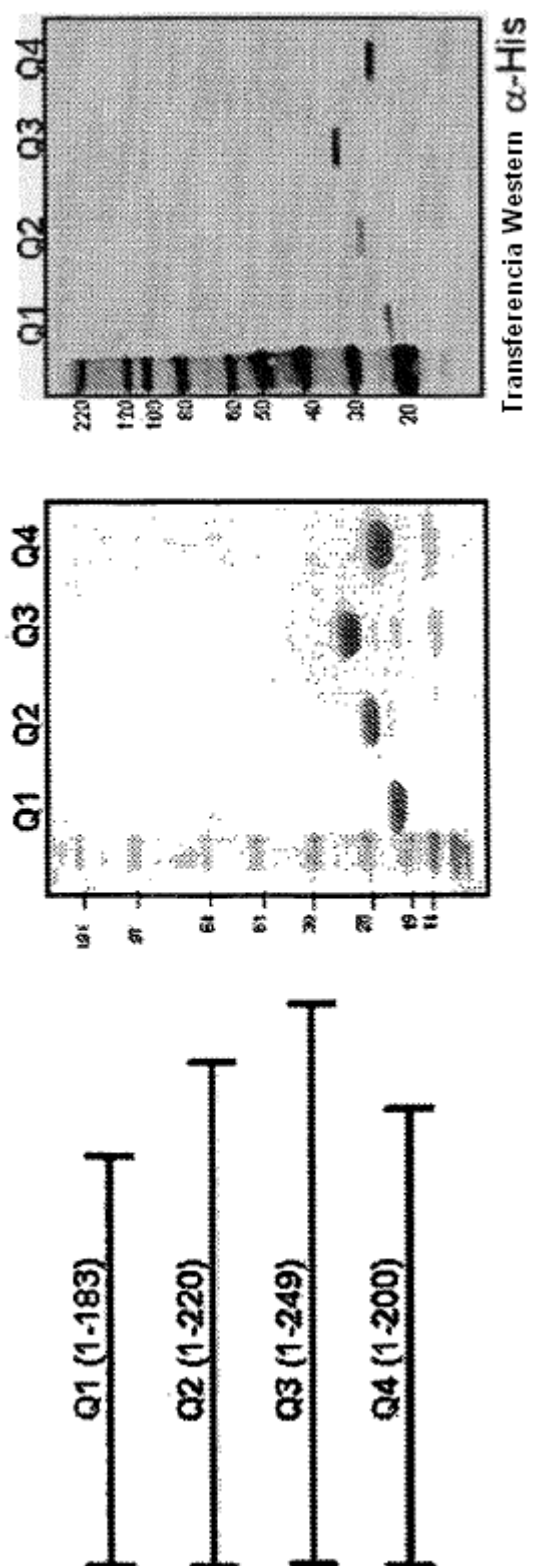


Figura 9

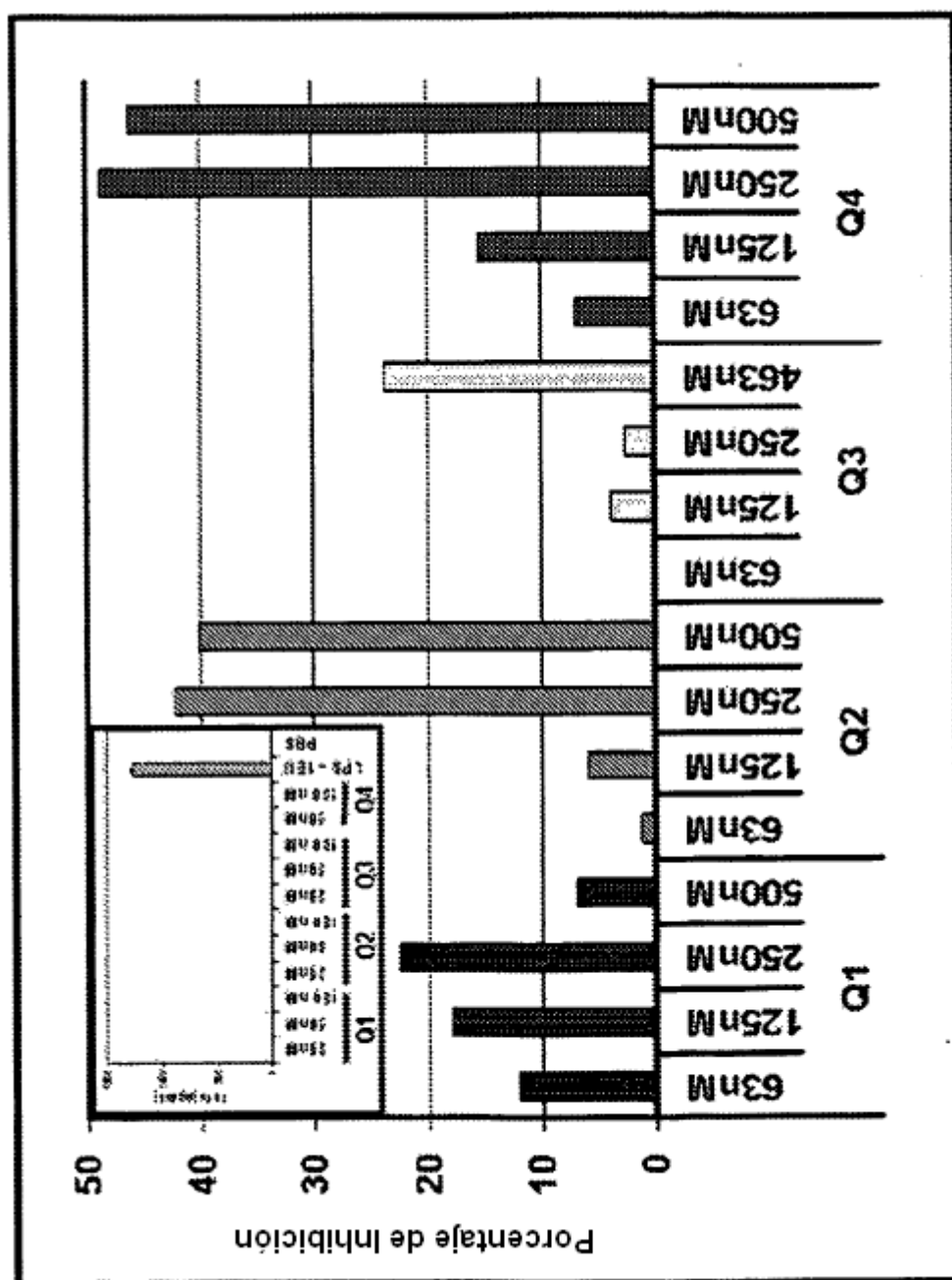


Figura 10

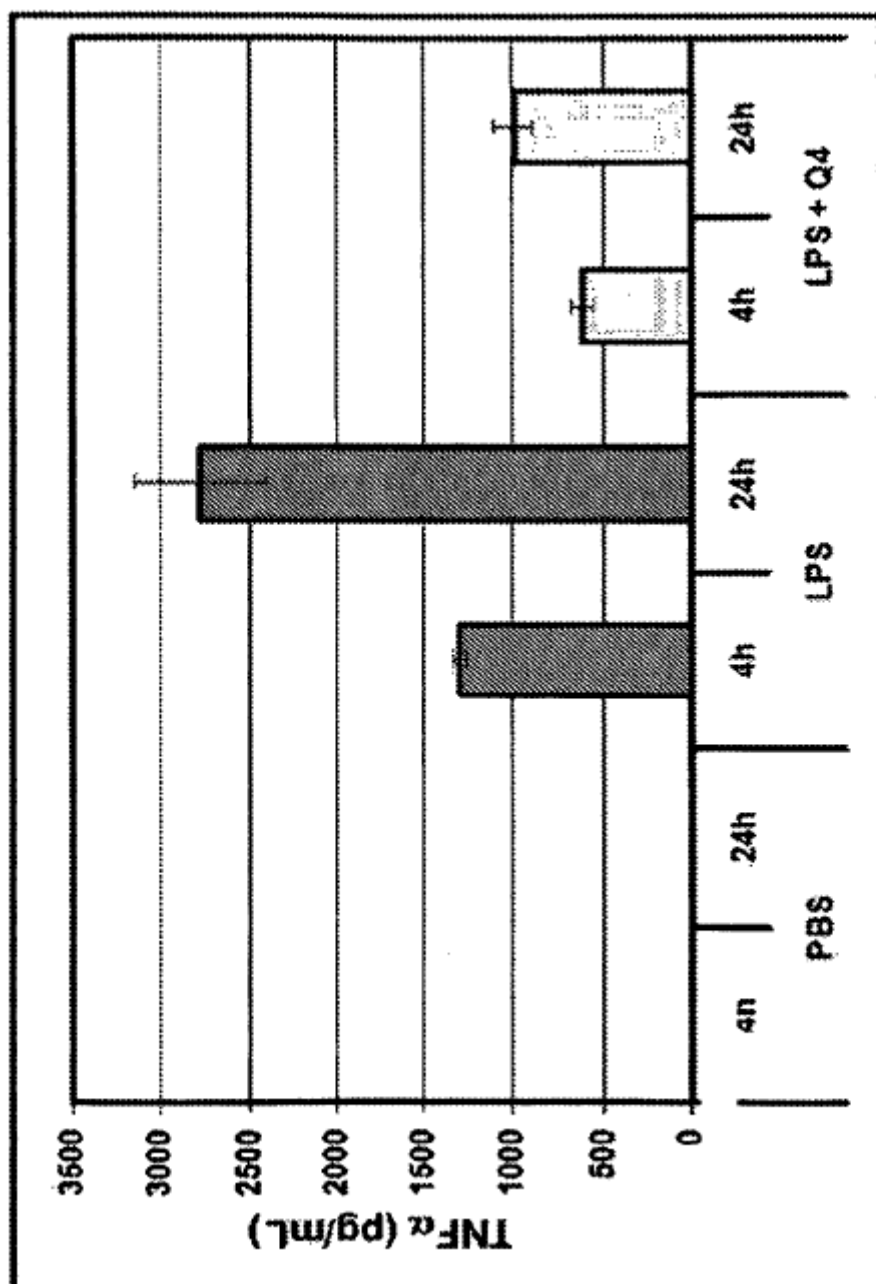
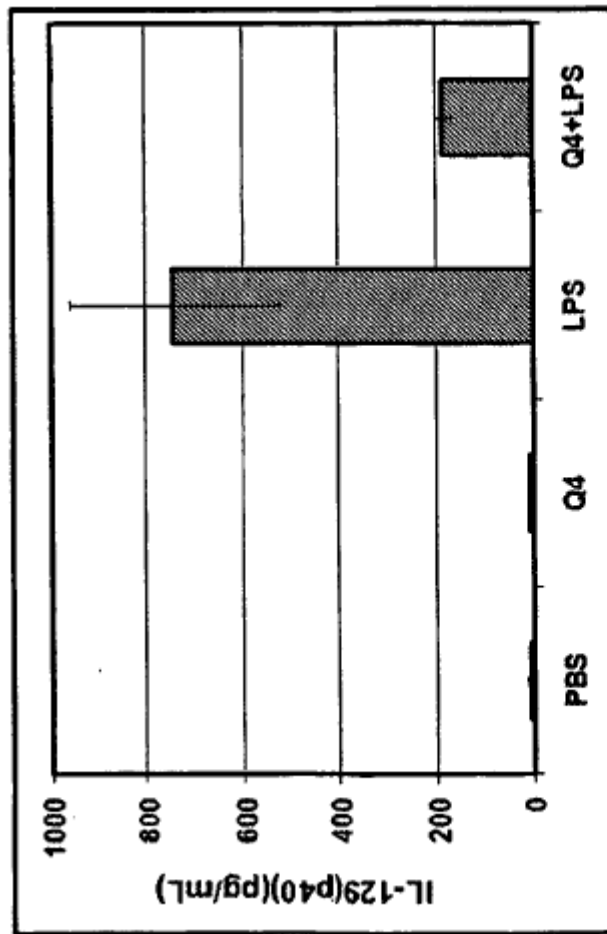


Figura 11



Inhibición por el fragmento Q4 de QRS de la secreción de IL-12(p40) inducida por LPS.

Las células se pre-trataron con 500 nM de fragmento Q4 durante 30 minutos, la secreción de IL-12(p40) se indujo por tratamiento con 0,5EU/ml LPS, durante 24 horas.

Figura 12

El Polipéptido Histidil-ARNt Sintetasa Inhibe la Migración de Células THP-1 a CCL-23

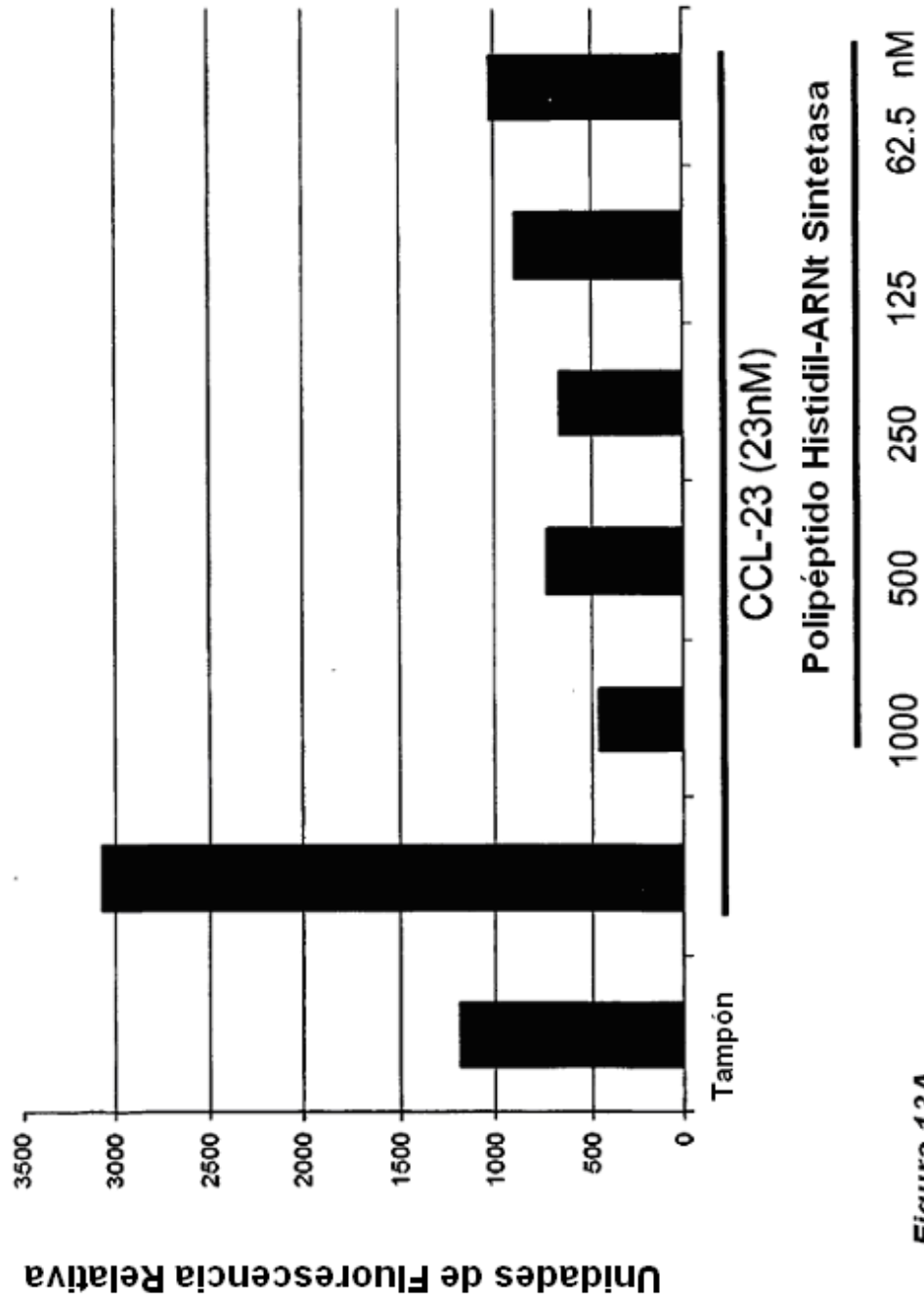


Figura 13A

El Polipéptido Aspartil-ARNt Sintetasa Inhibe la Migración de Células THP-1 a CCL-23

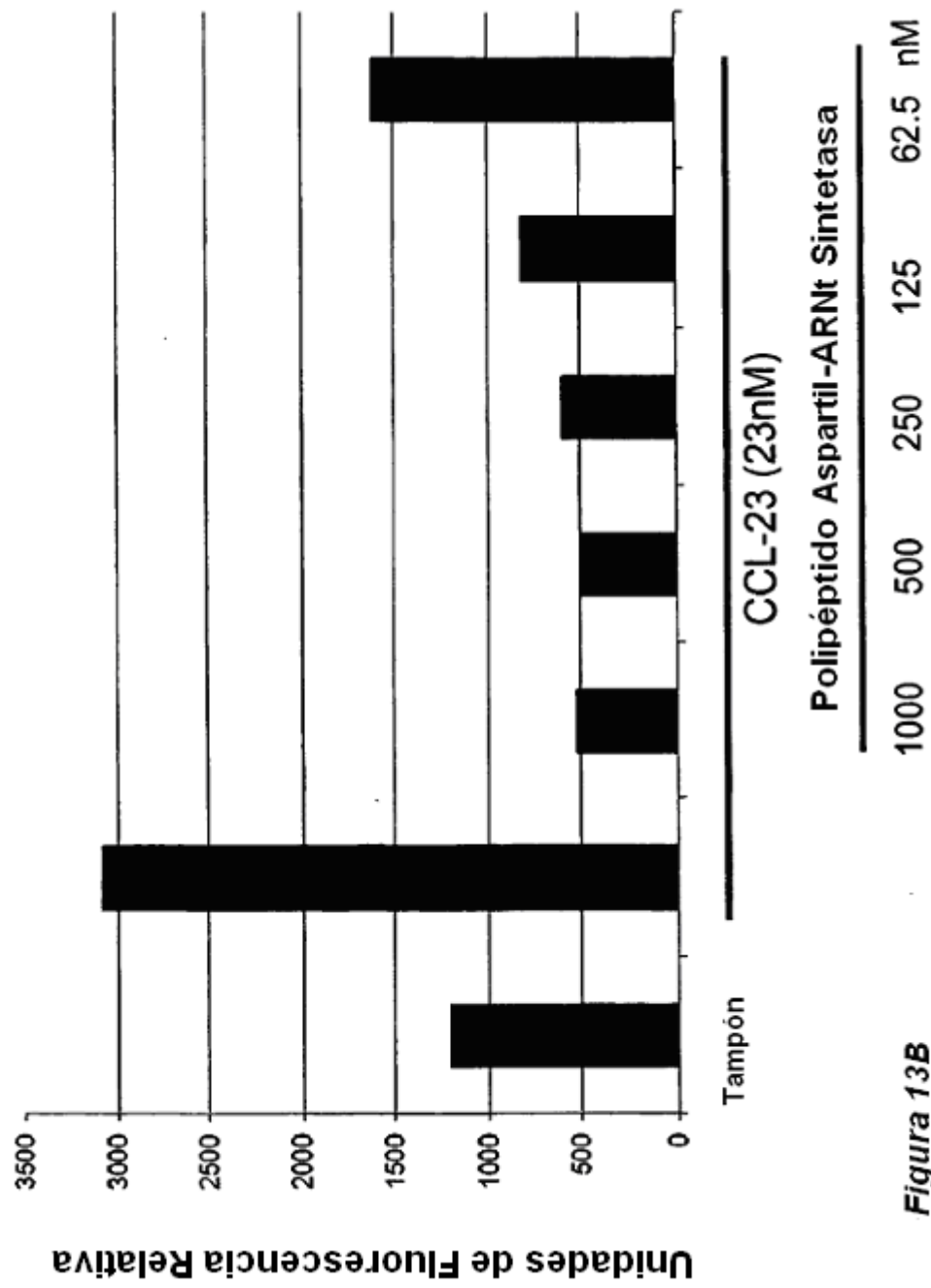


Figura 13B

El Polipéptido p43 Inhibe la Migración de Células THP-1 a CCL-5

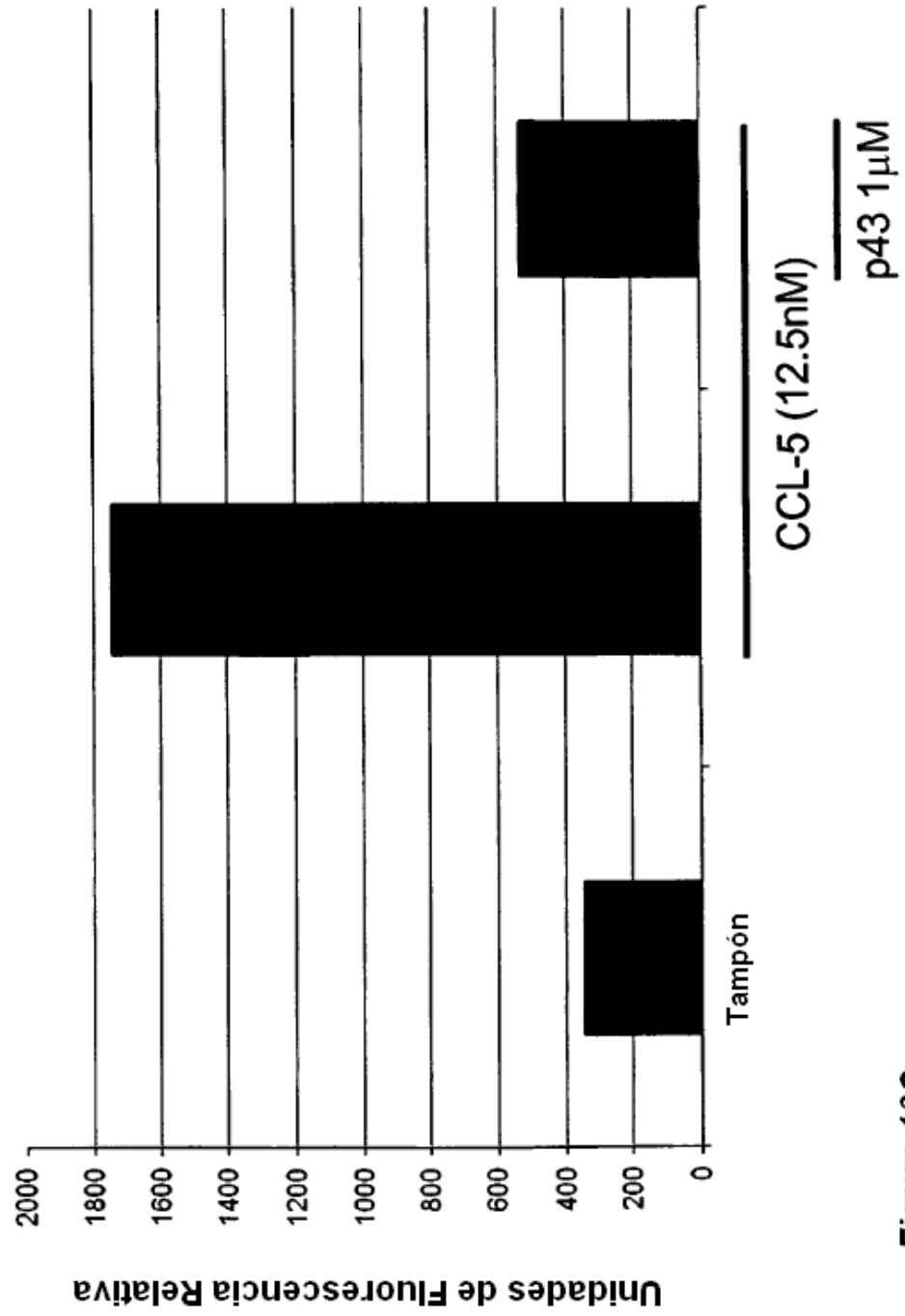


Figura 13C

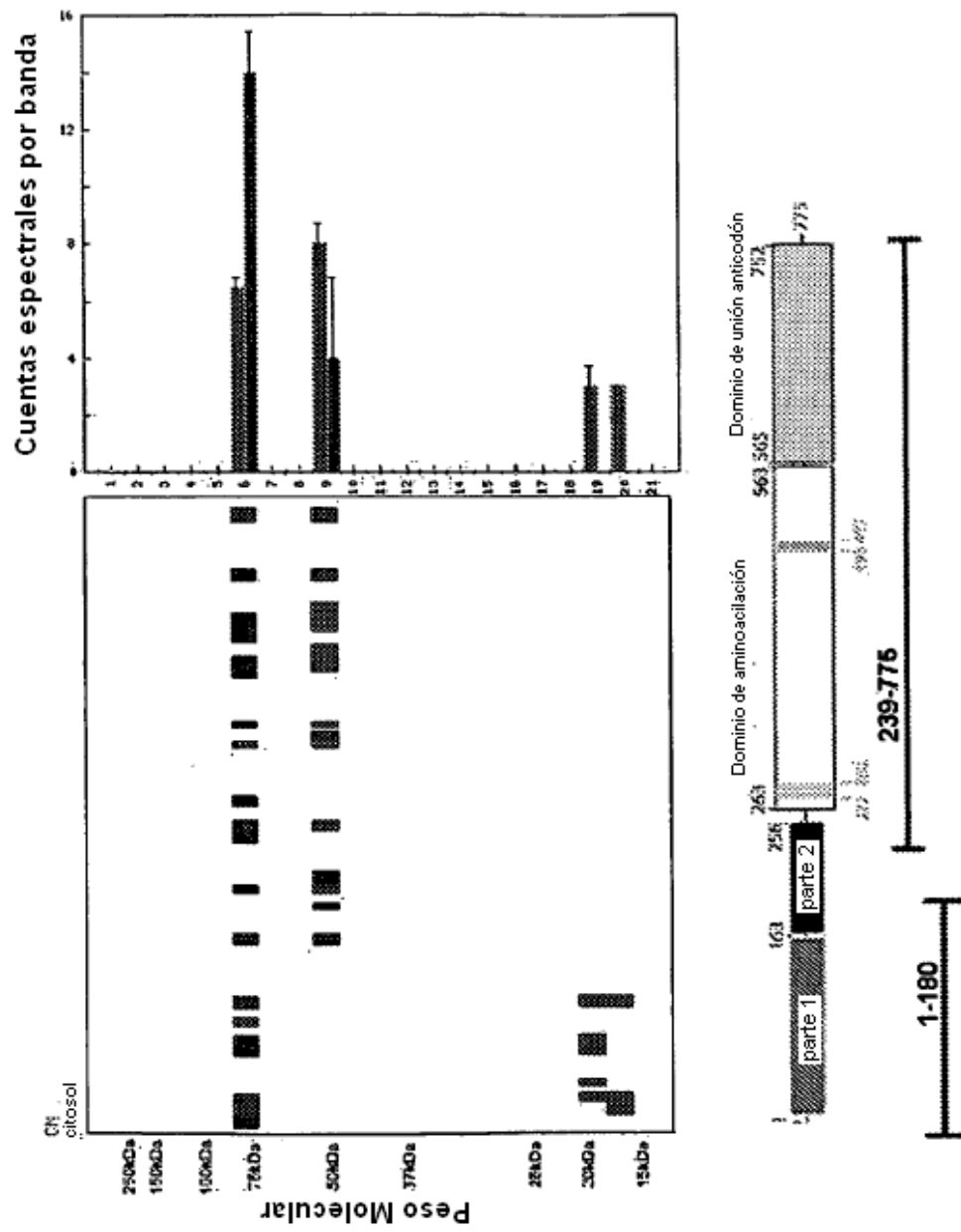


Figura 14

Banda 6 (QRS de longitud completa)

1 MATPDSLALFTGLGLSENKARETLKNEALSTQLREAAATQAHQILGSTIDKATGVLLYDLVSRLDTRRRSFLVSYIANKK
 81 IHTGLQLSAALEYVRSHPPQDPIDTKDFEQECGVGVVVTPEQIEEAVESTINKHQLQLLAERYRFRNMGLLMGEARAALRWA
 161 DGKMIKNEVDMQVLHLLGPKMEADLVKKPKVAKARLEETDRKTAADVKEGEVAGQILSLMEQLRGEALKFHKPGENYKT
 241 PGYVITPYTMDLLKQHLEITGGQVTRTFPPENPILHGHAKAINFNFGYAKANNNGICFLRFDDTNPEKEEAKFFTAIYD
 321 MVTWLGYPYKVITYASDYFDQLYAWAVELIHGGLAYVCHQVEELKGNPLPSPWRDRPKESLLLFEEAMRKGKFAEGEA
 401 TLRMKLVMEDEGKMDPVAYRVKYTPHRTGDKWCYPTYDYTHCLCDSIEHITSLCTKEFQARRSSYFWLNCNALKVYCPV
 481 QWEYGRNLNLHYAVVSKRKILQLVAAGAVRDWDDPRLFTLTALRRRGFPPEAINNFCARVGVTVQTTMEPHLLEACVRDV
 561 LNDAAAPRAMAVLEPLQVWITNFPAPKPLDIRVPNFPADETKGFHQVFPFASTVFIERSDFEKESEPGYKRLASGQPVGLRH
 641 TGYVIELQNIVRGSSGCVLEVTERRADAGEKPKAFIHWVSQPLVCEIRLYERLFFQHKNPEDPVEVPGGFLSDLNPA SL
 721 QVVEGALVDCSVALAKPFDKQFERLGYFSVDPDSHQGQIVFNRTVTTLKEDPGEI

Figura 15A

Banda 9 (fragmento C-terminal de QRS, péptidos que abarcan los residuos 239-final)

1 MATPDSLALFTGLGLSENKARETLKNEALSTQLREAAATQAHQILGSTIDKATGVLLYDLVSRLDTRRRSFLVSYIANKK
 81 IHTGLQLSAALEYVRSHPPQDPIDTKDFEQECGVGVVVTPEQIEEAVESTINKHQLQLLAERYRFRNMGLLMGEARAALRWA
 161 DGKMIKNEVDMQVLHLLGPKMEADLVKKPKVAKARLEETDRKTAADVKEGEVAGQILSLMEQLRGEALKFHKPGENYKT
 241 PGYVITPYTMDLLKQHLEITGGQVTRTFPPENPILHGHAKAINFNFGYAKANNNGICFLRFDDTNPEKEEAKFFTAIYD
 321 MVTWLGYPYKVITYASDYFDQLYAWAVELIHGGLAYVCHQVEELKGNPLPSPWRDRPKESLLLFEEAMRKGKFAEGEA
 401 TLRMKLVMEDEGKMDPVAYRVKYTPHRTGDKWCYPTYDYTHCLCDSIEHITSLCTKEFQARRSSYFWLNCNALKVYCPV
 481 QWEYGRNLNLHYAVVSKRKILQLVAAGAVRDWDDPRLFTLTALRRRGFPPEAINNFCARVGVTVQTTMEPHLLEACVRDV
 561 LNDAAAPRAMAVLEPLQVWITNFPAPKPLDIRVPNFPADETKGFHQVFPFASTVFIERSDFEKESEPGYKRLASGQPVGLRH
 641 TGYVIELQNIVRGSSGCVLEVTERRADAGEKPKAFIHWVSQPLVCEIRLYERLFFQHKNPEDPVEVPGGFLSDLNPA SL
 721 QVVEGALVDCSVALAKPFDKQFERLGYFSVDPDSHQGQIVFNRTVTTLKEDPGEI

Figura 15B

Banda 19 (fragmento N-terminal de péptidos QRS que abarcan inicio-180)

```

1  MATPDSLALFTGLSENKARETLKNEALSTQLREAAATQAHQILGSTIDKATGVLLYDLVSRRLDTRRRSFLVSYIANKK
81  IHTGLQLSAALEYVRSHPDPIIDTKDFEQECGVGVVVTPEQIEEAVESTINKHQQLQLLAERYRFNMGLLMGEARAALRWA
161  DGKMIKNEVDMQVLHLLGPKMEADLVKKPKVAKARLEETDRKTAQDVVEKGEVAGQILSLMEQLRGEALKFHKPGENYKT
241  PGYVITPYTMDLLKQHLEITGGQVTRFRPPENGIHGHAKA INFNFGYAKANNIGICFLRFDDTNPEKEEAKFFTAIYD
321  MVTWLGYPYKVITYASDYFDQLYAWAVELIHGGLAYVCHQORVEELKGNPLPSPWDRPKEESLLLFEAMRKKGKFAEGEA
401  TLRMKLVMEDEGKMDPVAYRVKYTPHRTGDKWCITYPTYDYTHCLCDSIEHITHSLCTKEFQARRSSYFWLNCNALKVYCPV
481  QWEYGRNLNLHYAVVSKRKILQLVAAGAVRDWDDPRLFTLTALRRRGFPPEAINNFCAVGVTVTAQTMEPHLLEACVRDV
561  LNDAAAPRAMAVLEPLQVITNFPAPKPLDIRVNPFPADETKGFHQVFPFASTVFIERSDFKEESEPGYKRLASGQPVGLRH
641  TGYVIELQNIVRGSSGCVLEVTCCRADAGEKPKAFIHWVSQPLVCEIRLYERLFQHKNPEDPVEVPGGFLSDLNPASL
721  QVVEGALVDCSVALAKPFDKQFERLGYFSVDPDPSHQGQIVFNRTVTLKEDPGEI

```

Figura 15C

Banda 20 (fragmento N-terminal de péptidos QRS que abarcan inicio-180)

```

1  MATPDSLALFTGLSENKARETLKNEALSTQLREAAATQAHQILGSTIDKATGVLLYDLVSRRLDTRRRSFLVSYIANKK
81  IHTGLQLSAALEYVRSHPDPIIDTKDFEQECGVGVVVTPEQIEEAVESTINKHQQLQLLAERYRFNMGLLMGEARAALRWA
161  DGKMIKNEVDMQVLHLLGPKMEADLVKKPKVAKARLEETDRKTAQDVVEKGEVAGQILSLMEQLRGEALKFHKPGENYKT
241  PGYVITPYTMDLLKQHLEITGGQVTRFRPPENGIHGHAKA INFNFGYAKANNIGICFLRFDDTNPEKEEAKFFTAIYD
321  MVTWLGYPYKVITYASDYFDQLYAWAVELIHGGLAYVCHQORVEELKGNPLPSPWDRPKEESLLLFEAMRKKGKFAEGEA
401  TLRMKLVMEDEGKMDPVAYRVKYTPHRTGDKWCITYPTYDYTHCLCDSIEHITHSLCTKEFQARRSSYFWLNCNALKVYCPV
481  QWEYGRNLNLHYAVVSKRKILQLVAAGAVRDWDDPRLFTLTALRRRGFPPEAINNFCAVGVTVTAQTMEPHLLEACVRDV
561  LNDAAAPRAMAVLEPLQVITNFPAPKPLDIRVNPFPADETKGFHQVFPFASTVFIERSDFKEESEPGYKRLASGQPVGLRH
641  TGYVIELQNIVRGSSGCVLEVTCCRADAGEKPKAFIHWVSQPLVCEIRLYERLFQHKNPEDPVEVPGGFLSDLNPASL
721  QVVEGALVDCSVALAKPFDKQFERLGYFSVDPDPSHQGQIVFNRTVTLKEDPGEI

```

Figura 15D

Células T Jurkat humanas tratadas con *Estauosporina* (STS) 4 horas

Banda 18

```

1  MPTCRLGPKFLLVSGVSAMAAALDSLSLFTSLGLSEQKARETLKNSALSQALREAAATQAQQTGLGSTIDKATGILLYGLASR
81  LRDTRRLSFLVSYIASKKIHTPEQLSAALEYVRSHPDLDPIDTVDFERECEGVGVIVTPEQIEEAEEAAINRHRPQLLVERY
161  HFNMGILLMGEARAVLKWADGKMIKNEVDMQVLLHLLGPKLEADLEKKFKVAKARLEETDRRTAKDVVENGETADQTLISLME
241  QLRGEALKFKHPGENYKTPGYVVTPTHMNLKQHLEITGGQVTRFPPEPENGILHGHAKAINFNFYAKANNNGICFLRF
321  DDTNPEKEEAKFFTAICDMVAVNLGYTPYKVTYASDYFDQLYAWAVELIRRGALAYVCHQGEELKGHNLTLPSPWRDRPMEE
401  SLLLFEMRKGFSEGEATLRMKLVMDGKMDPVAYRVKYPHRTGDKWCITYTYDTHCLCDSIEHITHSLCTKEFQA
481  RRSSYFWLNCNALDVYCPVQWEYGRNLHYAVWSKRKILQLVATGAVRDWDDPRLFTLTALRRRGFPPEAINNFCAARVGVV
561  VAQTTMEPHLLEACVRDVLNDTAPRAMAVLESRLVITNFPAAKSLDIQVPNFPADETKGFHQVFPFAPIVFIERTDFKEE
641  PEPGFKRLANGQPVGLRHTGYVIELQHVVGKPGSCVESLEVTCCRADAGEKPKAFIHWVSQPLMCEVRLYERLFFQHKNP
721  DPTEVPGGFLSDNLNLASLHVVDAAALVDCSVALAKPDKFQFERLGYFSVDPDSHQGKLVFNRTVTLKEDPGKV

```

Figura 16A

Banda 19

```

1  MPTCRLGPKFLLVSGVSAMAAALDSLSLFTSLGLSEQKARETLKNSALSQALREAAATQAQQTGLGSTIDKATGILLYGLASR
81  LRDTRRLSFLVSYIASKKIHTPEQLSAALEYVRSHPDLDPIDTVDFERECEGVGVIVTPEQIEEAEEAAINRHRPQLLVERY
161  HFNMGILLMGEARAVLKWADGKMIKNEVDMQVLLHLLGPKLEADLEKKFKVAKARLEETDRRTAKDVVENGETADQTLISLME
241  QLRGEALKFKHPGENYKTPGYVVTPTHMNLKQHLEITGGQVTRFPPEPENGILHGHAKAINFNFYAKANNNGICFLRF
321  DDTNPEKEEAKFFTAICDMVAVNLGYTPYKVTYASDYFDQLYAWAVELIRRGALAYVCHQGEELKGHNLTLPSPWRDRPMEE
401  SLLLFEMRKGFSEGEATLRMKLVMDGKMDPVAYRVKYPHRTGDKWCITYTYDTHCLCDSIEHITHSLCTKEFQA
481  RRSSYFWLNCNALDVYCPVQWEYGRNLHYAVWSKRKILQLVATGAVRDWDDPRLFTLTALRRRGFPPEAINNFCAARVGVV
561  VAQTTMEPHLLEACVRDVLNDTAPRAMAVLESRLVITNFPAAKSLDIQVPNFPADETKGFHQVFPFAPIVFIERTDFKEE
641  PEPGFKRLANGQPVGLRHTGYVIELQHVVGKPGSCVESLEVTCCRADAGEKPKAFIHWVSQPLMCEVRLYERLFFQHKNP
721  DPTEVPGGFLSDNLNLASLHVVDAAALVDCSVALAKPDKFQFERLGYFSVDPDSHQGKLVFNRTVTLKEDPGKV

```

Figura 16B

Células T Jurkat humanas tratadas con Estaurosporina STS 6 horas

Banda 18

```

1  MPTCRLGPKFLLVSGVSAMAAALDSLSLFTSLGLSEKARETLKNSALSAQLREAAATQAQQTGLGSTIDKATGILLYGLASR
81  LROTRRLSFLVSYIASKKIHTEPQLSAALEYVRSHPLDPIDTVDFERECEGVGVITVTPQIEEAEEAAINRHRPQLLVERY
161  HFNMGLLMGEARAVLKWADGKMIKNEVDMQVLHLLGPKLEADLEKKFKVAKARLEETDRRTAKDVVENGETADQTLISLME
241  QLRGEALKFHKPGENYKTPGYVVTPHTMNLKQHLEITGGQVTRFRPPEPNGILHIGHAKAINFNFGYAKANNNGICFLRF
321  DDTPNPEKEEAKFFTAICDMVANLGYTPYKVTYASDYFDQLYAWAVELIRRGLAYVCHQGEELKGHNTLPSPWDRPMEE
401  SLLIFEAMRKGFSEGEATLRMKLVMEDEGKMDPVA YRVKYTPPHRTGDKWC IYPTYDYTHCLCDSIEHITHSLCTKEFQA
481  RRSYFWLCNALDVYCPVQWEYGRNLNHYAVVSKRKILQLVATGAVROWDDPRLFTLTALRRRGFPPEAINNFCARVGVT
561  VAQTTMEPHILLEACVRDVLNDTAPRAMAVLES LRVIITNFPAAKSLDIQVPNFPADETKGFGHQVFPFPIVFIERTDFKEE
641  PEPGFKRLANGQPVGLRHTGYVIELQHVVKGPSGCVESLEVTCRRADAGEKPKAFIHWVSQPLMCEVRLYERLFQHKNP
721  DPTEVPGGFLSDNLASLHWVDAALVDCSVALAKPDKFQFERLGYFSVDPDSSHQKLVFNRTVTTLKEDPGKV

```

Figura 16C