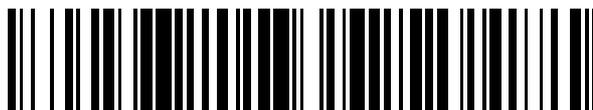


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 674**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/10** (2006.01)

**C07K 19/00** (2006.01)

**C12N 15/54** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/573** (2006.01)

**A61K 38/43** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2010 E 10764856 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 2414513**

54 Título: **Composiciones y procedimientos que comprenden aspartil-ARNt sintetasas con actividades biológicas no canónicas**

30 Prioridad:

**31.03.2009 US 165194 P**

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

**22.02.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ADAMS, RYAN A.;  
HONG, FEI;  
ZHAO, JI;  
PIEHL, KRISTI;  
ARMOUR, EVA R.;  
D'ARIGO, KENNY;  
GREENE, LESLIE A. y  
MERRIMAN, EVE**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 560 674 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

Composiciones y procedimientos que comprenden aspartil-ARNt sintetetasas con actividades biológicas no canónicas.

### 5 Campo técnico

La presente descripción se refiere en general a formas de polipéptidos de aspartil-ARNt sintetetasa (AspRS), composiciones que comprenden dichos polipéptidos y procedimientos de utilización de los mismos.

### 10 Descripción de la técnica

Las aminoacil-ARNt sintetetasas, que catalizan la aminoacilación de moléculas de ARNt, son esenciales para descodificar la información genética durante el proceso de traducción. En organismos eucariotas superiores, las aminoacil-ARNt sintetetasas se asocian con otros polipéptidos para formar complejos multienzimáticos  
15 supramoleculares. Cada una de las ARNt sintetetasas eucarióticas consiste en una enzima nuclear, que está estrechamente relacionada con su equivalente procariótica de la ARNt sintetetasa, y en un dominio adicional que se añade al extremo amino-terminal o carboxilo-terminal de la enzima nuclear. La tirosil-ARNt sintetetasa humana (TyrRS), por ejemplo, tiene un dominio carboxilo-terminal que no forma parte de moléculas TyrRS procariotas y eucariotas inferiores.

20

Se ha demostrado que varias aminoacil-ARNt sintetetasas tienen funciones no canónicas distintas de su participación en la traducción. Por ejemplo, la minitirosil ARNt sintetetasa (miniTyrRS), el dominio N-terminal de TyrRS que corresponde a los residuos de aminoácido 1-364 y se escinde por la elastasa y la plasmina de las células polimorfonucleares, forma parte de las proteínas y péptidos de tipo citoquina multifunción de aminoacil-ARNt  
25 sintetetasa «AARS». *In vitro*, se ha observado que la miniTyrRS estimula la activación y la quimiotaxis de neutrófilos, la proliferación y migración celular endotelial y que es pro-angiogénica en la membrana corioalantoidea de pollo (CAM) y en ensayos de matrigel de ratón. La miniTyrRS tiene un motivo ELR que, como las quimioquinas CXC tales como IL-8, está implicado en sus actividades quimioquinas y angiogénicas. Al igual que en otras citoquinas que contienen ELR, la mutación de este motivo inhibe la unión de miniTyrRS y la estimulación de leucocitos y la  
30 angiogénesis.

Además, se ha demostrado que las formas truncadas de TrpRS tienen propiedades angiogénicas. En las células humanas normales, hay dos formas de TrpRS que se pueden detectar: una forma principal que consiste en la molécula completa (residuos de aminoácidos 1-471) y una forma truncada minoritaria. La forma minoritaria se  
35 genera por delección de un dominio amino-terminal a través de un splicing alternativo del pre-ARNm. Se ha determinado que el amino-terminal de miniTrpRS es el residuo de metionina de la posición 48 de la molécula de TrpRS completa. Alternativamente, la TrpRS truncada se puede generar por proteólisis. Por ejemplo, la TrpRS bovina se expresa altamente en el páncreas y se secreta en el jugo pancreático, dando como resultado la producción de una molécula de TrpRS truncada. Otros estudios indican que la miniTyrRS inhibe la proliferación y la  
40 migración celulares inducidas por VEGF (Wakasugi *et ál.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 99: 173-177 [2002]). En particular, un ensayo de CAM de pollo demuestra que las mini TrpRS bloquea la actividad angiogénica de VEGF. En contraste, la TrpRS de longitud completa no inhibe la angiogénesis. De ese modo, la eliminación de los primeros 48 residuos de aminoácidos expone la actividad anti-angiogénica de la TrpRS. Por lo tanto, como con TyrRS, determinadas formas de TrpRS poseen actividades distintas de la aminoacilación de ARNt.

45

El documento WO 2007/139397 describe fragmentos de polipéptido de aspartil-ARNt sintetetasa obtenibles a partir de especies bacterianas.

El documento WO 01/75067 describe genotecas de polinucleótidos y polipéptidos que comprenden un polipéptido de  
50 aspartil-ARNt sintetetasa con 550 aminoácidos.

Teniendo en cuenta estas observaciones de las actividades no canónicas y terapéuticamente relevantes asociadas a formas alternativas de TyrRS y TrpRS, es necesario identificar formas o actividades de otras proteínas de aminoacil-ARNt sintetetasa biológicamente relevantes con el fin de explotar todo el potencial terapéutico de esta familia de  
55 proteínas. En consecuencia, la presente descripción aborda dichas necesidades y ofrece otras ventajas relacionadas.

## RESUMEN DE LA INVENCION

- La presente invención se deriva del descubrimiento de que ciertos polipéptidos de aspartil-ARNt sintetasa (AspRS) poseen actividades biológicas no canónicas de relevancia terapéutica. En consecuencia, según un aspecto, la presente descripción presenta polipéptidos de AspRS aislados con al menos una actividad biológica no canónica, así como fragmentos y variantes activas de los mismos que sustancialmente conservan dicha actividad no canónica. La
- 5 actividad «no canónica», tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere en general a una actividad propia de un polipéptido de AspRS, tal como se describe en el presente documento, distinta de la aminoacilación y, más concretamente, distinta de la adición de ácido aspártico a una molécula ARNt<sup>Asp</sup>. Como se detalla en el presente documento, en determinadas realizaciones descritas en este documento, una actividad biológica no canónica exhibida por un polipéptido de AspRS puede incluir, aunque no exclusivamente, la modulación de la proliferación
- 10 celular, la modulación de la apoptosis, la modulación de la inflamación, la modulación de la diferenciación celular, la modulación de la angiogénesis, la modulación de la unión celular, la modulación de la señalización celular mediada por Akt, la modulación del metabolismo celular, la modulación de la producción o actividad de citoquinas y la modulación de la señalización del receptor de tipo toll y similares.
- 15 En determinadas realizaciones descritas en este documento, el polipéptido de AspRS es un fragmento contiguo de una proteína de AspRS de longitud completa de mamífero. En una realización más específica descrita en este documento, el polipéptido de AspRS es un fragmento contiguo de la secuencia de la proteína de AspRS humana expuesta en la SEQ ID NO: 1. De forma ilustrativa, los fragmentos pueden ser esencialmente de cualquier longitud, siempre que no sean de longitud completa y que además conserven al menos una actividad biológica no canónica
- 20 de interés. En determinadas realizaciones ilustrativas descritas en este documento, un polipéptido de AspRS estará en un intervalo aproximado de tamaño de 20-50, 20-100, 20-200, 20-300, 20-400 o 20-500 aminoácidos de longitud. En otras realizaciones descritas en este documento, el polipéptido de AspRS estará en un intervalo aproximado de tamaño de 50-100, de 50-200, 50-300, 50-400 o 50-500 aminoácidos de longitud. En otras realizaciones descritas en este documento, el polipéptido de AspRS descrito estará en un intervalo aproximado de tamaño de 100-200, 100-
- 25 300, 100-400 o 100-500 aminoácidos de longitud. Y en otras realizaciones ilustrativas descritas en este documento, el polipéptido de AspRS estará en un intervalo aproximado de tamaño de 200-300, 200-400 o 200-500 aminoácidos de longitud.
- En otras realizaciones descritas en este documento, un polipéptido de AspRS comprende una variante activa (es
- 30 decir, conserva al menos una actividad biológica no canónica de interés) de un fragmento de una secuencia de la proteína AspRS, como la secuencia de proteína AspRS humana expuesta en la SEQ ID NO: 1. En una realización más específica descrita en este documento, la variante activa es un polipéptido con al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de su longitud con una secuencia de aspartil-ARNt sintetasa humana expuesta en la SEQ ID NO: 1.
- 35 Otras realizaciones descritas en este documento presentan variantes de splicing y mutantes puntuales de AspRS, generadas de forma natural o no natural, que tengan una o más actividades no canónicas. En determinadas realizaciones descritas en este documento, la AspRS comprende un dominio de hélice anfifílica.
- 40 En una realización más específica descrita en este documento, un polipéptido de AspRS comprende un fragmento de la secuencia de AspRS humana de la SEQ ID NO: 1, que consiste esencialmente en residuos de aminoácidos 1-154, 1-171, 1-174, 1-31, 399-425, 413-476 o 397-425 o de un fragmento o variante activa de los mismos que conserve sustancialmente al menos una actividad biológica no canónica de interés.
- 45 En otras formas de realización específicas descritas en este documento, el polipéptido de AspRS no es un polipéptido como el expuesto en el registro NCBI N.º NP001340.
- Según otro aspecto descrito en este documento, hay proteínas de fusión que comprenden al menos un polipéptido de AspRS como los aquí descritos y una pareja de fusión heteróloga.
- 50 Según otro aspecto descrito en este documento, hay polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos y proteínas de fusión como aquí se describe, así como vectores de expresión que comprenden dichos polinucleótidos y células huésped que comprenden dichos vectores de expresión. También se incluyen los oligonucleótidos que hibridan específicamente con un polinucleótido de AspRS. En determinadas realizaciones descritas en este
- 55 documento, el oligonucleótido es un cebador, una sonda o un oligonucleótido antisentido. Otras realizaciones descritas en este documento se refieren a agentes ARNi cuyo objetivo es un polinucleótido AspRS.
- Según otro aspecto de la descripción, hay agentes de unión (p. ej., anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos) que tienen especificidad de unión con un polipéptido de AspRS como los aquí descritos o una de sus

parejas de unión celular. En determinadas realizaciones descritas en este documento, el agente de unión es un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno del mismo, un péptido, un péptido mimético, una molécula pequeña o un aptámero. En algunas formas de realización descritas en el presente documento, el agente de unión actúa como antagonista de una actividad no canónica del polipéptido de AspRS. En otras formas de realización descritas en el presente documento, el agente de unión actúa como agonista de una actividad no canónica del polipéptido de AspRS.

Según otro aspecto de la descripción, hay composiciones como, p. ej., composiciones farmacéuticas, que comprenden vehículos fisiológicamente aceptables y al menos uno de los polipéptidos aislados, proteínas de fusión, agentes de unión como anticuerpos, polinucleótidos aislados, vectores de expresión, células huésped, etc., como se describe en el presente documento.

Determinadas realizaciones descritas en este documento se refieren a procedimientos para determinar la presencia o los niveles de un polipéptido de AspRS en una muestra, que comprenden poner en contacto la muestra con uno o más agentes de unión que unen específicamente a un polipéptido de AspRS como se describe en el presente documento, detectando la presencia o ausencia del agente de unión y determinando de ese modo la presencia o los niveles del polipéptido de AspRS. Determinadas realizaciones descritas en este documento incluyen procedimientos para determinar la presencia o los niveles de un polipéptido de AspRS en una muestra, que comprenden introducir la muestra en un detector molecular capaz de identificar específicamente un polipéptido de AspRS como se describe en el presente documento, y determinando de ese modo la presencia o los niveles del polipéptido de AspRS. En formas de realización específicas descritas en el presente documento, el detector molecular es un espectrómetro de masas (MS, mass spectrometer). Determinadas realizaciones descritas en este documento incluyen la comparación de la presencia o los niveles del fragmento de proteína de AspRS con una muestra de control o un valor predeterminado. Algunas formas de realización descritas en el presente documento incluyen caracterizar el estado de la muestra para distinguirla de la de control. En formas de realización específicas descritas en el presente documento, la muestra y la de control comprenden una célula o tejido y el procedimiento comprende la distinción entre células o tejidos de diferentes especies, células de diferentes tejidos u órganos, células en diferentes estadios de desarrollo celular, células en diferentes estadios de diferenciación celular o células sanas y enfermas.

También se describen en este documento procedimientos de identificación de un compuesto que se une específicamente a un polipéptido de AspRS o una o más de una de sus parejas de unión celular, que comprenden a) combinar el polipéptido de AspRS o su pareja de unión celular o ambos con al menos un compuesto de ensayo en condiciones adecuadas y b) detectar la unión del polipéptido de AspRS o su pareja de unión celular o ambos al compuesto de ensayo, identificando de ese modo un compuesto que se une específicamente al polipéptido de AspRS o su pareja de unión celular o ambos. En determinadas realizaciones descritas en este documento, el compuesto de ensayo es un polipéptido o péptido, un fragmento de unión a antígeno del mismo, un péptido mimético o una molécula pequeña. En algunas realizaciones descritas en este documento, el compuesto de ensayo actúa como agonista de una actividad biológica no canónica del polipéptido de AspRS o su pareja de unión celular. En otras formas de realización descritas en el presente documento, el compuesto de ensayo actúa como antagonista de una actividad biológica no canónica del polipéptido de AspRS o su pareja de unión celular. También se describen en este documento compuestos identificados por cualquiera de los procedimientos recogidos en este documento.

En otros aspectos, también se describen en este documento procedimientos para modular una actividad celular poniendo en contacto una célula o tejido con una composición descrita, tal como se recoge en el presente documento, donde la actividad celular que debe modularse se selecciona entre el grupo que consiste en migración celular, proliferación celular, apoptosis, inflamación, diferenciación celular, angiogénesis, modulación de la unión celular, señalización celular mediada por Akt, metabolismo celular, producción de citoquinas y señalización del receptor de tipo toll y similares. En determinadas realizaciones descritas en este documento, la actividad celular es la producción de citoquinas. En formas de realización específicas descritas en el presente documento, la citoquina es alguna o varias entre IL1- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, MIP1- $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , GRO- $\alpha$ , MCP-1 o IL-1ra. En algunas formas de realización descritas en el presente documento, la actividad celular es la señalización del receptor de tipo toll (TLR). En formas de realización particulares descritas en el presente documento, el TLR es TLR2, TLR4 o ambos. Determinadas realizaciones descritas en este documento incluyen procedimientos para estimular una respuesta inmune innata. En algunas realizaciones descritas en este documento, la célula está en un sujeto.

En otros aspectos descritos en este documento, la presente descripción proporciona procedimientos para tratar una enfermedad, trastorno u otra afección en un sujeto que lo necesite mediante la administración de una composición conforme a la presente descripción. A modo de ejemplo, tales enfermedades, trastornos o afecciones pueden incluir, aunque sin limitarse a ellas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades neoplásicas (p.

ej., cánceres), enfermedades metabólicas, enfermedades neurológicas, infecciones, enfermedades cardiovasculares y enfermedades asociadas con angiogénesis anormal.

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS IDENTIFICADORES DE SECUENCIA**

- 5 SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la aspartil-ARNt sintetasa humana (AspRS).  
SEQ ID NO: 2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de AspRS de la SEQ ID NO: 1.
- 10 SEQ ID NO: 3 es la secuencia aminoacídica de 32 aminoácidos de un péptido de AspRS humana.  
SEQ ID NO: 4 es la secuencia aminoacídica de 32 aminoácidos de un péptido de AspRS de rata.  
SEQ ID NO: 5 es una secuencia consenso de los residuos con carga positiva de la hélice anfífilica de AspRS.
- 15 SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos de una porción de una hélice N-terminal de AspRS de mosquito Anopheles.  
SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos de una porción de una hélice N-terminal de AspRS de garrapata.
- 20 SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos de una porción de una hélice N-terminal de AspRS de lapa *Lottia gigantea*.  
SEQ ID NO: 9 es la secuencia de aminoácidos de una porción de una hélice N-terminal de AspRS de una sanguijuela.
- 25 SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácidos de una porción de una hélice N-terminal de AspRS de rana *Xenopus*.  
SEQ ID NO: 11 es la secuencia de aminoácidos de una porción de una hélice N-terminal de AspRS de pez globo.  
SEQ ID NO: 12 es la secuencia de aminoácidos de una porción de una hélice N-terminal de AspRS de un pez globo verde moteado (*Tetraodon nigroviridis*).
- 35 SEQ ID NO: 13 es la secuencia de aminoácidos de una porción de la hélice N-terminal de AspRS de pez espinoso.  
SEQ ID NO: 14 es la secuencia de aminoácidos de una porción de la hélice N-terminal de AspRS de un pollo.  
SEQ ID NO: 15 es la secuencia de aminoácidos de una porción de la hélice N-terminal de AspRS de un bovino.
- 40 SEQ ID NO: 16 es la secuencia de aminoácidos de una porción de la hélice N-terminal de AspRS de una rata.  
SEQ ID NO: 17 es la secuencia de aminoácidos de una porción de la hélice N-terminal de AspRS de un ratón.
- 45 SEQ ID NO: 18 es la secuencia de aminoácidos de una porción de la hélice N-terminal de AspRS de un damán de El Cabo.  
SEQ ID NO: 19 es la secuencia de aminoácidos de una porción de la hélice N-terminal de AspRS de una zarigüeya.
- 50 SEQ ID NO: 20 es la secuencia de aminoácidos de una porción de la hélice N-terminal de AspRS de tarsero.  
SEQ ID NO: 21 es la secuencia de aminoácidos de una porción de la hélice N-terminal de AspRS de un orangután.  
SEQ ID NO: 22 es la secuencia de aminoácidos de una porción de la hélice N-terminal de AspRS de un chimpancé.
- 55 SEQ ID NO: 23 es la secuencia de aminoácidos de una porción de una hélice N-terminal de AspRS humana.

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Las figuras 1A-1D muestran (A) la estructura de dominio y (B) la secuencia de aminoácidos de AspRS (SEQ ID NO: 1), e ilustran (C y D) la separación SDS-PAGE de fragmentos de AspRS generados por proteólisis controlada de la proteína completa de AspRS con elastasa de neutrófilos humana. La Figura 1C es un gel de SDS-PAGE, 4-12% MOPS, que muestra la AspRS de longitud completa y la digestión con PMN elastasa. La Figura 1D es un gel de SDS-PAGE, 12% MES, que muestra la AspRS de longitud completa y la digestión con PMN elastasa.

Las Figuras 2A-2B demuestran la activación de Akt en células endoteliales (BAEC) tratadas con fragmentos de AspRS (también conocidos como DRS) descritos. La Figura 2A muestra la fosforilación de Akt inducida por el tratamiento con un grupo de fragmentos de AspRS generados con elastasa, y la Figura 2B muestra la evolución temporal de la fosforilación de Akt por grupos seccionados de AspRS.

La Figura 3 muestra el aumento de la secreción de TNF- $\alpha$  por células mononucleares de sangre periférica (PBMC) tratadas con un fragmento de AspRS descrito, siendo D1, en comparación con la secreción de TNF- $\alpha$  por las PBMC tratadas con AspRS de longitud completa (DRS) o con el control positivo, un polipéptido activador de monocitos y endotelios II (EMAP). Las PBMC fueron tratadas durante 24 horas con proteína D1, DRS, o EMAP II y analizadas en busca de secreción de TNF- $\alpha$ .

La Figura 4 muestra citoquinas características secretadas después de tratar las PBMC con el fragmento de AspRS D1. Las PBMC fueron tratadas durante 24 horas y analizadas en busca de secreción de 27 citoquinas diferentes y se observó que aumentaba la secreción de IL-1- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, MIP1- $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , GRO- $\alpha$ , MCP-1 e IL-1ra.

La Figura 5 muestra que el fragmento de AspRS D1 activa los monocitos en un tipo de célula de manera específica. Las PBMC fueron tratadas durante 24 horas con PBS como control negativo, PHA como control positivo y el fragmento de AspRS D1, y fueron analizadas para detectar marcadores de superficie celular de activación en monocitos y linfocitos.

La Figura 6 muestra que el fragmento de AspRS D1 induce la secreción de TNF- $\alpha$  a partir de líneas celulares de monocitos (p. ej., THP-1) y macrófagos (p. ej., RAW 267.7) líneas celulares.

La Figura 7 muestra que el fragmento de AspRS D1 induce la quimiotaxis de una línea celular de macrófagos. La Figura 7A muestra la configuración experimental para la migración de células de ensayo utilizando una cámara Boyden y la Figura 1B muestra que las células de macrófagos RAW 264.7 migran de forma dependiente de la dosis hacia el fragmento D1.

La Figura 8 muestra que la secreción de TNF- $\alpha$  mediada por el fragmento de AspRS D1 en monocitos THP-1 es inhibida por un inhibidor de MEK (UO126), un componente clave de la ruta de señalización de la MAP quinasa, pero no por un inhibidor de la señalización de la quinasa PI3 (LY294022). Se utiliza LPS como control positivo y ambos inhibidores bloquean su actividad.

La Figura 9 muestra que el fragmento de AspRS D1 inhibe la angiogénesis inducida por VEGF. Se implantaron en ratones soluciones de Matrigel que contenían PBS, sunitinib o un fragmento de D1 en combinación con VEGF y se analizaron en busca de nuevas infiltraciones de vasos sanguíneos en el tapón de Matrigel.

La Figura 10 muestra los resultados de un experimento que sugieren que la región N-terminal del fragmento de AspRS D1 es responsable de su actividad citoquina. La presencia de una etiqueta de afinidad 6xhis en el N-terminal de D1, en comparación con el C-terminal de D1, reduce la actividad de secreción de TNF- $\alpha$  del fragmento.

La Figura 11 muestra que el fragmento de AspRS D1 contiene una secuencia de 32 aminoácidos específica de los mamíferos en su N-terminal SEQ ID NO: 3 es el péptido de 32 aminoácidos de AspRS humana y SEQ ID NO: 4 es el péptido de 32 aminoácidos de AspRS de rata. Un péptido de 32 aminoácidos que se encuentre sólo en el N-terminal de AspRS de mamíferos, y no en AspRS de levadura, es prescindible para la actividad canónica de ARNt sintetasa y se prevé que contenga una posible hélice (véase Jacobo-Molina y Yang [1989] y Escalante y Yang, JBC [1992]).

La Figura 12 muestra la identificación, evolución y cristalización del fragmento de AspRS D1 humano. La Figura 12A muestra los pasos mediante los que se sometió a los macrófagos de ratón RAW264.7 a análisis SDS-PAGE. Se cortaron bandas de proteínas y se analizaron mediante LC MS/MS y se identificó un fragmento N-terminal de AspRS como D1. La Figura 12B muestra que el N-terminal de AspRS añadido es un dominio evolucionado. La Figura 12C muestra la estructura cristalina de un dímero completo de AspRS humana resuelto con una resolución de 1,9Å. Se indican el dominio de unión del anticodón del N-terminal ARNt, el dominio de aminoacilación y el conector de 30

aminoácidos que une el fragmento D1 y el dominio de aminoacilación.

La Figura 13 muestra que D1 induce la secreción proinflamatoria y antiinflamatoria de citoquinas *in vivo* e *in vitro*. La Figura 13A muestra los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-10 en suero *in vivo* de ratones inyectados por vía intravenosa con 10 mg/kg D1. Los ratones presentan un aumento de TNF- $\alpha$  al cabo de 2 horas que se elimina rápidamente a las 6 horas mientras que los niveles de IL-10 siguen aumentando. La figura 13B muestra la liberación de TNF- $\alpha$  e IL-10 *in vitro* por parte de las PBMC al cabo de 4 y 24 horas respectivamente. Las células presentan un aumento con tratamiento de D1 (250 nM), pero no con AspRS de longitud completa (250 nM). LPS (10 EU) también presenta una fuerte respuesta de TNF- $\alpha$ . El análisis de citometría de flujo de la Figura 13C revela una unión de D1 al 83 % de los monocitos primarios y al 14 % de la población total de linfocitos. Entre los linfocitos primarios, D1 se une al 76 % de las células B CD19 +.

La figura 14 muestra que D1 activa el NF-kB a través de los receptores de tipo toll 2 y 4 (TLR2 y TLR4). La figura 14A muestra que D1 activa el NF-kB de los macrófagos de ratón RAW 264.7. Las células RAW-Blue, que codifican un gen reportero secretado de fosfatasa alcalina embrionaria inducible por NF-kB, mostraron una activación dependiente de la dosis del NF-kB con D1 en comparación con la falta de la activación por AspRS. Como se muestra en la Figura 14B, D1 (1 $\mu$ M) activa la sobreexpresión de células HEK293 tanto de TLR2 como de TLR4 mientras AspRS (1 $\mu$ M) no mostró actividad. Las células HEK293 transfectadas establemente que expresan TLR2 o TLR4 con un reportero inducible por NF-kB demostraron que D1 puede inducir la activación de NF-kB. En la Figura 14C, la citometría de flujo muestra que D1 se une a células HEK sobreexpresadas en TLR2 o TLR4 pero no a células de control.

La Figura 15 muestra una caracterización de la actividad D1, relacionada en parte con la hélice anfifílica N-terminal. La rueda helicoidal de la Figura 15A representa el N-terminal de la AspRS humana y revela una hélice anfifílica. La alineación de la Figura 15B (SEQ ID NO: 6-23, de arriba abajo) representa dos mutantes D1 diseñados con vistas a la hélice N-terminal; una triple mutación de alanina (AAA) para neutralizar los residuos con carga negativa y un mutante de inversión parcial de carga (SKK) que representa la secuencia de la levadura. La Figura 15C muestra un aumento *in vitro* de la liberación de TNF- $\alpha$  e IL-10 de PBMC después de 24 tratamientos con D1 (50 nM) pero no con AspRS de longitud completa (50 nM) ni con el mutante  $\Delta$ 22 (50 nM); los mutantes de carga (AAA y SKK) también presentan una disminución de actividad. La Figura 15D ilustra cómo puede liberarse D1 a partir de células de macrófagos y unirse a monocitos, células T y células B a través de los receptores TLR2 y TLR4 para provocar una respuesta proinflamatoria temprana de liberación de TNF- $\alpha$ , seguida por una respuesta antiinflamatoria de liberación de IL-10.

La Figura 16 muestra que la actividad de D1 no se debe a la contaminación por endotoxinas. En la Figura 16A, el D1 de mamífero expresado induce la secreción de citoquinas en células mononucleares de sangre periférica (PBMC). D1 se expresó con una secuencia de secreción convencional en células HEK293. Se recogieron, concentraron e incubaron con PBMC los medios acondicionados que contenían la D1 secretada; los medios que contenían la D1 indujeron una liberación de TNF- $\alpha$  que no se observó en los medios transfectados simulados. Como se muestra en la Figura 16B, la actividad de D1 es independiente de la contaminación por endotoxinas; la liberación de citoquinas de D1 no se alteró en presencia de la polimixina B, un desactivador de endotoxina, mientras que se inhibió completamente el lipopolisacárido (LPS). La Figura 16C muestra que la digestión de D1 por la proteinasa K suprime la capacidad de estimulación de la citoquina PBMC. La D1 fue digerida por completo en tratamiento nocturno con proteinasa K, se añadió la D1 digerida a las PBMC y se midió la TNF- $\alpha$  mediante ELISA.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención es conforme a lo dispuesto en las reivindicaciones. En la práctica de la presente invención se emplearán, a menos que se indique específicamente lo contrario, los procedimientos convencionales de biología molecular y las técnicas de ADN recombinante convenientes, muchos de los cuales se describen a continuación con fines ilustrativos. Dichas técnicas se explican íntegramente en la bibliografía. Véase, p. ej., Sambrook, *et ál.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2.<sup>a</sup> edición, 1989); Maniatis *et ál.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); Animal Cell Culture (R. Freshney, ed., 1986); A Practical Guide to Molecular Cloning (B. Perbal, ed., 1984).

#### Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el comúnmente reconocido por quienes cuentan con conocimientos en la materia que trata la presente publicación. Si bien pueden utilizarse en la práctica o ensayo de la presente publicación todo tipo de procedimientos y materiales similares o equivalentes, se describen los procedimientos y materiales preferidos. A los efectos de la presente descripción, se definen a continuación los siguientes términos.

5 Tal como se utiliza en esta descripción y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares «un», «una», «el» y «la» incluyen sus respectivos plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario. A modo de ejemplo, «un elemento» significa un elemento o más de un elemento.

10 Se entiende por «aproximadamente» que una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, volumen, peso o longitud puede variar hasta en un 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1% respecto a la cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, volumen, peso o longitud de referencia.

15 Un «agonista» hace referencia a una molécula que intensifica o imita la actividad biológica no canónica de una AspRS. Los agonistas pueden incluir proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, pequeñas moléculas o cualquier otro compuesto o composición que module la actividad de una AspRS, ya sea interactuando directamente con la AspRS o con su pareja de unión o actuando sobre componentes de la ruta biológica en la que participa la AspRS. Se incluyen los agonistas parciales y totales.

20 El término «antagonista» hace referencia a una molécula que inhibe o atenúa la actividad biológica no canónica de una AspRS. Los antagonistas pueden incluir proteínas como ácidos nucleicos, carbohidratos, pequeñas moléculas o cualquier otro compuesto o composición que module la actividad de una AspRS o su pareja de unión, ya sea interactuando directamente con la AspRS o con su pareja de unión o actuando sobre componentes de la ruta biológica en la que participa la AspRS. Se incluyen los antagonistas parciales y totales.

25 Se entiende por «secuencia codificante» cualquier secuencia de ácido nucleico que contribuya al código para el producto polipéptido de un gen. Por el contrario, el término «secuencia no codificante» se refiere a cualquier secuencia de ácido nucleico que no contribuya al código para el producto polipéptido de un gen.

30 A lo largo de esta descripción, a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que las palabras «comprende», «comprenden», «comprendido» y similares implican la inclusión de un determinado paso o elemento o grupo de pasos o elementos pero no la exclusión de cualquier otro paso o elemento o grupo de pasos o elementos.

35 Se entiende que la expresión «consiste en» incluye de forma limitativa aquello que le sigue. Por lo tanto, la expresión «consiste en» indica que los elementos enumerados son obligatorios o necesarios y que no pueden estar presentes otros elementos. Se entiende que la expresión «consiste esencialmente en» incluye todo elemento enumerado a continuación y limita otros elementos que no interfieran con ni contribuyan a la actividad o acción especificada en la descripción de los elementos enumerados. En consecuencia, la frase «que consiste esencialmente en» indica que los elementos enumerados son obligatorios o necesarios pero hay otros elementos opcionales que pueden estar presentes o no dependiendo de si afectan o no materialmente a la actividad o acción de los elementos enumerados.

45 Tal como se utilizan en el presente documento, los términos «función», «funcional» y similares se refieren a una función biológica, enzimática o terapéutica.

50 Se entiende por «gen» una unidad hereditaria que ocupa un lugar específico en un cromosoma y consiste en secuencias reguladoras transcripcionales o traduccionales o una región codificante o secuencias no traducidas (es decir, intrones, secuencias no traducidas 5' y 3').

«Homología» hace referencia al porcentaje de aminoácidos que son idénticos o constituyen sustituciones conservativas. La homología puede determinarse utilizando programas de comparación de secuencias como GAP (Deveraux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12, 387-395). De ese modo, las secuencias de una longitud similar o sustancialmente diferente de las citadas en el presente documento podrían compararse mediante la inserción de espacios en la alineación, unas lagunas determinadas, por ejemplo, por el algoritmo de comparación utilizado por GAP.

El término «célula huésped» engloba una célula individual o cultivo celular que puede ser o ha sido receptor de algún vector o vectores recombinantes o polinucleótido aislado de la descripción. Las células huésped incluyen la progenie

de una única célula huésped y esa progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN total) a la célula parental original debido a una modificación o mutación natural, accidental o deliberada. Una célula huésped incluye células transfectadas o infectadas *in vivo* o *in vitro* con un vector recombinante o un polinucleótido de la descripción. Una célula huésped que incluya un vector recombinante de la descripción es una célula huésped recombinante.

Se entiende por «aislado» el material sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan en su estado natural. Por ejemplo, un «polinucleótido aislado», tal y como se utiliza en el presente documento, incluye un polinucleótido que ha sido purificado de las secuencias que lo flanquean en su estado natural original, como, p. ej., un fragmento de ADN que haya sido extraído de las secuencias que normalmente son adyacentes al fragmento. Por otro lado, un «péptido aislado», «polipéptido aislado» o similar, tal como se entiende en el presente documento, incluye el aislamiento 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 se asocia significativamente con sustancias *in vivo*.

El término «ARNm» o «ARNm transcritos», tal como se utiliza en el presente documento, incluye, aunque sin limitación, los transcritos de pre-ARNm, los intermedios de procesamiento de transcripción, los ARNm listos para su traducción y los transcritos del gen o los genes o los ácidos nucleicos derivados de los ARNm transcritos. El procesamiento de transcripción puede incluir el splicing, la edición y la degradación. Tal como aquí se utiliza, un ácido nucleico derivado de un ARNm transcrito hace referencia a un ácido nucleico para cuya síntesis sirvió de modelo en última instancia el ARNm transcrito o una subsecuencia del mismo. Un ADNc inverso transcrito de un ARNm, un ARN transcrito a partir de ese ADNc, un ADN amplificado a partir del ADNc, un ARN transcrito a partir del ADN amplificado, etc., son todos derivados del ARNm transcrito y la detección de tales productos derivados es indicativa de la presencia o abundancia del transcrito original en una muestra. Por lo tanto, las muestras de ARNm derivado incluyen, aunque sin limitaciones, ARNm transcritos del gen o genes, ADNc a inverso transcrito a partir de ARNm, ARNc transcrito a partir de ADNc, ADN amplificado a partir de los genes, ARN transcrito a partir de ADN amplificado y similares.

Actividad «no canónica», tal como se utiliza en el presente documento, se refiere generalmente a una actividad que posee un polipéptido de AspRS de la descripción distinta de la aminoacilación y, más concretamente, distinta de la adición de su aminoácido cognado en su molécula de ARNt cognado. Son ejemplos no limitativos de actividades no canónicas la unión al ARN, la unión de aminoácidos, la modulación de la proliferación celular, la modulación de la migración celular, la modulación de la diferenciación celular (p. ej., hematopoyesis), la modulación de la apoptosis u otras formas de muerte celular, la modulación de la señalización celular, la modulación de la angiogénesis, la modulación de la unión celular, la modulación del metabolismo celular, la modulación de la producción o actividad de citoquinas, la modulación de la actividad de receptores de citoquinas, la modulación de la inflamación y similares.

El término «modular» incluye «aumentar» o «estimular», así como «disminuir» o «reducir», normalmente en una cantidad estadística o fisiológicamente significativa en comparación con un control. Una cantidad «aumentada» o «mejorada» es normalmente una cantidad «estadísticamente significativa» y puede incluir un aumento de 1,1; 1,2; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 15; 20; 30 o más veces, como p. ej., 500 o 1000 veces (incluyendo todos los números enteros y decimales intermedios y superiores a 1, p. ej., 1,5; 1,6; 1,7; 1,8, etc.) la cantidad producida sin composición (en ausencia de un agente o compuesto) o una composición de control. Una cantidad «disminuida» o «reducida» normalmente es una cantidad «estadísticamente significativa» que puede suponer un 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 %, o 100 % de disminución de la cantidad producida sin composición (ausencia de un agente o compuesto) o una composición de control, incluyendo todos los números enteros intermedios. En el presente documento se describen otros ejemplos de cantidades «estadísticamente significativas».

Se entiende por «obtenido de» que una muestra como, por ejemplo, un extracto de polinucleótido o de polipéptido se aísla o se deriva de una fuente particular del sujeto. Por ejemplo, el extracto puede obtenerse a partir de un tejido o fluido biológico aislado directamente del sujeto. «Derivado» u «obtenido de» también puede referirse a la fuente de una secuencia de polipéptido o polinucleótido. Por ejemplo, una secuencia de AspRS descrita en este documento puede ser «derivada» de la información de la secuencia de un fragmento de AspRS proteolítica o una variante de splicing de AspRS, o una porción del mismo, generados natural o artificialmente, y puede por tanto comprender, consistir esencialmente en o consistir en esa secuencia.

Los enunciados «identidad de secuencia» o, por ejemplo, incluida una «secuencia 50 % idéntica a», tal como se utilizan en el presente documento, hacen referencia a la medida en que las secuencias son idénticas en una lógica

de nucleótido a nucleótido o de aminoácido a aminoácido en una tabla comparativa. Por tanto, se puede calcular un «porcentaje de identidad de secuencia» mediante la comparación de dos secuencias óptimamente alineadas en una tabla comparativa, determinando el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico idéntica (p. ej., A, T, C, G, I) o el residuo de aminoácido idéntico (p. ej., Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) sucede en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la tabla comparativa (es decir, el tamaño de la tabla) y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

Una «zona de unión», tal como se utiliza en este documento, incluye la región de un ARNm transcrito maduro o el polipéptido codificado donde el extremo 3' de un primer exón se une con el extremo 5' de un segundo exón. El tamaño de la zona puede variar y puede incluir 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más (incluidos todos los números enteros intermedios) nucleótidos o residuos de aminoácidos a cada lado de los residuos exactos donde el extremo 3' de un exón se une con el extremo 5' de otro exón. Un «exón» es una secuencia de ácido nucleico representada en la forma madura de una molécula de ARN después de que se hayan eliminado las porciones de ARN precursor (intrones) por splicing en cis o se hayan ligado dos o más moléculas de ARN precursor por trans-splicing. La molécula de ARN maduro puede ser un ARN mensajero o una forma funcional de ARN no codificante, como ARNr o ARNt. En función del contexto, exón puede hacer referencia a la secuencia en el ADN o a su ARN transcrito. Un «intrón» es una región de ácido nucleico no codificante de un gen que no se traduce en una proteína. Las secciones intrónicas no codificantes se transcriben a ARNm precursor (pre-ARNm) y algunos ARN más (como los ARN no codificantes largos) y se retiran posteriormente por splicing durante el proceso de maduración del ARN.

Una «variante de splicing» hace referencia a un ARNm maduro y su proteína codificada que se producen por splicing alternativo, un proceso por el cual los exones del ARN (una transcripción génica primaria o pre-ARNm) vuelven a conectarse de múltiples formas durante el splicing de ARN. Los diferentes ARNm resultantes pueden traducirse a distintas isoformas de proteína, lo que permite a un solo gen codificar para múltiples proteínas.

Un «sujeto», tal como se utiliza en el presente documento, incluye a cualquier animal que presente un síntoma o corra el riesgo de presentar un síntoma que pueda ser tratado o diagnosticado con un polinucleótido o polipéptido de AspRS de la presente descripción. Los sujetos idóneos (pacientes) incluyen animales de laboratorio (como ratón, rata, conejo o conejillo de indias), animales de granja y animales domésticos o mascotas (como gato o perro). Están incluidos los primates no humanos y, preferiblemente, los pacientes humanos.

«Tratamiento» o «tratar», tal como se utiliza en el presente documento, incluyen cualquier efecto deseable en los síntomas o la patología de una enfermedad o afección que pueda verse afectada por las actividades no canónicas de un polinucleótido o polipéptido de AspRS, tal como se describe en el presente documento, y pueden incluir incluso mínimas alteraciones o mejoras en uno o más marcadores cuantificables de la enfermedad o afección tratada. También se incluyen los tratamientos con terapias sin AspRS en los que una secuencia de AspRS aquí descrita proporcione un marcador clínico de tratamiento. «Tratamiento» o «tratar» no implican necesariamente la completa erradicación o cura de la enfermedad o afección ni de los síntomas asociados a la misma. El sujeto que recibe este tratamiento es cualquier sujeto que lo necesite. Los marcadores indicadores de mejoría clínica resultarán evidentes para los expertos en la materia.

Se entiende por «vector» o «constructo de ácido nucleico» una molécula de polinucleótido, preferiblemente una molécula de ADN derivado, por ejemplo, de un plásmido, bacteriófago, levadura o virus, en la que se puede insertar o clonar un polinucleótido. Un vector contiene preferiblemente uno o más sitios de restricción únicos y puede ser capaz de autorreplicación en una célula huésped definida, incluida una célula o tejido diana o una célula o tejido progenitor de la misma, o ser integrable con el genoma del huésped definido de manera que la secuencia clonada sea duplicable. Por consiguiente, el vector puede ser un vector de autorreplicación, es decir, un vector que existe como entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, como p. ej. un plásmido lineal o circular cerrado, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Además, el vector puede ser tal que, al introducirse en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica junto con el o los cromosomas en los que se haya integrado.

Los términos «natural» y «de origen natural» se utilizan indistintamente para referirse a un gen o producto génico que tiene las características de dicho gen o producto génico cuando se aísla de una fuente de origen natural. Un gen o producto génico natural (p. ej., un polipéptido) es el que se observa con mayor frecuencia en la población y designa por tanto de manera arbitraria la forma «normal» o «de tipo salvaje» del gen.

**Polipéptidos de aspartil-ARNt sintetasa**

La presente descripción se refiere en general a polipéptidos aislados de AspRS, polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos, agentes de unión que unen dichos polipéptidos, análogos, variantes y fragmentos de tales polipéptidos, etc., así como composiciones y procedimientos de uso de cualquiera de los anteriores. Por lo tanto, según un aspecto de la descripción, hay polipéptidos de AspRS con actividades no canónicas de relevancia terapéutica, así como composiciones que comprenden los mismos.

Los términos «polipéptido», «péptido» y «proteína» se utilizan indistintamente en este documento para referirse a polímeros de residuos de aminoácidos y a variantes y análogos sintéticos de los mismos. Por lo tanto, estos términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son aminoácidos sintéticos de origen no natural, como un análogo químico de un correspondiente aminoácido de origen natural, así como polímeros de aminoácidos de origen natural.

Los polipéptidos no se limitan a una longitud específica, pero, en el contexto de la presente descripción, normalmente representan un fragmento de una proteína de longitud completa y pueden incluir modificaciones postraduccionales como, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como no natural. Los polipéptidos y proteínas de la descripción pueden prepararse utilizando cualquiera de las distintas técnicas recombinantes o sintéticas bien conocidas, de las que se exponen ejemplos ilustrativos más adelante.

El enunciado «variante de polipéptido» se refiere a polipéptidos que se distinguen de un polipéptido de referencia de AspRS (p. ej., SEQ ID NO: 1, o cualquiera de sus fragmentos como D1, incluidos fragmentos que consisten en residuos de aminoácidos 1-154, 1-171, 1-174, 1-177, 1-31, 399-425, 413-476 o 397-425 de la SEQ ID NO: 1) por la adición, delección o sustitución de al menos un residuo de aminoácido y que normalmente conservan al menos una actividad no canónica, como se describe en el presente documento. En determinadas realizaciones descritas en este documento, una variante de polipéptido se distingue de un polipéptido de referencia por una o más sustituciones, que pueden ser conservativas o no conservativas, tal como se describe en este documento y se conoce en la técnica. En determinadas realizaciones descritas en este documento, la variante de polipéptido comprende sustituciones conservativas y, en este sentido, es bien sabido en la técnica que algunos aminoácidos pueden cambiarse por otros con propiedades similares en términos generales sin modificar la naturaleza de la actividad del polipéptido.

Las variantes de polipéptidos que abarca la presente descripción presentan normalmente al menos aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad (determinada como se describe a continuación), a lo largo de sus longitudes, con la correspondiente región de una proteína de AspRS natural de mamífero, como es la SEQ ID NO: 1, o cualquiera de sus fragmentos como D1, incluidos fragmentos que consisten en residuos de aminoácidos 1-154, 1-171, 1-174, 1-177, 1-31, 399-425, 413-476 o 397-425 de la SEQ ID NO: 1. También se describen secuencias que difieren de las secuencias de AspRS de referencia 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, 110, 120, 130, 140, 150 o más aminoácidos pero que conservan las propiedades de un polipéptido de AspRS de referencia, como una actividad no canónica. En determinadas realizaciones descritas en este documento, las adiciones o delecciones de aminoácidos se producen en el extremo C-terminal o en el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 1 o fragmentos de los mismos que consisten en residuos de aminoácidos 1-154, 1-171, 1-174, 1-177, 1-31, 399-425, 413-476 o 397-425 de la SEQ ID NO: 1. En determinadas realizaciones descritas en este documento, las adiciones de aminoácidos incluyen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50 o más residuos de origen natural (es decir, a partir del correspondiente polipéptido de AARS de longitud completa) que son proximales al extremo C-terminal o N-terminal de dichos fragmentos de AspRS.

En otras formas de realización descritas en el presente documento, los polipéptidos variantes difieren de las correspondientes secuencias de referencia de AspRS como mínimo en un 1 % pero en menos de 20 %, 15 %, 10 % o 5 % de los residuos. (Si esta comparación requiere alineación, deben alinearse las secuencias para una similitud máxima. Las secuencias «en bucle» de delecciones o inserciones, o las discrepancias se consideran diferencias). Las diferencias son, adecuadamente, diferencias o cambios en un residuo no esencial o una sustitución conservativa.

También se describen en el presente documento «fragmentos» biológicamente activos de polipéptidos de AspRS de referencia. Los fragmentos representativos biológicamente activos en general participan en una interacción, como una interacción intramolecular o intermolecular. Una interacción intermolecular puede ser una interacción de unión o

una interacción enzimática específica. Una interacción intermolecular puede darse entre un polipéptido de AspRS y una pareja de unión celular, como un receptor celular u otra molécula huésped que participe en la actividad no canónica del polipéptido de AspRS.

- 5 Normalmente, los fragmentos biológicamente activos comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de un polipéptido de AspRS de referencia y pueden incluir uno o más (y en algunos casos todos) de los diversos dominios activos e incluyen fragmentos con una actividad no canónica. En algunos casos, los fragmentos biológicamente activos de un polipéptido de AspRS tienen una actividad biológica que es única en el fragmento en particular, truncado, de tal manera que el polipéptido de AspRS de longitud completa puede no tener esa actividad.
- 10 En ciertos casos, la actividad biológica puede revelarse al separar el fragmento biológicamente activo del polipéptido de AspRS de las otras secuencias de polipéptidos de AspRS de longitud completa o mediante la alteración de ciertos residuos de la secuencia del polipéptido de AspRS natural de longitud completa para desenmascarar los dominios biológicamente activos. Por ejemplo, en determinadas realizaciones ilustrativas aquí descritas, un polipéptido de AspRS puede incluir la totalidad o una parte de una hélice anfifílica, como se ilustra en el presente
- 15 documento (véase, p. ej., la SEQ ID NO: 3) o una región de residuos con carga positiva (véase, p. ej., la SEQ ID NO: 5). En determinadas realizaciones descritas en este documento, la hélice anfifílica es una región de 22 aminoácidos, como se describe en el presente documento.

Un fragmento biológicamente activo de un polipéptido de AspRS de referencia descrito en este documento puede

20 ser un fragmento de polipéptido que conste, p. ej., de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300 o más aminoácidos contiguos o no contiguos, incluidos todos los números enteros intermedios, de las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones ilustrativas descritas en este documento, el tamaño de un fragmento de AspRS de la SEQ ID NO: 1 puede oscilar

25 aproximadamente entre 20-30, 20-40, 20-50, 20-60, 20-70, 20-80, 20-90, 20-100, 20-125, 20-150 o 20-175 aminoácidos de longitud. En otras formas de realización descritas en el presente documento, el tamaño del fragmento oscilará entre aproximadamente 30-40, 30-50, 30-60, 30-70, 30-80, 30-90, 30-100, 30-125, 30-150 o 30-175 aminoácidos de longitud. En otras formas de realización descritas en el presente documento, el tamaño del fragmento oscilará entre aproximadamente 40-50, 40-60, 40-70, 40-80, 40-90, 40-100, 40-125, 40-150 o 40-175

30 aminoácidos de longitud. En otras formas de realización ilustrativas descritas en este documento, el tamaño del fragmento oscilará entre aproximadamente 50-60, 50-70, 50-80, 50-90, 50-100, 50-125, 50-150 o 50-175 aminoácidos de longitud.

En determinadas realizaciones descritas en este documento, el polipéptido de AspRS es un polipéptido de AspRS

35 truncado. Un AspRS «truncado», tal como se utiliza en el presente documento, hace referencia a una proteína de aspartil-ARNt sintetasa más corta que su correspondiente proteína de AspRS de longitud completa, por ejemplo, debido a la eliminación de aminoácidos de sus extremos N-terminal o C-terminal. La extensión del truncamiento, es decir, el número de residuos de aminoácidos de N-terminal o C-terminal eliminados de una proteína de AspRS de longitud completa, puede variar considerablemente sin dejar de fomentar los efectos celulares deseados cuando se

40 administra a una célula, tejido o sujeto, como aquí se describe. En determinadas realizaciones descritas en este documento, al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350 o más aminoácidos, incluidas todas las longitudes intermedias, se truncan desde el N-terminal o C-terminal de una proteína de AspRS de mamífero de longitud completa. Se entiende que las longitudes intermedias incluyen todos los números enteros intermedios, como 6, 7, 8, etc., 51, 52, 53, etc., 201, 202, 203, etc. Es conveniente que el fragmento biológicamente

45 activo tenga al menos aproximadamente 1 %, 10 %, 25 % o 50 % de una actividad biológicamente no canónica de un polipéptido de AspRS de referencia.

También se describen en el presente documento fragmentos proteolíticos de un polipéptido de AspRS que pueden caracterizarse, identificarse o derivarse conforme a una serie de técnicas. Por ejemplo, los fragmentos proteolíticos

50 pueden identificarse *in vitro*, mediante la incubación de polipéptidos de longitud completa u otros polipéptidos de AspRS con proteasas seleccionadas, o pueden identificarse de manera endógena (es decir, *in vivo*). En determinadas realizaciones descritas en este documento, se pueden generar o identificar fragmentos de proteínas tales como fragmentos proteolíticos endógenos, p. ej., por expresión recombinante de polipéptidos de longitud completa u otros polipéptidos de AspRS en un microorganismo o célula eucariota seleccionada que o bien haya sido

55 modificada para contener una o más proteasas seleccionadas o bien contenga de forma natural una o más proteasas capaces de actuar sobre un polipéptido de AspRS seleccionado y aislar y caracterizar los fragmentos de proteínas producidos de forma endógena.

En determinadas realizaciones descritas en este documento, se pueden generar o identificar fragmentos de

proteínas tales como fragmentos proteolíticos endógenos (p. ej., de origen natural), por ejemplo, a partir de diversas fracciones celulares (p. ej., citosólica, membrana, nuclear) o medios de cultivo de distintas células, incluidos, por ejemplo, macrófagos como los macrófagos RAW (p. ej., macrófagos RAW 264,7), células T, incluidas las células T primarias y líneas de células T como las células Jurkats y las células asesinas naturales (NK), entre otras. En determinadas realizaciones descritas en este documento, se pueden identificar fragmentos de proteínas tales como fragmentos proteolíticos endógenos, generados no obstante, mediante técnicas como la espectrometría de masas o equivalentes. Una vez que se ha generado o identificado un fragmento de proteína *in vitro* o endógenamente identificado, puede mapearse o secuenciarse, y, por ejemplo, clonarse en un vector de expresión para producción recombinante o producirse sintéticamente.

10 Se puede utilizar una gran variedad de proteasas para producir, identificar, derivar o caracterizar la secuencia de fragmentos proteolíticos de AspRS. En general, las proteasas se suelen clasificar conforme a tres criterios principales: (i) la reacción catalizada, (ii) la naturaleza química del sitio catalítico y (iii) la relación evolutiva, según lo revelado por la estructura. Los ejemplos generales de proteasas o proteinasas, según la clasificación del mecanismo de catálisis, incluyen aspartil proteasas, serín proteasas, cisteín proteasas y metaloproteasas.

La mayoría de las aspartil proteasas pertenecen a la familia de la pepsina. Pertenecen a esa familia las enzimas digestivas como la pepsina y la quimosina, así como las catepsinas lisosomales D y las enzimas de procesamiento como la renina y determinadas proteasas fúngicas (p. ej., penicilopepsina, rhizopuspepsina o endotiapepsina).  
20 Pertenecen a una segunda familia de aspartil proteasas proteinasas virales como la proteasa del virus del SIDA (VIH), también llamado retropepsina.

Las serín proteasas incluyen dos familias distintas. En primer lugar, la familia de la quimotripsina, a la que pertenecen enzimas de mamíferos como la quimotripsina, la tripsina, la elastasa o la calicreína, y en segundo lugar, la familia de la subtilisina, a la que pertenecen enzimas bacterianas como la subtilisina. La estructura 3D general entre estas dos familias es distinta pero tienen la misma geometría del sitio activo y la catálisis se produce por el mismo mecanismo. Las serín proteasas presentan diferentes especificidades de sustrato, diferencias que afectan principalmente a sustituciones de aminoácidos en los diversos subsitios de enzimas (sitios de interacción de residuos de sustrato). Algunas serín proteasas tienen un sitio de interacción más amplio con el sustrato mientras que  
30 otras tienen una especificidad que se restringe al residuo de sustrato P1.

A la familia de las cisteín proteasas pertenecen proteasas vegetales como la papaína, la actinidina o la bromelina, varias catepsinas lisosomales de mamífero, las calpains citosólicas (activadas por calcio), así como varias proteasas parasitarias (p. ej., *Trypanosoma*, *Schistosoma*). La papaína es el arquetipo y el miembro de la familia mejor estudiado. La reciente elucidación de la estructura de rayos X de la interleucina-1-beta de la enzima conversora reveló un nuevo tipo de plegamiento para cisteín proteinasas.

Las metaloproteasas son unas de las clases más antiguas de proteasas, que se encuentran en bacterias, hongos y organismos superiores. Se diferencian considerablemente en sus secuencias y estructuras 3D pero la gran mayoría de las enzimas contienen un átomo de cinc catalíticamente activo. En algunos casos, el cinc puede ser sustituido por otro metal, como cobalto o níquel, sin pérdida de actividad proteolítica. La termolisina bacteriana ha sido bien caracterizada y su estructura cristalográfica indica que el cinc está unido por dos histidinas y un ácido glutámico. Muchas metaloproteasas contienen el motivo secuencial HEXXH, que proporciona dos ligandos de histidina para el zinc. El tercer ligando es o un ácido glutámico (termolisina, neprilisina, alanil aminopeptidasa) o una histidina  
45 (astacina, serralisina).

En determinadas realizaciones descritas en este documento, pueden producirse polipéptidos truncados de AspRS utilizando cualquiera de las distintas enzimas proteolíticas y empleando técnicas conocidas y disponibles en la materia. Entre las proteasas ilustrativas figuran las siguientes: acromopeptidasa, aminopeptidasa, ancrod, enzima conversora 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, la catepsina L, quimopapaína, quimasa, quimotripsina, clostripaína, collagenasa, complemento C1 r, complemento C1 s, complemento Factor D, 50 complemento Factor I, cucumisina, dipeptidil peptidasa IV, elastasa (leucocito), elastasa (páncreas), endoproteinasa Arg C, endoproteinasa Asp-N, endoproteinasa Glu-C, endoproteinasa Lys-C, enteroquinasa, factor Xa, ficina, furina, granzima A, granzima B, proteasa del VIH, IGase, tejido de calicreína, leucina aminopeptidasa (general), leucina aminopeptidasa (citosol), leucina aminopeptidasa (microsomal), metaloproteasa de matriz, metionina aminopeptidasa, neutrasa, papaína, pepsina, plasmina, prolidasa, pronasa E, antígeno específico de próstata,

alcalófilo proteasa 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, estreptoquinasa, subtilisina, termolisina, trombina, activador tisular del plasminógeno, tripsina, triptasa y uroquinasa.

Determinadas realizaciones descritas en este documento se refieren a polipéptidos aislados de AspRS, que comprenden, que consisten esencialmente en o que consisten en secuencias de aminoácidos derivados de fragmentos de polipéptidos de AspRS endógenos, de origen natural y composiciones farmacéuticas que comprenden dichos fragmentos y los procedimientos de uso de los mismos. En determinadas formas de realización descritas en el presente documento, como se señaló anteriormente, las secuencias de fragmentos de proteínas de AspRS tales como fragmentos proteolíticos endógenos pueden generarse o identificarse, por ejemplo, a partir de diversas fracciones celulares (p. ej., citosólica, membrana, nuclear) o medios de acondicionamiento de distintos tipos de células, incluidas las células primarias y líneas celulares. Ejemplos de tales tipos de células son, sin limitación, las células inmunes, como monocitos, células dendríticas, macrófagos (p. ej., macrófagos RAW 264,7; véase el Ejemplo 5), neutrófilos, eosinófilos, basófilos y linfocitos, tales como las células B y células T (p. ej., cooperador CD4 + y células asesinas CD8 +), incluidas las células T primarias y líneas de células T como las células T Jurkat o las células asesinas naturales (NK).

En determinadas realizaciones descritas en este documento, los fragmentos de proteínas de AspRS pueden identificarse mediante técnicas como la espectrometría de masas o equivalentes. Simplemente a modo de ilustración y sin limitación, en determinadas realizaciones descritas en este documento los proteomas de varios tipos de células, tejidos o fluidos corporales de una serie de estados fisiológicos (p. ej., hipoxia, dieta, edad, enfermedad) o fracciones de los mismos se pueden separar por 1 D SDS-PAGE y las bandas de gel cortarse en bandas a intervalos fijos; a continuación, opcionalmente se pueden digerir las bandas con una proteasa adecuada, como la tripsina, para liberar los péptidos, que pueden ser analizados por 1D fase inversa LC-MS / MS. Los datos proteómicos resultantes pueden integrarse en los llamados peptogramas, cuya trama, en el panel de la izquierda, secuencia la cobertura de una determinada proteína en la dimensión horizontal (terminales N a C, de izquierda a derecha) frente a la migración de SDS-PAGE en la dimensión vertical (de mayor a menor peso molecular, de arriba abajo). Los fragmentos de péptidos específicos pueden ser secuenciados o mapeados. En determinadas realizaciones descritas en este documento, el fragmento de referencia de AspRS puede caracterizarse por su peso molecular único, en comparación, por ejemplo, con el peso molecular de la correspondiente AspRS de longitud completa.

Como se señaló anteriormente, una variante de polipéptido puede diferir de un polipéptido de AspRS descrito en este documento en una o más sustituciones, deleciones, adiciones o inserciones. Tales variantes pueden ser de origen natural o generadas sintéticamente, por ejemplo, modificando una o varias secuencias de los polipéptidos anteriormente descritos y evaluando su actividad biológica tal como se describe aquí utilizando cualquiera de una serie de técnicas bien conocidas en la técnica.

En otras realizaciones ilustrativas descritas en este documento, la variante puede ser una variante de splicing, generada de forma natural o no natural, donde el polipéptido posee al menos una actividad no canónica, p. ej., como se describe en el presente documento. En otras realizaciones ilustrativas descritas en este documento, la variante contiene una o más mutaciones puntuales relacionadas con la secuencia del polipéptido de AspRS de origen natural, generadas de forma natural o no natural, donde el polipéptido posee al menos una actividad no canónica, p. ej., como se describe en el presente documento.

En determinadas realizaciones descritas en este documento, una variante contendrá sustituciones conservativas. Una «sustitución conservativa» es aquella en la que se sustituye un aminoácido por otro aminoácido que tenga propiedades similares, de tal manera que un experto en la técnica de la química de péptidos puede esperar que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido se mantengan sustancialmente sin cambios. Se pueden hacer modificaciones en la estructura de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente descripción y seguir obteniendo una molécula funcional que codifica una variante o polipéptido derivado con características deseables. Si se quiere alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido para crear un equivalente o incluso uno mejorado, la variante de un polipéptido de AspRS descrita en este documento, un experto en la técnica, por ejemplo, puede cambiar uno o más de los codones de la secuencia codificante de ADN conforme a la Tabla 1.

Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos en una estructura proteica sin pérdida apreciable de capacidad de unión interactiva con estructuras como, por ejemplo, regiones de unión de antígenos de anticuerpos o sitios de unión en moléculas de sustrato. Puesto que es la capacidad interactiva y la

naturaleza de una proteína lo que normalmente determina esa actividad funcional biológica de la proteína, pueden hacerse determinadas sustituciones de secuencias de aminoácidos en una secuencia de proteína y, por supuesto, en su secuencia codificante de ADN subyacente, y sin embargo obtener una proteína con propiedades similares. Por tanto, se contempla que se pueden hacer distintos cambios en las secuencias polipeptídicas de las composiciones 5 descritas o secuencias de ADN correspondientes que codifican dichos polipéptidos, sin pérdida apreciable de su utilidad o actividad deseada.

Tabla 1

Aminoácidos			Codones						
Alanina	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU			
Cisteína	Cys	C	UGC	UGU					
Ácido aspártico	Asp	D	GAC	GAU					
Ácido glutámico	Glu	E	GAA	GAG					
Fenilalanina	Phe	F	UUC	UUU					
Glicina	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU			
Histidina	His	H	CAC	CAU					
Isoleucina	Ile	I	AUA	AUC	AUU				
Lisina	Lys	K	AAA	AAG					
Leucina	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU	
Metionina	Met	M	AUG						
Asparagina	Asn	N	AAC	AAU					
Prolina	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU			
Glutamina	Gln	Q	CAA	CAG					
Arginina	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU	
Serina	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU	
Treonina	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU			
Valina	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU			
Triptófano	Trp	W	UGG						
Tirosina	Tyr	S	UAC	UAU					

- 10 Al hacer tales cambios, también puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. Es bien conocida en este ámbito la importancia del índice hidropático de los aminoácidos para dar funciones biológicas interactivas a las proteínas (Kyte y Doolittle, 1982). Por ejemplo, es sabido que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, como enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos y similares. Cada aminoácido tiene asignado un índice hidropático basado en sus características de hidrofobicidad y carga (Kyte y Doolittle, 1982).
- 15 Esos valores son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).
- 20 Es sabido que ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos con un índice o valor hidropático similar y siguen dando como resultado una proteína con actividad biológica similar, es decir, se obtiene una proteína funcionalmente equivalente biológicamente. Al hacer tales cambios, es preferible la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos estén en el rango  $\pm 2$  y en especial la de los que estén en el de  $\pm 1$  y, aún más, la de los de  $\pm 0,5$ .
- 25 También es bien sabido que la sustitución de aminoácidos similares puede realizarse eficazmente partiendo de la hidrofiliidad. Como se detalla en la patente U.S. 4 554 101, se asignan a los residuos de aminoácidos los siguientes valores de hidrofiliidad: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0  $\pm 1$ ); glutamato (+3,0  $\pm 1$ ); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5  $\pm 1$ ); alanina (-0,5); histidina (-0,5);
- 30 cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Es sabido que se puede sustituir un aminoácido por otro con un valor de hidrofiliidad similar y obtener una proteína biológicamente equivalente. Al hacer tales cambios, es preferible la sustitución de aminoácidos cuyos valores hidrofílicos estén en el rango  $\pm 2$  y en especial la de los que estén en el de  $\pm 1$  y, aún más, la de los de  $\pm 0,5$ .
- 35 Como se indicó anteriormente, las sustituciones de aminoácidos pueden basarse en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral de aminoácidos, como su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño y similares. Son bien conocidas por los expertos en la materia las sustituciones modélicas que tienen en cuenta varias de las

características anteriores, que incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

Además, cualquier polinucleótido puede modificarse adicionalmente para aumentar la estabilidad *in vivo*. Las modificaciones posibles incluyen, sin limitarse a ellas, la adición de secuencias flanqueantes en los extremos 5' o 3'; el uso de fosforotioato o 2'-O-metilación en lugar de enlaces de fosfodiesterasa en la cadena principal; o la inclusión de bases no tradicionales como inosina, queosina y wibutosina, así como acetil-, metil-, tio- y otras formas modificadas de adenina, citidina, guanina, timina y uridina.

10 Las sustituciones de aminoácidos pueden además hacerse partiendo de la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad o de la naturaleza anfipática de los residuos. Por ejemplo, los aminoácidos con carga negativa incluyen el ácido aspártico y el ácido glutámico; los aminoácidos con carga positiva incluyen la lisina y la arginina; y los aminoácidos con grupos polares sin carga que tienen valores de hidrofiliidad similares incluyen la leucina, la isoleucina y la valina; la glicina y la alanina; la asparagina y la glutamina; y la serina, la treonina, la fenilalanina y la tirosina. Otros grupos de aminoácidos que pueden representar cambios conservativos incluyen: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; and (5) phe, tyr, trp, his. Una variante puede contener también o alternativamente cambios no conservativos. En una realización preferida, los polipéptidos variantes difieren de una secuencia nativa en la sustitución, delección o adición de cinco aminoácidos o menos. Las variantes se pueden modificar también o alternativamente por ejemplo mediante la delección o adición de aminoácidos que tengan una influencia mínima sobre la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido.

Los polipéptidos pueden incluir una secuencia señal (o líder) en el extremo N-terminal de la proteína, que cotraduccionalmente o postraduccionalmente dirige la transferencia de la proteína. El polipéptido también puede conjugarse con un conector u otra secuencia para facilitar la síntesis, purificación o identificación del polipéptido (p. ej., poli-His), o para potenciar la unión del polipéptido a un soporte sólido. Por ejemplo, un polipéptido puede conjugarse con una Fc de inmunoglobulina.

Al comparar secuencias de polipéptidos, se dice que dos secuencias son «idénticas» si la secuencia de aminoácidos de ambas secuencias es la misma cuando se alinean para la máxima correspondencia, como se describe a continuación. Las comparaciones entre dos secuencias se realizan normalmente comparando las secuencias en una tabla comparativa para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una «tabla comparativa», tal como se utiliza en el presente documento, es un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, normalmente entre 30 y aproximadamente 75 o de 40 a 50, en el que se puede comparar una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de alinear óptimamente las dos secuencias.

La alineación óptima de secuencias para la comparación puede realizarse, por ejemplo, utilizando el programa Megalign del paquete de software bioinformático Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, WI), utilizando la configuración por defecto. Este programa incorpora varios esquemas de alineación descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenesis pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. and Sharp, P.M. (1989) CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. and Muller W. (1988) CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D. (1971) Comb. Theor 11:105; Santou, N. Nes, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. (1973) Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. and Lipman, D.J. (1983) Proc. Nat'l Acad., Sci. USA 80:726-730.

Alternativamente, la alineación óptima de secuencias para comparación puede realizarse mediante el algoritmo de identidad local de Smith y Waterman (1981) Add. APL. Math 2:482, mediante el algoritmo de alineación de identidad de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443, mediante la búsqueda de procedimientos de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85: 2444, mediante aplicaciones informatizadas de esos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección.

Ejemplos de algoritmos adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et ál.* (1977) Nucl. Acids Res. 25:3389-3402 y Altschul *et ál.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410, respectivamente. BLAST y BLAST 2.0 se pueden utilizar, por

ejemplo, con los parámetros descritos en el presente documento, para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de los polinucleótidos y polipéptidos de la descripción. El software para realizar análisis BLAST está públicamente disponible a través del National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Información sobre Biotecnología). Para secuencias de aminoácidos, se puede utilizar una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de las palabras coincidentes en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulativa disminuye en la cantidad X desde su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa es de cero o menos debido a la acumulación de una o más alineaciones de puntuación negativa; o se alcanza el final de alguna secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación.

10 En una aproximación ilustrativa, el «porcentaje de identidad de secuencia» se determina comparando dos secuencias óptimamente alineadas en una tabla comparativa de al menos 20 posiciones, donde la porción de la secuencia del polipéptido en la tabla comparativa puede incluir adiciones o deleciones (es decir, brechas) de 20 por ciento o menos, habitualmente de 5 a 15 por ciento, o de 10 a 12 por ciento, en comparación con las secuencias de referencia (no comprende adiciones ni deleciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que el residuo de aminoácido es idéntico en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de la tabla) y multiplicando los resultados por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

20 En determinadas realizaciones de la descripción, hay polipéptidos de fusión y polinucleótidos que codifican polipéptidos de fusión. Los polipéptidos de fusión son polipéptidos de AspRS de la descripción unidos covalentemente, ya sea directa o indirectamente a través de un conector de aminoácidos, a una o más secuencias de polipéptidos heterólogos (parejas de fusión). Los polipéptidos que forman la proteína de fusión normalmente están vinculados de C-terminal a N-terminal, aunque también pueden estar vinculados de C-terminal a C-terminal, de N-terminal a N-terminal o de N-terminal a C-terminal. Los polipéptidos de la proteína de fusión pueden estar en cualquier orden.

30 La pareja de fusión puede estar pensada e incluida esencialmente con cualquier propósito deseado siempre que no afecte negativamente a la actividad deseada del polipéptido. Por ejemplo, en una realización descrita en este documento, una pareja de fusión comprende una secuencia que ayuda a expresar la proteína (un potenciador de expresión) con mayores niveles que la proteína recombinante original. Se pueden seleccionar otras parejas de fusión con el fin de aumentar la solubilidad de la proteína o de permitir orientar a la proteína hacia los compartimentos intracelulares deseados. Otras parejas de fusión incluyen etiquetas de afinidad, que facilitan la purificación de la proteína.

40 De forma más en general, la fusión de secuencias heterólogas, como un fragmento Fc, puede utilizarse para eliminar características no deseadas o para mejorar las características deseadas (p. ej., las propiedades farmacocinéticas) de un polipéptido de AspRS. Por ejemplo, la fusión de una secuencia heteróloga puede aumentar la estabilidad química, disminuir la inmunogenicidad, mejorar la concentración *in vivo* o aumentar la vida media en circulación de un polipéptido de AspRS.

45 La fusión de secuencias heterólogas también se puede utilizar para crear proteínas de fusión bifuncionales, tales como proteínas bifuncionales que no sólo poseen una actividad no canónica seleccionada a través del polipéptido de AspRS, sino que además son capaces de modificar (es decir, estimular o inhibir) otras vías a través del polipéptido heterólogo. Ejemplos no limitativos de dichas vías son diversas vías relacionadas con el sistema inmune, tales como vías de activación inmune adaptativa o innata, o vías reguladoras del crecimiento celular, tales como la angiogénesis. En ciertos aspectos descritos en este documento, el polipéptido heterólogo puede actuar sinérgicamente con el polipéptido de AspRS para modular una vía celular en un sujeto. Ejemplos de polipéptidos heterólogos que se pueden utilizar para crear una proteína de fusión bifuncional incluyen, aunque sin limitaciones, la trombopoyetina, las citoquinas (p. ej., IL-11), las quimioquinas y diversos factores de crecimiento hematopoyéticos, además de fragmentos biológicamente activos o variantes de los mismos.

55 Las proteínas de fusión pueden prepararse generalmente utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican los componentes polipeptídicos de una fusión deseada pueden ensamblarse por separado y ligarse en un vector de expresión apropiado. El extremo 3' de la secuencia de ADN que codifica un componente de polipéptido se liga, con o sin un conector peptídico, al extremo 5' de una secuencia de ADN que codifica el segundo componente polipeptídico de modo que los marcos de lectura de las secuencias estén en fase. Esto permite la traducción a una sola proteína de fusión que conserva la actividad biológica de ambos polipéptidos

componentes.

Se puede emplear una secuencia de conector peptídico para separar el primer y segundo componentes polipeptídicos con una distancia suficiente para asegurar que cada polipéptido se pliega en sus estructuras secundarias y terciarias, si se desea. Esa secuencia conectora de péptido se incorpora a la proteína de fusión utilizando técnicas convencionales bien conocidas. Se pueden elegir determinadas secuencias conectoras peptídicas basándose en los siguientes factores: (1) su capacidad para adoptar una extensa conformación flexible; (2) su incapacidad para adoptar una estructura secundaria que pudiera interactuar con epítomos funcionales en el primer y segundo polipéptidos; y (3) la falta de residuos hidrófobos o cargados que pudieran reaccionar con los epítomos funcionales del polipéptido. Las secuencias conectoras peptídicas preferidas contienen residuos de Gly, Asn y Ser. Otros aminoácidos neutros próximos como Thr y Ala también pueden ser utilizados en la secuencia conectora. Las secuencias de aminoácidos que se pueden emplear provechosamente como conectoras incluyen las descritas en Maratea *et al*, Gene 40:39 46 (1985);; Murphy *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258 8262 (1986); patente de Estados Unidos N.º 4 935 233 y patente de Estados Unidos N.º 4 751 180. La secuencia conectora generalmente estará entre 1 y aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. Las secuencias conectoras no son necesarias cuando el primer y segundo polipéptidos tienen regiones de aminoácidos no esenciales N-terminales que se pueden utilizar para separar los dominios funcionales y prevenir interferencias estéricas.

Las secuencias de ADN ligadas se unen operativamente al transcripcional apropiado o a elementos reguladores traduccionales. Los elementos reguladores responsables de la expresión del ADN se localizan solamente a 5' de la secuencia de ADN que codifica los primeros polipéptidos. De manera similar, los codones de parada necesarios para terminar la traducción y las señales de terminación de la transcripción sólo están presentes en 3' de la secuencia de ADN que codifica el segundo polipéptido.

En general, los polipéptidos y polipéptidos de fusión descritos en este documento (así como sus polinucleótidos codificantes) están aislados. Un polipéptido o polinucleótido «aislado» es aquel que es separado de su entorno original. Por ejemplo, una proteína de origen natural se aísla si se separa de algunos o de todos los materiales coexistentes en el sistema natural. Preferiblemente, tales polipéptidos son de una pureza de al menos aproximadamente el 90 %, a ser posible de al menos aproximadamente el 95 % y aún más preferiblemente de al menos aproximadamente el 99 %. Un polinucleótido se considera aislado si, por ejemplo, se clona en un vector que no forme parte del entorno natural.

En otras realizaciones descritas en este documento, un polipéptido de AspRS de la descripción puede formar parte de un dímero. Los dímeros pueden incluir, por ejemplo, homodímeros entre dos polipéptidos de AspRS idénticos, heterodímeros entre dos polipéptidos de AspRS diferentes (p. ej., un polipéptido de AspRS de longitud completa y un polipéptido de AspRS truncado o dos polipéptidos de AspRS distintos truncados) o heterodímeros entre un polipéptido de AspRS y un polipéptido heterólogo. Los monómeros o dímeros pueden ser solubles y pueden aislarse o purificarse hasta su homogeneidad. Ciertos heterodímeros, como los existentes entre un polipéptido de AspRS y un polipéptido heterólogo, pueden ser bifuncionales.

También se describen en el presente documento monómeros de polipéptidos de AspRS, incluidos monómeros aislados de AspRS que no dimerizan sustancialmente con ellos mismos (homodimerización) ni con un segundo polipéptido de AspRS (heterodimerización), debido a una o más sustituciones, truncamientos, deleciones, adiciones, modificaciones químicas o a una combinación de estas alteraciones. En determinadas realizaciones descritas en este documento, los polipéptidos monoméricos de AspRS poseen actividades biológicas, incluidas actividades no canónicas, de las que carecen los complejos de polipéptidos diméricos o multiméricos de AspRS.

En otras realizaciones descritas en este documento, un polipéptido de AspRS de la descripción puede formar parte de un complejo multiunitario. Un complejo multiunitario, en el presente documento, puede incluir, p. ej., al menos 2, 3, 4, 5 o más monómeros. Los monómeros o complejos multiunitarios de la presente descripción pueden ser solubles y pueden aislarse o purificarse hasta su homogeneidad. Las unidades de monómero de un complejo multiunitario pueden ser diferentes, homólogas, sustancialmente homólogas o idénticas entre sí. Sin embargo, un complejo multiunitario de la descripción incluye al menos un monómero que conste de un polipéptido de AspRS como aquí se describe o, en otras realizaciones, al menos dos o más polipéptidos de AspRS como aquí se describen.

Los monómeros covalentemente unidos pueden vincularse directamente (por enlaces) o indirectamente (p. ej., a través de un conector). Para vincular directamente los monómeros de polipéptido del presente documento, puede ser beneficioso modificar los polipéptidos del presente documento para mejorar su dimerización. Por ejemplo, se

pueden modificar uno o más residuos de aminoácidos de un polipéptido de AspRS mediante la adición o sustracción de una o más cisteínas. Los procedimientos para crear sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones de cisteína u otras modificaciones para facilitar la unión, son bien conocidos para los expertos en la técnica.

- 5 Determinadas realizaciones de la presente descripción también contemplan el uso de polipéptidos de AspRS modificados, incluidas modificaciones que mejoran las características deseadas de un polipéptido de AspRS, como se describe en el presente documento. Entre las modificaciones ilustrativas de polipéptidos de AspRS de esta descripción se incluyen, aunque sin limitaciones, derivatizaciones químicas o enzimáticas en uno o más aminoácidos constituyentes, incluidas modificaciones de las cadenas laterales, modificaciones del esqueleto y modificaciones de
- 10 N-terminales y C-terminales que incluyen acetilación, hidroxilación, metilación, amidación y la unión de fracciones de hidratos de carbono o lípidos, cofactores y similares. Entre los ejemplos de modificaciones también se incluye la pegilación de un polipéptido de AspRS (véase, p. ej., Veronese y Harris, *Advanced Drug Delivery Reviews* 54: 453-456, 2002).
- 15 En ciertos aspectos descritos en este documento, se puede utilizar la tecnología de ligación quimioselectiva para modificar polipéptidos truncados de AspRS de la descripción, por ejemplo uniendo polímeros de forma controlada y en una ubicación concreta. Esa tecnología se basa normalmente en la incorporación de anclajes quimioselectivos en el esqueleto de la proteína por medios químicos o recombinantes y la posterior modificación con un polímero que lleve un conector complementario. Como resultado, se pueden controlar el proceso de ensamblado y la estructura
- 20 covalente de la conjugación proteína-polímero resultante, lo que permite la optimización racional de propiedades farmacológicas como la eficacia y las propiedades farmacocinéticas (véase, p. ej., Kochendoerfer, *Current Opinion in Chemical Biology* 9:555-560, 2005).

- Los polipéptidos de AspRS descritos en este documento se pueden preparar por cualquier procedimiento adecuado conocido por los expertos en la materia, como mediante técnicas recombinantes. Por ejemplo, los polipéptidos de
- 25 AspRS se pueden preparar mediante un procedimiento que incluye las etapas de: (a) preparación de una construcción que incluya una secuencia de polinucleótidos que codifique un polipéptido de AspRS y que esté unido operativamente a un elemento regulador; (b) introducción del constructo en una célula huésped; (c) cultivo de la célula huésped para expresar el polipéptido de AspRS; y (d) aislamiento del polipéptido de AspRS de la célula
- 30 huésped. Los polipéptidos recombinantes de AspRS se pueden preparar convenientemente utilizando protocolos convencionales como los descritos p. ej. en Sambrook, *et al.*, (1989, *supra*), en particular en las secciones 16 y 17.; Ausubel *et al.*, (1994, *supra*), en particular en los capítulos 10 y 16; y en Coligan *et al.*, *Current Protocols in Protein Science* (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1997), en particular en los capítulos 1, 5 y 6.
- 35 Además de los procedimientos de producción recombinantes, se pueden producir los polipéptidos de la descripción y fragmentos de los mismos mediante síntesis peptídica directa utilizando técnicas de fase sólida (Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154 (1963)). La síntesis de proteínas puede realizarse utilizando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada puede conseguirse, p. ej., con el sintetizador de péptidos Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer). Alternativamente, pueden sintetizarse varios fragmentos químicamente por
- 40 separado y combinarse empleando procedimientos químicos para producir la molécula deseada.

### **Composiciones de polinucleótidos**

- La presente descripción también proporciona polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos de AspRS, así
- 45 como composiciones que comprenden dichos polinucleótidos. También figuran entre los polinucleótidos de AspRS de la presente descripción cebadores, sondas, oligonucleótidos antisentido y agentes de interferencia de ARN que comprenden todo o parte de los polinucleótidos de AspRS de referencia, que son complementarios para la totalidad o una parte de esos polinucleótidos de referencia o que hibridan específicamente con esos polinucleótidos de referencia, tal como se describe en el presente documento.
- 50 Tal como aquí se utilizan, los términos «ADN», «polinucleótido» y «ácido nucleico» se refieren a una molécula de ADN que ha sido aislada libre de ADN genómico total de una especie particular. Por lo tanto, un segmento de ADN que codifica un polipéptido hace referencia a un segmento de ADN que contiene una o más secuencias codificantes sigue estando sustancialmente aislado de o purificado y libre de ADN genómico total de la especie de la que se
- 55 obtiene el segmento de ADN. Se incluyen en los términos «segmento de ADN» y «polinucleótido» los segmentos de ADN y fragmentos más pequeños de tales segmentos, así como vectores recombinantes, incluidos, p. ej., plásmidos, cósmidos, fagémidos, fagos, virus y similares.

Como es bien sabido por los expertos en la materia, las secuencias de polinucleótidos de esta descripción pueden

incluir secuencias genómicas, secuencias extragenómicas y codificadas por plásmidos y segmentos de genes de ingeniería más pequeños que expresan, o pueden adaptarse para expresar, proteínas, polipéptidos, péptidos y similares. Esos segmentos se pueden aislar naturalmente o modificarse sintéticamente.

5 Como es sabido por los expertos en la materia, los polinucleótidos pueden ser monocatenarios (codificantes o antisentido) o bicatenarios, y pueden ser ADN (genómico, ADNc o sintético) o moléculas de ARN. Dentro de un polinucleótido de la presente descripción, pueden estar presentes, aunque no necesariamente, una codificación adicional o secuencias no codificantes y un polinucleótido puede, aunque no necesariamente, estar vinculado a otras moléculas o materiales de apoyo.

10

Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia original (es decir, una secuencia endógena que codifica una AspRS o una porción de la misma) o puede incluir una variante o un equivalente funcional biológico de una secuencia de este tipo. Las variantes de polinucleótidos pueden contener una o más sustituciones, adiciones, deleciones o inserciones, como se describe más adelante, preferiblemente de modo que la actividad deseada del polipéptido codificado no se vea sustancialmente disminuida respecto al polipéptido sin modificar. El efecto sobre la actividad del polipéptido codificado puede evaluarse generalmente como se describe en el presente documento.

15

En realizaciones adicionales descritas en este documento, la presente descripción proporciona polinucleótidos aislados que comprenden diversas longitudes de tramos contiguos de secuencia idéntica o complementaria a una aspartil-ARNt sintetasa, donde los polinucleótidos aislados codifican una AspRS como la descrita en el presente documento. Por ejemplo, esos polinucleótidos codifican al menos aproximadamente 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 o más residuos contiguos de aminoácidos de un polipéptido de AspRS descrito en este documento, así como todas las longitudes intermedias. Como es comprensible, «longitudes intermedias» significa en este contexto cualquier longitud entre los valores citados, como 101, 102, 103, etc.; 151, 152, 153, etc.; 201, 202, 203, etc.

20

Los polinucleótidos descritos en este documento, independientemente de la longitud de la secuencia codificante en sí, pueden combinarse con otras secuencias de ADN, como promotores, señales de poliadenilación, sitios adicionales de enzimas de restricción, sitios de clonación múltiple, otros segmentos de codificación y similares, de modo que su longitud total puede variar considerablemente. Por tanto, se contempla que se pueda emplear un fragmento de polinucleótido de casi cualquier longitud, con la longitud total preferiblemente limitada por la facilidad de preparación y uso en el protocolo de ADN recombinante previsto.

25

Por otra parte, los expertos en la materia apreciarán que, como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido como los aquí descritos. Algunos de estos polinucleótidos tienen una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen original. No obstante, en la presente descripción se contemplan específicamente los polinucleótidos que varían debido a diferencias en el uso de codones, como, p. ej., polinucleótidos optimizados para la selección de codón humano o primate. Además, los alelos de los genes que comprenden las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en este documento entran dentro del ámbito de la presente descripción. Los alelos son genes endógenos alterados como consecuencia de una o varias mutaciones, como deleciones, adiciones o sustituciones de nucleótidos. El ARNm y las proteínas resultantes pueden, aunque no necesariamente, tener una estructura o función alterada. Los alelos se pueden identificar usando técnicas convencionales (como la hibridación, la amplificación o la comparación de secuencias de base de datos).

30

Los polinucleótidos y las fusiones de los mismos se pueden preparar, manipular o expresar utilizando cualquiera de las distintas técnicas establecidas y bien conocidas disponibles en ese ámbito. Por ejemplo, secuencias de polinucleótidos que codifican polipéptidos de la descripción, o proteínas de fusión o equivalentes funcionales de los mismos se pueden usar en moléculas de ADN recombinantes para la expresión directa de un polipéptido de AspRS en células huésped. Debido a la degeneración inherente del código genético, se pueden producir otras secuencias de ADN que codifican sustancialmente la misma o una secuencia de aminoácidos funcionalmente equivalente y estas secuencias pueden utilizarse para clonar y expresar un determinado polipéptido.

35

Como es bien sabido por los expertos en la materia, puede ser ventajoso en algunos casos producir secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos y que poseen codones de origen no natural. Por ejemplo, pueden seleccionarse los codones preferidos por un determinado huésped procariota o eucariota para incrementar la tasa de expresión de la proteína o para producir un transcrito de ARN recombinante que tenga propiedades deseables, como una vida media más larga que la de un transcrito generado a partir de una secuencia de origen natural.

40

45

50

55

Por otra parte, las secuencias de polinucleótidos de la presente descripción pueden diseñarse con procedimientos generalmente conocidos en la materia para alterar las secuencias codificantes de polipéptidos por una serie de motivos, que incluyen, aunque sin limitaciones, alteraciones que modifican la clonación, procesamiento, expresión o actividad del producto génico.

5

Con el fin de expresar un polipéptido deseado, puede insertarse una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido o un equivalente funcional en el vector de expresión apropiado, es decir, en un vector que contenga los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada. Se pueden utilizar métodos conocidos por los expertos para construir vectores de expresión que contengan secuencias que codifiquen un polipéptido de interés y los elementos de control transcripcional y traduccional apropiados. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinantes *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Tales técnicas se describen en Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (1989), y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (1989).

10

15 Se conoce toda una serie de sistemas de vectores de expresión y huéspedes que pueden emplearse para contener y expresar secuencias de polinucleótidos. Estos incluyen, aunque sin limitaciones, microorganismos como bacterias transformadas con bacteriófagos recombinantes, plásmidos o vectores de expresión de ADN de cósmidos; levaduras transformadas con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus (p. ej., baculovirus); sistemas de células vegetales transformadas con vectores de expresión de virus (p. ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacterianos (p. ej., plásmidos Ti o pBR322); o sistemas de células animales, como sistemas de expresión basados en virus.

20

Los «elementos de control» o «secuencias reguladoras» presentes en un vector de expresión son aquellas regiones no traducidas del vector –potenciadores, promotores, regiones 5' y 3' no traducidas– que interactúan con proteínas de células huésped para llevar a cabo la transcripción y traducción. La fuerza y especificidad de esos elementos es variable. Dependiendo del sistema de vector y huésped utilizado, se puede utilizar cualquier número de elementos de transcripción y traducción adecuados, incluidos promotores constitutivos e inducibles. Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, pueden utilizarse promotores inducibles como el promotor lacZ híbrido del fagémido PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla, Calif.) o plásmido PSPORT1 (Gibco BRL, Gaithersburg, Md.) y similares. En los sistemas celulares de mamífero, suelen preferirse los promotores de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. Si es necesario generar una línea celular que contenga múltiples copias de la secuencia que codifica un polipéptido, se pueden utilizar ventajosamente vectores basados en SV40 o EBV con un marcador seleccionable apropiado.

30

35 También se pueden utilizar señales de iniciación específicas para lograr una traducción más eficaz de secuencias que codifican un polipéptido de interés. Esas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. En los casos en que las secuencias que codifican el polipéptido, su codón de iniciación y las secuencias superiores se inserten en el vector de expresión apropiado, pueden no ser necesarias señales de control de transcripción o traducción adicionales. Sin embargo, en los casos en que únicamente se inserte la secuencia de codificación, o parte de ella, se proporcionarán señales de control de traducción exógenas, incluido el codón de iniciación ATG. Además, el codón de iniciación debe estar en el marco de lectura correcto para garantizar la traducción del inserto completo. Los elementos de traducción exógenos y codones de iniciación pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de potenciadores que sean apropiados para el sistema celular particular que se utiliza, como los descritos en la bibliografía (Scharf et al., *Results Probl. Celular Differ.* 20:125-162 (1994)).

40

Además, puede elegirse una cepa de célula huésped por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la proteína expresada de la manera deseada. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, aunque sin limitaciones, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento postraduccional que escinde una forma «prepro» de la proteína también se puede utilizar para facilitar la correcta inserción, plegamiento o función. Se pueden elegir distintas células huésped como CHO, HeLa, MDCK, HEK293 y W138, que tienen una estructura celular específica y unos mecanismos característicos para tales actividades postraduccionales, con el fin de asegurar la modificación y procesamiento correctos de la proteína extraña.

50

55 Para la producción a largo plazo y de alto rendimiento de proteínas recombinantes, suele ser preferible la expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable un polinucleótido de interés pueden transformarse utilizando vectores de expresión que pueden contener orígenes virales de replicación o elementos de

expresión endógenos y un gen marcador seleccionable en el mismo o en un vector independiente. Tras la introducción del vector, puede dejarse que las células se desarrollen durante 1 o 2 días en un medio enriquecido antes de cambiarlas a un medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección y su presencia permite el crecimiento y la recuperación de células que expresan con éxito las secuencias introducidas. Se puede hacer proliferar los clones resistentes de células transformadas de manera estable mediante técnicas de cultivo tisular apropiadas para el tipo de célula.

Se puede utilizar cualquier número de sistemas de selección para recuperar las líneas celulares transformadas. Estos incluyen, aunque sin limitaciones, los genes de la timidina quinasa del virus herpes simple (Wigler *et ál.*, Cell 11:223-232 (1977)) y la adenina fosforribosiltransferasa (Lowy *et ál.*, Cell 22:817-823 (1990)) que se pueden emplear en las células tk- o aprt-, respectivamente. También puede utilizarse la resistencia a antimetabolitos, antibióticos o herbicidas como base para la selección; p. ej., dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler *et ál.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:3567-70 (1980)); npt, que confiere resistencia a los aminoglucósidos, la neomicina y G-418 (Colbere-Garapin *et ál.*, J. Mol. Biol. 150:1-14 (1981)); y als o pat, que confieren resistencia al clorsulfurón y la fosfotricina acetiltransferasa, respectivamente (Murry, *supra*).

Se ha descrito toda una serie de protocolos para detectar y medir la expresión de productos de polinucleótidos codificados, usando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para el producto. Los ejemplos incluyen el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), el radioinmunoensayo (RIA) y la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Estos y otros ensayos se describen, entre otros sitios, en Hampton *et ál.*, Serological Methods, a Laboratory Manual (1990) y Maddox *et ál.*, J. Exp. Med. 158:1211-1216 (1983).

Los expertos en la técnica conocen una amplia variedad de marcadores y técnicas de conjugación, que pueden utilizarse en varios ensayos de ácidos nucleicos y aminoácidos. Los medios para producir sondas marcadas de hibridación o PCR para detectar secuencias relacionadas con polinucleótidos incluyen oligomarcado, traducción de Nick, marcaje terminal o amplificación por PCR usando un nucleótido marcado. Alternativamente, las secuencias, o cualquier porción de las mismas pueden ser clonadas en un vector para la producción de una sonda de ARNm. Esos vectores son conocidos, se comercializan y se pueden usar para sintetizar sondas de ARN *in vitro* mediante la adición de una ARN polimerasa apropiada como T7, T3, o SP6 y nucleótidos marcados. Estos procedimientos pueden llevarse a cabo con toda una serie de kits comercializados. Entre las moléculas o etiquetas informadoras adecuadas que pueden utilizarse figuran radionúclidos, enzimas, fluorescentes, quimioluminiscentes, agentes cromogénicos, así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares.

Las células huésped transformadas con una secuencia de polinucleótidos de interés pueden cultivarse en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína del cultivo de células. La proteína producida por una célula recombinante puede secretarse o contenerse intracelularmente dependiendo de la secuencia o el vector usado. Como es sabido por los expertos, los vectores de expresión que contienen polinucleótidos de la descripción pueden diseñarse para contener secuencias de señal que conduzcan la secreción del polipéptido codificado a través de una membrana celular procariota o eucariota. Se pueden utilizar 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.

De acuerdo con otro aspecto de la descripción, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos descritos en este documento pueden administrarse a un sujeto *in vivo*, p. ej., utilizando técnicas de terapia génica. Terapia génica hace referencia generalmente a la transferencia de ácidos nucleicos heterólogos a determinadas células, las células diana, de un mamífero, particularmente un ser humano, con un trastorno o afección para la que se requiere dicha terapia. El ácido nucleico se introduce en las células diana seleccionadas de tal manera que se exprese el ADN heterólogo y se produzca un producto terapéutico codificado por el mismo.

Varios vectores virales que pueden utilizarse en la terapia génica, como se describe en este documento, incluyen adenovirus, virus herpes, vaccinia, virus adenoasociado (AAV) o, preferiblemente, un virus de ARN como un retrovirus. Preferiblemente, el vector retroviral es un derivado de un retrovirus murino o aviar o es un vector lentiviral. El vector retroviral preferido es un vector lentiviral. Ejemplos de vectores retrovirales en los que puede insertarse un gen extraño incluyen, aunque sin limitaciones: Virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV), SIV, BIV, el VIH y Virus del Sarcoma de Rous (RSV). Una serie de vectores retrovirales adicionales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable de modo que puedan ser identificadas y generadas las células transducidas. Insertando una secuencia de polipéptido de unión a un ADN derivado de dedo de zinc de interés en el vector viral, junto con otro gen que codifique el ligando para un receptor en una célula diana

específica, por ejemplo, el vector puede volverse específico de la diana. Los vectores retrovirales se pueden volver específicos de la diana mediante la inserción de, por ejemplo, un polinucleótido que codifique una proteína (dímero). Se puede lograr un direccionamiento ilustrativo utilizando un anticuerpo para dirigir el vector retroviral. Los expertos en la técnica conocerán, o podrán determinar fácilmente sin experimentación indebida, secuencias de polinucleótidos específicas que puedan insertarse en el genoma retroviral para permitir la liberación específica de la diana del vector retroviral que contiene el polinucleótido de la proteína de unión al dedo de cinc.

Puesto que los retrovirus recombinantes son defectuosos, requieren ayuda para producir partículas de vectores infecciosos. Esa asistencia se puede proporcionar, por ejemplo, utilizando líneas celulares coadyuvantes que contengan plásmidos que codifiquen todos los genes estructurales del retrovirus bajo control de secuencias reguladoras dentro del LTR. Estos plásmidos carecen de una secuencia de nucleótidos que permita que el mecanismo de empaquetamiento reconozca un transcrito de ARN para la encapsulación. Las líneas celulares auxiliares que tienen delecciones de la señal de empaquetamiento incluyen, aunque sin limitaciones, PSI.2, PA317 y PA12, por ejemplo. Estas líneas celulares producen viriones vacíos, ya que no hay genoma empaquetado. Si se introduce un vector retroviral en esas células en las que la señal de empaquetamiento está intacta pero los genes estructurales se sustituyen por otros genes de interés, se puede empaquetar el vector y producirse el vector virión. Los viriones del vector producidos por este procedimiento se pueden utilizar para infectar una línea celular de tejido, como células NIH 3T3, para producir grandes cantidades de viriones retrovirales quiméricos.

También se pueden utilizar técnicas de liberación «no virales» para la terapia génica, que incluyen por ejemplo complejos de ADN-ligando, complejos de adenovirus de ligando-ADN, inyección directa de ADN, precipitación de  $\text{CaPO}_4$ , técnicas de pistola génica, electroporación, liposomas, lipofección y similares. Cualquiera de estos procedimientos está ampliamente disponible para un experto en la técnica y sería adecuado para su uso de acuerdo con la presente descripción. Hay otros procedimientos adecuados disponibles para un experto en la técnica y se ha de entender que la presente descripción puede llevarse a cabo utilizando cualquiera de los procedimientos de transfección disponibles. La lipofección puede realizarse encapsulando una molécula de ADN aislada dentro de una partícula liposómica y poniendo en contacto la partícula liposómica con la membrana celular de la célula diana. Los liposomas son partículas coloidales, autoensamblantes, en las que una bicapa lipídica, compuesta por moléculas anfifílicas tales como la fosfatidilserina o la fosfatidilcolina, encapsula una porción de los medios circundantes de manera que la bicapa lipídica rodee un interior hidrófilo. Se pueden construir liposomas unilamelares o multilamelares de manera que el interior contenga un agente químico, un fármaco, o, como en la presente descripción, una molécula de ADN aislada, deseados.

Determinadas realizaciones descritas en este documento incluyen polinucleótidos que hibridan con una secuencia de polinucleótido de AspRS de referencia o a sus complementos, en las condiciones de astringencia descritas a continuación. Tal como aquí se utiliza, la expresión «hibridar en condiciones de baja astringencia, media astringencia, alta astringencia y muy alta astringencia» describe las condiciones de hibridación y lavado. Se pueden encontrar las directrices para llevar a cabo reacciones de hibridación en Ausubel *et al.*, (1998, *supra*), secciones 6.3.1-6.3.6. También se describen en dicha referencia los medios acuosos y no acuosos que se pueden utilizar.

La referencia a condiciones de baja astringencia incluye y abarca desde al menos aproximadamente 1% v/v hasta al menos aproximadamente 15% v/v de formamida y desde al menos aproximadamente 1 M hasta al menos aproximadamente 2 M de sal para la hibridación a 42°C, y al menos aproximadamente 1 M hasta al menos aproximadamente 2 M de sal para el lavado a 42°C. Las condiciones de baja astringencia pueden incluir también 1% de albúmina de suero bovino (BSA), 1mM de EDTA, 0,5M de  $\text{NaHPO}_4$  (pH 7,2), 7% de SDS durante la hibridación a 65°C, y (i) 2 x SSC, 0,1 % de SDS; o (ii) 0,5 % de BSA, 1 mM de EDTA, 40 mM de  $\text{NaHPO}_4$  (pH 7,2) y SDS al 5% para el lavado a temperatura ambiente. Una forma de realización descrita en este documento de las condiciones de baja astringencia incluye la hibridación en 6 x cloruro de sodio / citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguida por dos lavados en 0,2 x SSC, 0,1% de SDS al menos a 50°C (la temperatura de lavado puede aumentarse hasta 55°C en condiciones de baja astringencia).

Las condiciones de astringencia media incluyen y abarcan desde al menos aproximadamente 16 % v/v hasta al menos aproximadamente 30 % v/v de formamida y desde al menos aproximadamente 0,5 M hasta al menos aproximadamente 0,9 M de sal para la hibridación a 42°C, y desde al menos aproximadamente 0,1 M hasta al menos aproximadamente 0,2 M de sal para el lavado a 55 °C. Las condiciones de astringencia media pueden incluir también 1% albúmina de suero bovino (BSA), 1 mM de EDTA, 0,5 M de  $\text{NaHPO}_4$  (pH 7,2), 7 % de SDS durante la hibridación a 65°C, y (i) 2 x SSC, 0,1 % de SDS; o (ii) 0,5 % de BSA, 1 mM de EDTA, 40 mM de  $\text{NaHPO}_4$  (pH 7,2) y SDS al 5% para el lavado a 60-65°C de temperatura. Una forma de realización descrita en este documento de las condiciones de astringencia media incluye la hibridación en 6 x SSC a aproximadamente 45 °C, seguida por uno o

más lavados en 0,2 x SSC, 0,1 % de SDS a 60 °C. Las condiciones de alta astringencia incluyen y abarcan desde al menos aproximadamente 31 % v/v hasta al menos aproximadamente 50 % v/v de formamida y desde aproximadamente 0,01 M hasta aproximadamente 0,15 M de sal para hibridación a 42 °C, y desde aproximadamente 0,01 M hasta aproximadamente 0,02 M de sal para el lavado a 55 °C.

5

Las condiciones de alta astringencia pueden incluir también 1 % de BSA, 1 mM de EDTA, 0,5 M de NaHPO<sub>4</sub> (pH 7,2), 7 % de SDS durante la hibridación a 65 °C, y (i) 0,2 x SSC, 0,1 % de SDS; o (ii) 0,5 % de BSA, 1 mM de EDTA, 40 mM de NaHPO<sub>4</sub> (pH 7,2) y SDS al 1 % para el lavado a una temperatura en exceso de 65 °C. Una forma de realización descrita en este documento de condiciones de alta astringencia incluye la hibridación en 6 x SSC a aproximadamente 45 °C, seguida por uno o más lavados en 0,2 x SSC, 0,1 % de SDS a 65 °C. Una realización descrita en el presente documento de condiciones de astringencia muy alta incluye la hibridación en 0,5 M de fosfato de sodio, 7 % de SDS a 65 °C, seguida por uno o más lavados en 0,2 x SSC, 1 % de SDS a 65 °C.

10

Son bien conocidas en la técnica otras condiciones de astringencia y los expertos en la materia reconocerán que se pueden manipular distintos factores para optimizar la especificidad de la hibridación. La optimización de la astringencia de los lavados finales puede servir para garantizar un alto grado de hibridación. Para consultar ejemplos detallados, véase Ausubel *et ál, supra* en las páginas 2.10.1 a 2.10.16 y Sambrook *et ál.* (1989, *supra*) secciones 1.101 a 1.104.

15

Aunque los lavados astringentes se llevan a cabo normalmente a temperaturas entre aproximadamente 42 °C y 68 °C, los expertos en la técnica valorarán si pueden ser adecuadas otras temperaturas en función de las condiciones de astringencia. El índice máximo de hibridación suele situarse normalmente en torno a 20 °C a 25 °C por debajo de la T<sub>m</sub> para la formación de un híbrido ADN-ADN. Es bien sabido en la técnica que la T<sub>m</sub> es la temperatura de fusión o temperatura a la que se disocian dos secuencias de polinucleótidos complementarios. Los procedimientos para estimar la T<sub>m</sub> son bien conocidos en la técnica (véase Ausubel *et ál., supra*, página 2.10.8).

25

En general, la T<sub>m</sub> de un dúplex perfectamente emparejado de ADN puede predecirse como aproximación mediante la fórmula:  $T_m = 81,5 + 16,6 (\log_{10} M) + 0,41 (\% G + C) - 0,63 (\% \text{ de formamida}) - (600 / \text{longitud})$ , donde: M es la concentración de Na<sup>+</sup>, preferiblemente en el intervalo de 0,01 a 0,4 molar; % G + C es la suma de las bases de guanosina y citosina en porcentaje del número total de bases, dentro del intervalo de 30 % a 75 % G + C; % de formamida es el porcentaje de concentración de formamida respecto al volumen; longitud es el número de pares de bases del dúplex de ADN. La T<sub>m</sub> de un dúplex de ADN disminuye en aproximadamente 1 °C con cada incremento de 1 % en el número de pares de bases aleatoriamente discrepantes. El lavado se lleva a cabo generalmente a T<sub>m</sub> - 15 °C para alta astringencia, o a T<sub>m</sub> - 30 °C con astringencia moderada.

35

En un ejemplo de procedimiento de hibridación descrito en este documento, se hibrida una membrana (p. ej., una membrana de nitrocelulosa o una membrana de nylon) que contenga ADN inmovilizado durante la noche a 42 °C en una solución reguladora de hibridación (50 % de formamida desionizada, 5 x SSC, 5 x Denhardt solución (0,1 % de ficol, 0,1 % de polivinilpirrolidona y 0,1 % de albúmina de suero bovino), 0,1 % de SDS y 200 mg/mL de ADN de esperma de salmón desnaturalizado) con una sonda marcada. La membrana se somete entonces a dos lavados de astringencia media secuenciales (es decir, 2 x SSC, 0,1 % de SDS durante 15 min a 45 °C, seguido por 2 x SSC, 0,1 % de SDS durante 15 min a 50 °C), seguido por dos lavados secuenciales de astringencia más alta (es decir, 0,2 x SSC, 0,1 % de SDS durante 12 min a 55 °C seguido por 0,2 x SSC y 0,1 % de solución SDS durante 12 min a 65-68 °C).

45

Las realizaciones de la presente descripción también incluyen oligonucleótidos, con fines de detección, amplificación, terapias antisentido u otros. Para estos y otros propósitos, se entiende que los términos «oligonucleótido», «oligo» y «oligómero» abarcan un «oligonucleótido» singular así como «oligonucleótidos» en plural, y hacen referencia a cualquier polímero de dos o más nucleótidos, nucleósidos, nucleobases o compuestos relacionados utilizados como reactivos en los procedimientos de amplificación de la presente descripción, así como en los subsiguientes procedimientos de detección. El oligonucleótido puede ser ADN o ARN o análogos de los mismos.

50

El término oligonucleótido no denota necesariamente una función en particular del reactivo, sino que se utiliza genéricamente para abarcar todos los reactivos descritos en este documento. Un oligonucleótido puede cumplir varias funciones diferentes, p. ej., puede funcionar como cebador si es capaz de hibridarse con una hebra complementaria y además se puede extender en presencia de una polimerasa de ácido nucleico, puede proporcionar un promotor si contiene una secuencia reconocida por una polimerasa de ARN y permite la transcripción, y puede funcionar para prevenir la hibridación o impedir la extensión del cebador si está situado o es

55

modificado adecuadamente. Un oligonucleótido también puede funcionar como sonda o como agente antisentido. Un oligonucleótido puede ser de prácticamente cualquier longitud y solamente está limitado por su función específica, p. ej., en una reacción de amplificación, en la detección de un producto de amplificación de la reacción de amplificación o en una aplicación de interferencia o antisentido de ARN. Cualquiera de los oligonucleótidos descritos en este documento se puede utilizar como cebador, sonda, oligómero antisentido o agente de interferencia de ARN.

El término «cebador», tal como aquí se utiliza, se refiere a un oligonucleótido monocatenario capaz de actuar como punto de iniciación para la síntesis de ADN de plantilla en condiciones adecuadas definidas, como por ejemplo, con solución reguladora y temperatura, en presencia de cuatro nucleósidos trifosfatos diferentes y un agente para la polimerización, como una polimerasa de ADN o ARN o transcriptasa inversa. La longitud del cebador, en cualquier caso concreto, depende, por ejemplo, del uso previsto del cebador y generalmente varía entre aproximadamente 15 y 30 nucleótidos, aunque se pueden utilizar cebadores más cortos y más largos. Las moléculas de cebador corto generalmente requieren temperaturas más frías para formar complejos híbridos suficientemente estables con la plantilla. Un cebador no tiene que reflejar la secuencia exacta de la plantilla pero debe ser suficientemente complementario para hibridar con dicha plantilla. El sitio del cebador es el área de la plantilla a la que se hibrida un cebador. El par de cebadores es un conjunto de cebadores que incluyen un cebador superior 5' que hibrida con el final 5' de la secuencia para amplificarse y un cebador inferior 3' que hibrida con el complemento del final 3' de la secuencia por amplificar.

El término «sonda», tal como se utiliza en el presente documento, hace referencia a una molécula de superficie inmovilizada que puede ser reconocida por un objetivo particular. Véase, p. ej., la patente de Estados Unidos. N.º 6 582 908 para un ejemplo de arrays con todas las posibles combinaciones de sondas de 10, 12 o más bases. Las sondas y los cebadores, tal como aquí se describen, suelen incluir al menos 10-15 nucleótidos contiguos de una secuencia conocida. Con el fin de mejorar la especificidad, también pueden emplearse sondas y cebadores más largos, tales como sondas y cebadores que incluyan al menos 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o al menos 150 nucleótidos de una secuencia de AspRS de referencia o su complemento. Las sondas y cebadores pueden ser considerablemente más largos que esos ejemplos y se entiende que puede utilizarse cualquier longitud con suficientes conocimientos en la materia y la especificación, incluidas las tablas, figuras y listados de secuencias.

Los procedimientos para preparar y utilizar sondas y cebadores se describen en las referencias, p. ej. Sambrook, J. *et ál.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.ª ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Press, Plainview N.Y.; Ausubel, F. M. *et ál.* (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publ. Assoc. & Wiley-Intersciences, New York N.Y.; Innis, M. *et ál.* (1990) *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego Calif. Se pueden derivar de una secuencia conocida pares de cebadores de PCR, por ejemplo utilizando programas informáticos destinados a tal fin, como Primer (versión 0.5, 1991, Instituto Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge Mass.).

Se pueden seleccionar los oligonucleótidos que se utilizarán como cebadores o sondas utilizando el software conocido en la técnica. Por ejemplo, el software OLIGO 4.06 es útil para la selección de pares de cebadores de PCR de hasta 100 nucleótidos cada uno y para el análisis de oligonucleótidos y polinucleótidos más grandes, de hasta 5000 nucleótidos, de una secuencia de polinucleótido de entrada de hasta 32 kilobases. El programa de selección de cebadores Primer3 (a disposición del público en el Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, Cambridge Mass.) permite al usuario crear una «biblioteca de no cebadores», en la que puede especificar qué secuencias se deben evitar como sitios de unión del cebador. Los oligonucleótidos y fragmentos de polinucleótidos identificados por cualquiera de los procedimientos de selección anteriores son útiles en las tecnologías de hibridación, por ejemplo, como cebadores de PCR o de secuenciación, elementos de microarrays o sondas específicas para identificar total o parcialmente polinucleótidos complementarios en una muestra de ácidos nucleicos. Los métodos de selección de oligonucleótidos no se limitan a los descritos en el presente documento.

Los términos «oligómero antisentido», «compuesto antisentido» y «oligonucleótido antisentido» se usan indistintamente y hacen referencia a una secuencia de subunidades cíclicas, cada una con una fracción de par de bases, unidas por enlaces entre subunidades que permiten hibridar las fracciones de pares de bases con una secuencia diana en un ácido nucleico (normalmente un ARN) por emparejamiento de bases Watson-Crick, para formar un ácido nucleico heterodúplex oligómero dentro de la secuencia diana y normalmente prevenir así la traducción de ese ARN. También se incluyen los procedimientos de uso de los mismos para modular la expresión de un transcrito de AspRS seleccionado, como una variante de splicing o un fragmento proteolítico o su correspondiente polipéptido.

Los oligonucleótidos antisentido pueden contener aproximadamente entre 8 y 40 subunidades, normalmente

aproximadamente entre 8 y 25 subunidades y preferentemente aproximadamente entre 12 y 25 subunidades. En determinadas realizaciones descritas en este documento, los oligonucleótidos pueden tener una complementariedad de secuencia exacta con la secuencia diana o acercarse a ella, tal como se define a continuación. En determinadas realizaciones descritas en este documento, el grado de complementariedad entre la diana y la secuencia de acceso antisentido es suficiente para formar un dúplex estable. La región de complementariedad de los oligómeros antisentido con la secuencia de ARN diana puede ser de apenas 8-11 bases, pero es preferible que tenga 12-15 bases o más, p. ej., 12-20 bases o 12-25 bases, incluidos todos los números enteros de esos intervalos. Un oligómero antisentido de aproximadamente 14-15 bases suele ser suficiente para tener una secuencia complementaria única para el transcrito de AspRS seleccionado.

10 En determinadas realizaciones descritas en este documento, pueden ser preferibles oligómeros antisentido de hasta 40 bases, donde al menos un número mínimo de bases, p. ej., 10-12 bases, sea complementario con la secuencia diana. En general, sin embargo, se optimiza la absorción facilitada o activa en las células con longitudes de oligómeros menos de aproximadamente 30. En ciertos oligómeros descritos más adelante, suele producirse un equilibrio óptimo entre estabilidad de unión y absorción en longitudes de 18-25 bases. Esto incluye oligómeros antisentido (p. ej., PNAs, LNAs, 2'-OMe, MOE, morfolinos) que consisten en aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 bases, donde al menos aproximadamente 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 bases contiguas o no contiguas son complementarias de su secuencia de AspRS diana o variantes de las mismas.

En determinadas formas de realización descritas en el presente documento, los oligómeros antisentido puede ser 100 % complementarios de la secuencia diana de ácido nucleico de AspRS o pueden incluir discrepancias, p. ej., para dar cabida a variantes, siempre y cuando un heterodúplex formado entre el oligómero y la secuencia diana de ácido nucleico de AspRS sea suficientemente estable como para resistir la acción de las nucleasas celulares y otras formas de degradación que pueden producirse *in vivo*. A continuación se describen las principales cadenas de oligómeros que son menos susceptibles a la escisión por nucleasas. Las discrepancias, si están presentes, son menos desestabilizadoras en las regiones extremas del dúplex híbrido que en el centro. El número de discrepancias permitidas dependerá de la longitud del oligómero, del porcentaje de pares de bases G:C del dúplex y de la posición de la discrepancia o discrepancias en el dúplex, de acuerdo con principios bien conocidos de la estabilidad del dúplex. Aunque tal oligómero antisentido no es necesariamente complementario al 100 % de la secuencia diana de ácido nucleico de AspRS, es efectivo para unirse estable y específicamente a la secuencia diana, de tal manera que se module una actividad biológica del ácido nucleico diana, como, por ejemplo, la expresión de la proteína o proteínas de AspRS.

35 La estabilidad del dúplex formado entre un oligómero y una secuencia diana es una función de la  $T_m$  de unión y la susceptibilidad del dúplex a la escisión enzimática celular. La  $T_m$  de un oligonucleótido antisentido con respecto al ARN complementario de la secuencia se puede medir por procedimientos convencionales, como los descritos por Hames et al., *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, 1985, pp.107-108 o como se describe en Miyada C.G. and Wallace R.B., 1987, *Oligonucleotide hybridization techniques*, *Methods Enzymol.* Vol. 154 pp. 94-107. En determinadas realizaciones descritas en este documento, el oligómero antisentido puede tener una  $T_m$  de unión, con respecto a un ARN complementario de la secuencia, mayor que la temperatura corporal y preferiblemente superior a 50 °C. Se prefiere una  $T_m$  en el intervalo de 60-80 °C o superior. Según los principios bien conocidos, la  $T_m$  de un compuesto oligómero, con respecto a un ARN híbrido complementario de la base, se puede aumentar incrementando la relación C:G del par de bases del dúplex o incrementando la longitud (en los pares de bases) del heterodúplex.

Se pueden diseñar oligómeros antisentido para bloquear o inhibir la traducción del ARNm o para inhibir el procesamiento natural de splicing del pre-ARNm o inducir la degradación de ARNm específicos y puede decirse que «se dirige a» o «se dirige contra» una secuencia diana con la que hibrida. En determinadas realizaciones descritas en este documento, la secuencia diana puede incluir cualquier secuencia codificante o no codificante de un transcrito de ARNm de AspRS y, por lo tanto, puede estar dentro de un exón o de un intrón. En determinadas realizaciones descritas en este documento, la secuencia diana es relativamente única o excepcional entre AspRS y es selectiva para reducir la expresión de un fragmento o variante de splicing proteolítico de AspRS seleccionado. En determinadas realizaciones descritas en este documento, la zona diana incluye un sitio splicing 3' o 5' de ARNm preprocesado o un punto de ramificación. La secuencia diana para un sitio de splicing puede incluir una secuencia de ARNm que tenga su extremo 5' de entre 1 a aproximadamente 25 a aproximadamente 50 pares de bases inferiores de una unión de aceptor de splicing o superior de una unión de donador de splicing en un ARNm preprocesado. En general se suele decir que un oligómero está «dirigido contra» una diana biológicamente

relevante, como un polinucleótido de AspRS de referencia, cuando se dirige contra el ácido nucleico de la diana de la forma descrita en este documento.

Una «subunidad» de un oligonucleótido hace referencia a una unidad de nucleótido (o nucleótido análogo). El término puede referirse a la unidad de nucleótido con o sin el enlace intersubunidades adjunto, aunque, cuando se hace referencia a una «subunidad con carga», normalmente la carga reside en el enlace intersubunidades (p. ej., un enlace de fosfato o fosforotioato o un enlace catiónico).

Las subunidades cíclicas de un oligonucleótido pueden basarse en ribosa u otra pentosa de azúcar o, en determinadas realizaciones, en grupos alternativos o modificados. Ejemplos de cadenas principales de oligonucleótidos modificados son, aunque sin limitarse a ellos, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metilo y otros alquilfosfonatos como 3'-alquileo y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluidos 3'-amino fosforamidatos y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfatos con enlaces 3'-5' normales, enlaces 2'-5' análogos a estos, y aquellos con la polaridad invertida donde los pares adyacentes de unidades de nucleósido están unidos 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se contemplan ácidos péptido nucleicos (PNAs), ácidos nucleicos bloqueados (LNAs), oligonucleótidos 2'-O-metil (OME), oligonucleótidos 2'-metoxietoxi (MOE), morfolinós, entre otros oligonucleótidos conocidos en la técnica.

La fracción de par de bases de purina o pirimidina es normalmente adenina, citosina, guanina, uracilo, timina o inosina. También se incluyen bases tales como piridin-4-ona, piridin-2-ona, fenilo, pseudouracilo, benceno 2,4,6-trimetil-5-hidroxilo, 3-metil uracilo, dihidrouridina, naftilo, aminofenilo, 5-alquilcitosinas (p. ej., 5-metilcitosina), 5-alquiluridinas (p. ej., ribotimidina), 5-halouridina (p. ej., 5-bromouridina) o 6-azapirimidinas o 6-alquilpirimidinas (p. ej., 6-metiluridina), propino, quesosina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, wibutosina, wibutoxosina, 4-acetiluridina, 5-carboxihidroximetil uridina, 5'-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluridina,  $\beta$ -D-galactosilqueosina, 1-metiladenosina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanosa, 3-metilcitosina, 2-metiladenosina, 2-metilguanosa, N6-metiladenosina, 7-metilguanosa, 5-metoxiaminometil-2-tiouridina, 5-metilaminometiluridina, 5-metilcarboniluridina, 5-metiloxiuridina, 5-metil-2-tiouridina, 2-metil-N6-isopenteniladenosina,  $\beta$ -D-manosilqueosina, ácido uridina-5-oxiacético, 2-tiocitosina, derivados de treonina y otras (Burgin *et al.*, 1996, *Biochemistry*, 35, 14090; Uhlmann & Peyman, *supra*). Se entiende por «bases modificadas» en este aspecto bases de nucleótidos distintas de adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) y uracilo (U), como se ilustra arriba; tales bases pueden utilizarse en cualquier posición en la molécula antisentido. Los expertos en la técnica apreciarán que, en función de los usos de los oligómeros, Ts y Us son intercambiables. Por ejemplo, con otras químicas antisentido, tales como oligonucleótidos antisentido 2'-O-metilo que son más similares al ARN, las bases T pueden aparecer como U.

Un oligonucleótido es normalmente complementario de una secuencia diana, como un ADN o ARN diana. Los términos «complementarias» y «complementariedad» se refieren a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados con las reglas del apareamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia «A-G-T» es complementaria de la secuencia «T-C-A». La complementariedad puede ser «parcial», donde sólo se emparejan algunas de las bases de ácidos nucleicos según las reglas del apareamiento de bases. O puede haber una complementariedad «completa» o «total» (100 %) entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre cadenas de ácido nucleico tiene efectos significativos sobre la eficiencia y fuerza de hibridación entre cadenas de ácido nucleico. Aunque suele ser deseable la complementariedad perfecta, algunas realizaciones pueden incluir una o más, aunque preferiblemente 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 discrepancias respecto a la secuencia diana. Están incluidas las variaciones en cualquier ubicación dentro del oligómero. En determinadas realizaciones, las variaciones en la secuencia cerca de los extremos de un oligómero suelen ser preferibles a las variaciones en el interior y, si están presentes, normalmente están a aproximadamente 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótidos del terminal 5' o 3'.

El término «secuencia diana» se refiere a una porción del ARN diana contra la que se dirige el oligonucleótido, es decir, la secuencia a la que hibridará por Watson-Crick el oligonucleótido de una secuencia complementaria. En determinadas realizaciones, la secuencia diana puede ser una región contigua de un ARNm de AspRS (p. ej., una zona de unión única de un ARNm de AspRS) o puede estar compuesta por regiones no contiguas al ARNm.

El término «secuencia de acceso» o en determinadas realizaciones «secuencia de acceso antisentido» se refiere a la secuencia en un oligonucleótido que es complementaria (es decir, adicionalmente, sustancialmente complementaria) a la secuencia diana de la molécula de ADN o ARN diana. La secuencia completa, o sólo una parte, del compuesto antisentido puede ser complementaria de la secuencia diana. Por ejemplo, en un

oligonucleótido que tenga 20-30 bases, aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 podrán ser secuencias de acceso complementarias de la región diana. Normalmente, la secuencia de acceso está formada por bases contiguas pero alternativamente puede estar formada por secuencias no contiguas que, al colocarse juntas, p. ej., a partir de los extremos opuestos del oligonucleótido, constituyen una  
5 secuencia que abarca la secuencia diana.

Las secuencias diana y de acceso se describen como «complementarias» entre sí cuando la hibridación se produce en una configuración antiparalela. Una secuencia de acceso puede tener complementariedad «cercana» o «sustancial» con la secuencia diana y seguir funcionando con los fines de la presente descripción, es decir, seguirá  
10 siendo funcionalmente «complementaria».

Un oligonucleótido «hibrida específicamente» con un polinucleótido diana si el oligómero hibrida con una diana (p. ej., un polinucleótido de AspRS de referencia o su complemento) en condiciones fisiológicas, con una  $T_m$  sustancialmente superior a 45 °C, preferiblemente de al menos 50 °C y normalmente de 60 °-80 °C o más. Tal  
15 hibridación corresponde preferiblemente a condiciones de hibridación astringentes. Con una determinada fuerza iónica y pH, la  $T_m$  es la temperatura a la cual el 50 % de una secuencia diana hibrida con un polinucleótido complementario. Una vez más, dicha hibridación puede producirse con complementariedad «cercana» o «sustancial» del oligómero antisentido a la secuencia diana, así como con complementariedad exacta.

20 Las expresiones «se une específicamente» o «hibrida específicamente» hacen referencia generalmente a una sonda de oligonucleótido o secuencia de polinucleótidos que no sólo se une a su secuencia de gen diana objetivo en una muestra en condiciones de hibridación seleccionadas, sino que se une significativamente a otras secuencias diana de la muestra y, por tanto, discrimina entre su objetivo y el resto de dianas del grupo de destino. Una sonda que hibrida específicamente con su secuencia diana objetivo también puede detectar diferencias de concentración en las  
25 condiciones de hibridación selectivas, como se describe en el presente documento.

Como se señaló anteriormente, ciertos oligonucleótidos proporcionados en este documento incluyen ácidos péptido nucleicos (PNAs). También se incluyen subunidades de ácidos nucleicos bloqueados (LNAs). Las estructuras de LNAs son conocidas en la técnica: p. ej., Wengel, et al., Chemical Communications (1998) 455; Tetrahedron (1998)  
30 54, 3607, y Accounts of Chem. Research (1999) 32, 301; Obika, et al., Tetrahedron Letters (1997) 38, 8735; (1998) 39, 5401, y Bioorganic Medicinal Chemistry (2008)16, 9230. Ciertos oligonucleótidos pueden incluir subunidades basadas en morfolinos que tengan fracciones de apareamiento de bases, unidas por enlaces sin carga o sustancialmente sin carga. Los términos «oligómero de morfolino» o «PMO» (oligómeros de morfolino fosforamidato o fosfordiamidato) se refieren a un análogo de oligonucleótido compuesto por estructuras de subunidades de  
35 morfolino, donde (i) las estructuras están unidas entre sí mediante enlaces que contienen fósforo, de uno a tres átomos de largo, preferiblemente dos átomos de largo, y preferiblemente sin carga o catiónico, uniéndose al nitrógeno de morfolino de una subunidad a un 5' de carbono exocíclico de una subunidad adyacente, y (ii) cada anillo morfolino lleva una purina o pirimidina o una fracción efectiva de apareamiento de bases equivalente para unirse, mediante enlace de hidrógeno específico de base, a una base en un polinucleótido.

40 En determinadas realizaciones descritas en este documento, los oligonucleótidos se pueden preparar mediante síntesis en fase sólida por etapas, empleando procedimientos detallados en las referencias citadas anteriormente, y a continuación respecto a la síntesis de oligonucleótidos que tienen una mezcla o enlaces de esqueleto sin carga y catiónicos. En algunos casos, puede ser deseable añadir fracciones químicas adicionales al oligonucleótido, p. ej.  
45 para mejorar la farmacocinética o para facilitar la captura o detección del compuesto. Ese tipo de fracciones pueden unirse covalentemente, normalmente a un terminal del oligómero, siguiendo procedimientos sintéticos convencionales. Por ejemplo, la adición de un resto de polietilenglicol u otro polímero hidrófilo, p. ej., uno que tenga 10-100 subunidades monoméricas, puede ser útil para potenciar la solubilidad. Uno o más grupos cargados, p. ej., grupos cargados aniónicos como un ácido orgánico, pueden mejorar la captación celular.

50 Para volver detectable un oligonucleótido, se pueden utilizar distintas moléculas detectables, como radioisótopos, fluorocromos, colorantes, enzimas, nanopartículas, marcadores quimioluminiscentes, biotina u otro monómero conocido en la técnica que puede ser detectado directamente (p. ej., mediante la emisión de luz) o indirectamente (p. ej., mediante la unión de un anticuerpo marcado con fluorescencia).

55 Determinadas realizaciones descritas en este documento se refieren a agentes de ARN de interferencia (ARNi) dirigidos a uno o más transcritos de ARNm de un polinucleótido de AspRS de referencia, incluidos fragmentos y variantes de las mismas. También se incluyen los procedimientos de uso de los mismos para modular los niveles de una transcrito de AspRS seleccionado, como una variante de splicing o fragmento proteolítico de AspRS.

El término «bicatenario» se refiere a dos cadenas de ácidos nucleicos separadas que incluyen una región en la que al menos una porción de las hebras son suficientemente complementarias para unirse con hidrógeno y formar una estructura dúplex. El término «dúplex» o «estructura dúplex» hace referencia a la región de una molécula bicatenaria en la que las dos hebras separadas son sustancialmente complementarias y por lo tanto hibridan entre sí. «dsARN» (ARN bicatenario) hace referencia a una molécula de ácido ribonucleico que tiene una estructura dúplex con dos hebras de ácido nucleico complementarias y antiparalelas (es decir, las hebras sentido y antisentido). No todos los nucleótidos de un dsARN deben presentar emparejamiento de bases Watson-Crick; las dos hebras de ARN pueden ser sustancialmente complementarias. Las hebras de ARN pueden tener el mismo o un número diferente de nucleótidos.

Las hebras de un dsARN son suficientemente complementarias como para hibridar y formar una estructura dúplex. En determinadas realizaciones descritas en este documento, la hebra de ARN complementario puede ser inferior a 30 nucleótidos, inferior a 25 nucleótidos de longitud o incluso de 19 a 24 nucleótidos de longitud. En ciertos aspectos, la secuencia de nucleótidos complementaria puede ser de 20-23 nucleótidos de longitud o de 22 nucleótidos de longitud.

En determinadas realizaciones descritas en este documento, al menos una de las hebras del ARN incluye un excedente de nucleótidos de 1 a 4 nucleótidos de longitud. En otras formas de realización descritas en el presente documento, una o ambas hebras son de extremos romos. En determinadas realizaciones descritas en este documento, el dsARN puede incluir además al menos un nucleótido modificado químicamente.

Determinadas realizaciones de la presente descripción pueden incluir microARN. Los microARN representan un gran grupo de pequeños ARN producidos de forma natural en los organismos, algunos de los cuales regulan la expresión de genes diana. Los microARN se forman a partir de un precursor monocatenario de aproximadamente 70 nucleótidos transcrito por Dicer. (V. Ambros *et ál.* Current Biology 13:807, 2003).

En determinadas realizaciones descritas en este documento también se pueden emplear ARN interferentes pequeños (ARNip). Cada hebra de un agente ARNip puede ser igual o inferior a 35, 30, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16 o 15 nucleótidos de longitud. La hebra es preferiblemente de al menos 19 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, cada hebra puede ser de entre 21 y 25 nucleótidos de longitud. Los agentes ARNip preferidos tienen una región dúplex de 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 pares de nucleótidos, y uno o más excedentes, preferiblemente uno o dos salientes de 3', de 2-3 nucleótidos.

Un «agente monocatenario de ARNi», tal como se utiliza en el presente documento, es un agente de ARNi que consta de una sola molécula. Puede incluir una región dúplex, formada por apareamiento intracatenario, p. ej., puede ser, o incluir, una estructura de horquilla o saliente. Un agente ARNi de una sola hebra tiene al menos 14 y, preferiblemente al menos 15, 20, 25, 29, 35, 40, o 50 nucleótidos de longitud. Tiene preferiblemente menos de 200, 100 o 60 nucleótidos de longitud.

Los agentes moduladores de la horquilla de ARNi pueden tener una región dúplex igual o de al menos 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 pares de nucleótidos. La región dúplex será preferiblemente igual o inferior a 200, 100 o 50 de longitud. Algunos intervalos de la región dúplex son de 15-30, 17 a 23, 19 a 23 y 19 a 21 pares de nucleótidos de longitud. La horquilla puede tener una sola hebra excedente o una región de terminales no apareados, preferiblemente el 3' y, a poder ser, del lado antisentido de la horquilla. En determinadas realizaciones descritas en este documento, los excedentes tienen 2-3 nucleótidos de longitud.

La presente descripción abarca además oligonucleótidos que emplean ribozimas. También se describen en este documento sistemas de liberación de vectores capaces de expresar las secuencias centradas en AspRS descritas en este documento. También se describen en el presente documento vectores que expresan ARNip u otras moléculas de ARN de interferencia de formación de dúplex. Ejemplos de sistemas de liberación pueden ser los sistemas de vector vital(es decir, transducción mediada por virus), que incluyen, aunque sin limitarse a ellos, vectores retrovirales (p. ej., lentivirales), vectores adenovirales, vectores virales adenoasociados y vectores virales de herpes, entre otros conocidos en la materia.

Los oligonucleótidos y agentes de ARNi centrados en una o más porciones de una secuencia de referencia del polinucleótido de AspRS o su complemento se pueden usar en cualquiera de los procedimientos terapéuticos, de diagnóstico o de detección de fármacos descritos en la presente memoria y bien conocidos para los expertos en la técnica.

**Composiciones de anticuerpos, fragmentos de los mismos y otros agentes de unión**

De acuerdo con otro aspecto descrito, la presente descripción proporciona además agentes de unión, como anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, receptores solubles, moléculas pequeñas, aptámeros etc., que presentan especificidad de unión a un polipéptido descrito en el presente documento, o a una porción, variante o derivado del mismo, y procedimientos de utilización de los mismos. Preferiblemente, tales agentes de unión son eficaces para modular una o más de las actividades no canónicas mediadas por un polipéptido de AspRS de la descripción. En determinadas realizaciones descritas en este documento, p. ej., el agente de unión se une a un polipéptido de AspRS descrito en este documento e inhibe su capacidad para unirse a una o más de sus parejas de unión celulares. Por consiguiente, dichos agentes de unión se pueden utilizar para tratar o prevenir enfermedades, trastornos u otras afecciones mediadas por un polipéptido de AspRS descrito en este documento antagonizando su actividad.

Se dice que un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, «se une específicamente», «se une inmunológicamente» o es «inmunológicamente reactivo» a un polipéptido de la descripción si reacciona a un nivel detectable (dentro, p. ej., de un ensayo ELISA) con el polipéptido y no reacciona de forma detectable con polipéptidos no relacionados en condiciones similares.

La unión inmunológica, como se utiliza en este contexto, se refiere generalmente a las interacciones no covalentes del tipo que se producen entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para el que es específica la inmunoglobulina. La fuerza o afinidad de las interacciones de unión inmunológicas se pueden expresar en términos de disociación constante ( $K_d$ ) de la interacción, donde una  $K_d$  menor representa una afinidad mayor. Las propiedades de unión inmunológica de polipéptidos seleccionados pueden cuantificarse usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Uno de dichos procedimientos implica medir los índices de la formación del complejo del sitio de unión a antígeno y la disociación, donde dichos niveles dependen de las concentraciones de las parejas de los complejos, la afinidad de la interacción y de parámetros geométricos que influyen igualmente en el índice en ambas direcciones. Así, tanto la «constante de asociación» ( $K_{on}$ ) como la «constante de disociación» ( $K_{off}$ ) se pueden determinar mediante el cálculo de las concentraciones y los índices reales de asociación y disociación. La relación  $K_{off}/K_{on}$  permite cancelar todos los parámetros no relacionados con la afinidad y es así igual a la constante de disociación  $K_d$ . Véase, p. ej., Davies *et ál.* (1990) Annual Rev. Biochem. 59:439-473.

Un «sitio de unión a antígeno» o una «porción 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 de antígeno está formado por residuos de aminoácidos de las regiones variables N-terminal («V») de las cadenas pesada («H») y ligera («L»). Tres tramos altamente divergentes dentro de las regiones V de las cadenas pesada y ligera se denominan «regiones hipervariables» que se interponen entre los tramos flanqueantes más conservados conocidos como «regiones marco» o «FR». Así, el término «FR» se refiere a secuencias de aminoácidos que se encuentran de forma natural entre y adyacentes a regiones hipervariables en 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 unas respecto a las otras en un 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 denominan «regiones determinantes de complementariedad» o «CDR».

Un agente de unión puede ser, p. ej., un ribosoma, con o sin un componente peptídico, una molécula de ARN o un polipéptido. En una realización preferida descrita en este documento, un agente de unión es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Los anticuerpos se pueden preparar mediante cualquiera de las múltiples técnicas conocidas por los expertos. Véase, p. ej., Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Los anticuerpos monoclonales específicos para un polipéptido de interés se pueden preparar, p. ej., utilizando la técnica de Kohler y Milstein, Eur. J. Immunol. 6:511-519, 1976, y sus mejoras. Los polipéptidos de esta descripción se pueden utilizar en el proceso de purificación, p. ej., en una fase de cromatografía de afinidad.

Un fragmento «Fv» se puede producir mediante escisión proteolítica preferencial de una IgM y, en raras ocasiones, de una molécula de inmunoglobulina IgG o IgA. Sin embargo, es más común que los fragmentos Fv se deriven utilizando métodos recombinantes conocidos en la técnica. El fragmento Fv incluye un heterodímero no covalente  $V_H:V_L$  que incluye un sitio de unión a antígeno que conserva gran parte de la capacidad de reconocimiento y unión a antígeno de la molécula de anticuerpo primaria. Inbar *et ál.* (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69:2659-2662;

Hochman *et ál.* (1976) *Biochem* 15:2706-2710; and Ehrlich *et ál.* (1980) *Biochem* 19:4091-4096.

Un polipéptido de cadena sencilla de Fv («sFv») es un heterodímero V<sub>H</sub>:V<sub>L</sub> unido covalentemente que se expresa a partir de una fusión génica con genes que codifican V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> unidos por un conector que codifica un péptido. Huston *et ál.* (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85(16):5879-5883. Se han descrito diversos procedimientos para discernir estructuras químicas para la conversión de cadenas de polipéptidos de cadena ligera y pesada agregadas naturalmente –pero químicamente separadas– de la región V de un anticuerpo en una molécula sFv que se plegará en un estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de unión a antígeno. Véanse, *p.ej.*, las patentes de Estados Unidos números 5 091 513 y 5 132 405, de Huston *et ál.*; y la patente de Estados Unidos N.º 4 946 778, de Ladner *et ál.*

Cada una de las moléculas anteriormente descritas incluye un conjunto de CDR de cadena pesada y cadena ligera, respectivamente interpuestas entre un conjunto de FR de cadena pesada y cadena ligera, que proporciona soporte a las CDR y define la relación espacial de las CDR entre sí. Tal como aquí se utiliza, el término «conjunto de CDR» se refiere a las tres regiones hipervariables de una región V de cadena pesada o ligera. Partiendo del N-terminal de una cadena pesada o ligera, estas regiones se denominan «CDR1», «CDR2», y «CDR3», respectivamente. Un sitio de unión a antígeno, por lo tanto, incluye seis CDR, que engloban el conjunto de CDR de cada región V de una cadena pesada y ligera. Un polipéptido que conste de una única CDR, (*p. ej.*, un CDR1, CDR2 o CDR3) se denomina aquí «unidad de reconocimiento molecular». El análisis cristalográfico de diversos complejos antígeno-anticuerpo ha demostrado que los residuos de aminoácidos de CDR forman un contacto extenso con el antígeno unido, en el que el contacto con el antígeno más extenso es con la cadena pesada CDR3. Por lo tanto, las unidades de reconocimiento moleculares son principalmente responsables de la especificidad de un sitio de unión a antígeno.

Tal como aquí se utiliza, la expresión «conjunto de FR» hace referencia a las cuatro secuencias de aminoácidos flanqueantes que enmarcan a las CDR de un conjunto de CDR de una región V de cadena pesada o ligera. Algunos residuos FR pueden comunicarse con el antígeno unido; sin embargo, las FR son principalmente responsables del plegamiento de la región V en el sitio de unión a antígeno, concretamente los residuos de FR directamente adyacentes a las CDR. Dentro de las FR, determinados residuos de aminoácidos y determinadas características estructurales se conservan muy bien. En este sentido, todas las secuencias de región V contienen un bucle disulfuro interno de alrededor de 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. En general se reconoce que se conservan regiones estructurales de FR que influyen en la conformación plegada de los bucles de CDR en ciertas estructuras «canónicas», independientemente de la secuencia de aminoácidos de la CDR concreta. Además, ciertos residuos de FR son conocidos por participar en contactos interdominio no covalentes que estabilizan la interacción de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo.

Se han descrito distintas moléculas de anticuerpos «humanizadas» que incluyen 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 ál.* (1991) *Nature* 349:293-299; LoBuglio *et ál.* (1989) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:4220-4224; Shaw *et ál.* (1987) *J Immunol.* 138:4534-4538; y Brown *et ál.* (1987) *Cancer Res.* 47:3577-3583), CDR de roedor injertadas en un FR de soporte humano antes de la fusión con un dominio constante de anticuerpo humano apropiado (Riechmann *et ál.* (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyen *et ál.* (1988) *Science* 239:1534-1536; y Jones *et ál.* (1986) *Nature* 321:522-525), y CDR de roedor soportadas por FR de roedor recubiertas recombinantemente (publicación de patente europea N.º 519 596, publicada el 23 de diciembre de 1992). Estas moléculas «humanizadas» están diseñadas para minimizar la respuesta inmunológica no deseada hacia moléculas de anticuerpos de roedores antihumanos que limita la duración y eficacia de las aplicaciones terapéuticas de esas fracciones en receptores humanos.

Como se señaló anteriormente, se incluyen los «péptidos» como agentes de unión. El término péptido se refiere normalmente a un polímero de residuos de aminoácidos y a variantes y análogos sintéticos del mismo. En determinadas realizaciones descritas en este documento, el término «péptido» se refiere a polipéptidos relativamente cortos, incluidos péptidos que consisten en aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos, incluidos todos los números enteros e intervalos intermedios (*p. ej.*, 5-10, 8-12, 10-15), y que interactúan con un polipéptido de AspRS, su pareja de unión celular o ambos. Los péptidos pueden estar compuestos de aminoácidos de origen natural o de aminoácidos de origen no natural, como se describe en el presente documento.

Un agente de unión puede incluir un péptido mimético u otra molécula pequeña. Una «molécula pequeña» hace referencia a un compuesto orgánico de origen sintético o biológico (biomolécula) que, por lo general, no es un

- polímero. Compuestos orgánicos hace referencia a una amplia clase de compuestos químicos cuyas moléculas contienen carbono, excluyendo normalmente aquellos que contienen solamente carbonatos, óxidos simples de carbono o cianuros. «Biomolécula» hace generalmente referencia a una molécula orgánica producida por un organismo vivo, incluidas grandes moléculas poliméricas (biopolímeros), como péptidos, polisacáridos o ácidos nucleicos, y moléculas pequeñas, como metabolitos primarios secundarios, lípidos, fosfolípidos, glicolípidos, esteroides, glicerolípidos, vitaminas y hormonas. «Polímero» hace referencia generalmente a una molécula grande o macromolécula compuesta por unidades estructurales repetitivas, que normalmente están conectadas por enlaces químicos covalentes.
- 10 En determinadas realizaciones descritas en este documento, una molécula pequeña tiene un peso molecular de menos de 1000 daltons, normalmente entre aproximadamente 300 y 700 daltons, e incluyendo aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, o 1000 daltons.
- Los aptámeros también se incluyen como agentes de unión. Los ejemplos de aptámeros incluyen aptámeros de ácidos nucleicos (p. ej., aptámeros de ADN, aptámeros de ARN) y aptámeros peptídicos. Los aptámeros de ácidos nucleicos son generalmente especies de ácido nucleico que han sido modificadas mediante rondas repetidas de selección *in vitro* o un procedimiento equivalente, tales como SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial), para unirse a varias dianas moleculares como pequeñas moléculas, proteínas, ácidos nucleicos e incluso células, tejidos y organismos. Por lo tanto, se incluyen aptámeros de ácidos nucleicos que se unen a los polipéptidos de AspRS descritos en este documento o a sus parejas de unión celular.
- 15 Los aptámeros peptídicos normalmente incluyen un bucle de peptídico variable anclado en ambos extremos a un armazón de proteína, una restricción estructural doble que normalmente aumenta la afinidad de unión del aptámero de péptido hasta niveles comparables a los de un anticuerpo de (p. ej., en el intervalo nanomolar). En determinadas realizaciones descritas en este documento, la longitud del bucle variable puede estar compuesta por alrededor de 10-20 aminoácidos (incluidos todos los números enteros intermedios), y el armazón puede incluir cualquier proteína que tenga buena solubilidad y propiedades de compacidad. Determinados ejemplos de realización descritos en esta memoria pueden utilizar la proteína bacteriana tioredoxina-A como proteína armazón, insertándose el bucle variable en el sitio activo reductor (bucle Cys-Gly-Pro-Cys en la proteína natural), siendo las dos cadenas laterales de cisteínas capaces de formar un puente disulfuro. Por lo tanto, se incluyen los aptámeros de péptidos que se unen a los polipéptidos de AspRS descritos en este documento o sus parejas de unión celulares. La selección de los aptámeros de péptidos se puede realizar utilizando diferentes sistemas conocidos en la técnica, incluido el sistema de dos híbridos de levadura.
- 20 Como se señaló anteriormente, los polipéptidos de AspRS y los agentes de unión de la presente descripción pueden ser utilizados en cualquiera de los procedimientos de diagnóstico, detección de fármacos o terapéuticos aquí descritos.
- En otra realización de la descripción, agentes de unión tales como anticuerpos monoclonales descritos en este documento pueden acoplarse a uno o más agentes de interés. Por ejemplo, un agente terapéutico puede acoplarse (p. ej., unirse covalentemente) a un anticuerpo monoclonal adecuado directa o indirectamente (p. ej., a través de un grupo conector). Es posible una reacción directa entre un agente y un anticuerpo cuando cada uno posea un sustituyente capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleofílico, como un grupo amino o sulfhídrico, en uno puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contenga carbonilo, como un anhídrido o un haluro de ácido, o con un grupo alquilo que contenga un buen grupo saliente (p. ej., un haluro) en el otro.
- 25 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 la interferencia con las capacidades de unión. Un grupo conector también puede servir para aumentar la reactividad química de un sustituyente en un agente o en un anticuerpo y, en consecuencia, aumentar la eficiencia del acoplamiento. Un incremento de la reactividad química también puede facilitar el uso de agentes o grupos funcionales en agentes, que de otro modo no sería posible.
- 30 Será evidente para los expertos en la técnica que se puede emplear como grupo conector toda una serie de reactivos bifuncionales o polifuncionales, tanto homo como heterofuncionales (como los descritos en el catálogo de Pierce Chemical Co., Rockford, IL). El acoplamiento se puede efectuar, p. ej., a través de grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhídricos o residuos de carbohidrato oxidados. Hay numerosas referencias que describen dicha metodología, como, p. ej., la patente de EE.UU. N.º 4 671 958, de Rodwell *et al.*
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55

5 Cuando un agente terapéutico es más potente cuando está libre de la porción de anticuerpo de los  
 inmunocombinados de la presente descripción, puede ser deseable utilizar un grupo conector que sea escindible  
 durante o después de la internalización en una célula. Se han descrito varios grupos diferentes de conectores  
 escindibles. Los mecanismos para la liberación intracelular de un agente de estos grupos conectores incluyen la  
 10 escisión por reducción de un enlace disulfuro (*p.ej.*, la patente de Estados Unidos N.º 4 489 710, de Spitler), por  
 irradiación de un enlace fotolábil (*p.ej.*, la patente de Estados Unidos N.º 4 625 014, de Senter et al.), por hidrólisis  
 de cadenas laterales de aminoácidos derivatizados (*p.ej.*, la patente de Estados Unidos N.º 4 638 045, de Kohn et  
 al.), por hidrólisis mediada por el complemento de suero (*p.ej.*, la patente de Estados Unidos N.º 4 671 958, de  
 Rodwell et ál.), y la hidrólisis catalizada por ácido (*p.ej.*, la patente de Estados Unidos N.º 4 569 789, a Blattler et  
 ál.).

15 Puede ser deseable acoplar más de un agente a un anticuerpo. En una realización descrita en este documento, se  
 acoplan múltiples moléculas de un agente a una molécula de anticuerpo. En otra realización descrita en el presente  
 documento, puede acoplarse a un anticuerpo más de un tipo de agente. Independientemente de la forma de  
 20 realización particular, los inmunocombinados con más de un agente se pueden preparar de varias maneras. Por  
 ejemplo, puede acoplarse más de un agente directamente a una molécula de anticuerpo o pueden utilizarse  
 conectores que proporcionen múltiples sitios para la unión.

### **Formulación y administración**

20 Las composiciones de la descripción (*p.ej.*, polipéptidos, polinucleótidos, anticuerpos, etc.) se formulan  
 generalmente en soluciones farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente aceptables para la administración a  
 una célula, tejido o animal, ya sea sola o en combinación con una o más modalidades de terapia. Se entiende  
 igualmente que, si se desea, las composiciones de la descripción pueden administrarse también en combinación con  
 25 otros agentes como, *p.ej.*, otras proteínas o polipéptidos o diversos agentes farmacéuticamente activos. No hay  
 prácticamente ningún límite para que también puedan incluirse otros componentes en las composiciones, siempre  
 que los agentes adicionales no afecten negativamente a los efectos deseados del polipéptido de AspRS de la  
 descripción.

30 En las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento, la formulación de excipientes y soluciones  
 portadoras farmacéuticamente aceptables es bien conocida por los expertos en la técnica, como lo es el desarrollo  
 de regímenes de dosificación y tratamiento adecuados para utilizar las composiciones particulares descritas en el  
 presente documento en diferentes regímenes de tratamiento regímenes, incluidas, *p.ej.*, la administración y  
 35 formulación parenteral, intravenosa, intranasal, intramuscular intracranial y oral.

En determinadas aplicaciones, las composiciones farmacéuticas descritas en este documento 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 en cápsulas de gelatina de envoltura dura o blanda, o en  
 comprimidos, o pueden incorporarse directamente a los alimentos de la dieta.

40 En determinadas circunstancias, será deseable administrar las composiciones farmacéuticas descritas en la  
 presente descripción por vía parenteral, intravenosa, intramuscular o incluso intraperitoneal, como se describe, *p.ej.*,  
 en la patente de Estados Unidos N.º 5 543 158; la patente de Estados Unidos N.º 5 641 515 y la patente de Estados  
 Unidos N.º 5 399 363. Las soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente  
 45 aceptables pueden prepararse en agua mezclada de forma adecuada con un tensioactivo, como la  
 hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de  
 los mismos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un  
 conservante para prevenir el desarrollo de microorganismos.

50 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y  
 polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles (patente de  
 Estados Unidos N.º 5 466 468). En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida de modo que sea  
 fácilmente inyectable. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse de  
 la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o  
 55 medio de dispersión que contenga, *p.ej.*, agua, etanol, poliol (*p.ej.*, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y  
 similares), mezclas adecuadas de los mismos o aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, *p.ej.*,  
 mediante el uso de un recubrimiento, como la 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 por  
 diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, como, *p.ej.*, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal

y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, como, p. ej., azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede favorecer utilizando en las composiciones agentes que retrasan la absorción, como p. ej., monoestearato de aluminio y gelatina.

- 5 Para la administración parenteral en una solución acuosa, p. ej., la solución debe ser adecuadamente regulada si es necesario y primero debe volverse el diluyente líquido isotónico con una solución salina o glucosa suficiente. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, un medio acuoso estéril que puede ser empleado será conocido por los expertos en la técnica a la vista de la presente descripción. Por ejemplo, una dosificación puede disolverse en
- 10 1 ml de solución isotónica de NaCl y añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermocclisis o inyectarse en el sitio de infusión propuesto (véase, p. ej., Remington's Pharmaceutical Sciences, 15ª Edición, pp. 1035-1038 y 1570-1580). Se producirá necesariamente alguna variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto que se esté tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para cada sujeto individual. Por otra parte, para la administración humana, las preparaciones deben cumplir las normas
- 15 generales de esterilidad, de pirogenicidad y de seguridad y pureza requeridas por la Oficina de la FDA de estándares biológicos.

- Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con los diversos ingredientes adicionales anteriormente enumerados, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los
- 20 diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una
- 25 solución estéril previamente filtrada del mismo.

- Las composiciones descritas en el presente documento se pueden formular en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína), que se forman con ácidos inorgánicos como, p. ej., ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos como
- 30 acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, p. ej., hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. Tras la formulación, las soluciones 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 distintas formas de dosificación como
- 35 soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármacos y similares.

- Tal como aquí se utiliza, «vehículo» incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, soluciones reguladoras, soluciones portadoras, suspensiones, coloides y similares. El uso de dichos medios y
- 40 agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar en las composiciones ingredientes activos complementarios.

- 45 La frase «farmacéuticamente aceptable» se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o adversa similar cuando se administran a un ser humano. La preparación de una composición acuosa que contenga una proteína como ingrediente activo es bien conocida en la técnica. Normalmente, tales composiciones se preparan como inyectables, bien como soluciones o suspensiones líquidas; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para su disolución o suspensión en líquido antes de la inyección. La preparación
- 50 también puede emulsionarse.

- En determinadas realizaciones descritas en este documento, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar mediante pulverizaciones intranasales, inhalación u otros vehículos de suministro en aerosol. Se han descrito procedimientos para la liberación de genes, polinucleótidos y composiciones peptídicas directamente a los
- 55 pulmones a través de aerosoles nasales, p. ej., en la patente de Estados Unidos N.º 5 756 353 y en la patente de Estados Unidos N.º 5 804 212. Del mismo modo, la administración de fármacos utilizando resinas de micropartículas intranasales (Takenaga *et ál.*, 1998) y compuestos de lisofosfatidil-glicerol (patente de Estados Unidos N.º 5 725 871) también es bien conocida en las técnicas farmacéuticas. Del mismo modo, la administración transmucosal de fármacos en forma de matriz de soporte de politetrafluoroetileno se describe en la patente de

Estados Unidos N.º 5 780 045.

En determinadas realizaciones descritas en este documento, la administración puede producirse mediante el uso de liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas y similares, para la introducción de las composiciones de la presente descripción en células huésped adecuadas. En particular, las composiciones de la presente descripción se pueden formular para la administración encapsuladas en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera, una nanopartícula o similares. La formulación y uso de dichos vehículos de administración pueden llevarse a cabo empleando técnicas conocidas y convencionales.

#### 10 **Kits que incluyen composiciones de la descripción**

La presente descripción proporciona, en otros aspectos, kits que incluyen uno o más recipientes llenos con uno o más de los polipéptidos, polinucleótidos, anticuerpos, complejos multiunitarios, composiciones de los mismos, etc., del presente documento. Los kits pueden incluir instrucciones por escrito sobre cómo utilizar dichas composiciones (p. ej., para modular la señalización celular, la angiogénesis, el cáncer, las afecciones inflamatorias, etc.).

Los kits descritos en este documento también pueden incluir uno o más agentes terapéuticos adicionales u otros componentes adecuados o deseados para la indicación que se esté tratando. Si se desea, un segundo recipiente puede contar un agente terapéutico adicional. Los ejemplos de agentes terapéuticos adicionales incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los agentes antineoplásicos, agentes antiinflamatorios, agentes antibacterianos, agentes antivirales, agentes angiogénicos, etc.

Los kits descritos en este documento también pueden incluir una o más jeringas u otros componentes necesarios o deseados para facilitar un modo previsto de administración (p. ej., stents, depósitos implantables, etc.).

#### 25 **Métodos de uso**

Las realizaciones de la presente descripción también incluyen procedimientos de uso de las composiciones o «agentes» de AspRS descritos en el presente documento con fines de diagnóstico, detección de fármacos o terapéuticos. El término «agentes» de AspRS hace referencia en general a los polinucleótidos de AspRS, polipéptidos de AspRS, agentes de unión y otros compuestos descritos en el presente documento. Con fines de diagnóstico, los agentes de AspRS se pueden utilizar de múltiples formas no restrictivas, como para distinguir entre diferentes tipos de células o diferentes estados celulares o para identificar sujetos que tengan una enfermedad o afección relevante. Con fines de detección de fármacos, los agentes de AspRS se pueden utilizar para identificar uno o más «parejas de unión» celular de un polipéptido de AspRS, caracterizar una o más actividades «no canónicas» de un polipéptido de AspRS, identificar agentes que tengan un efecto agónico o antagónico selectivo o no selectivo en la interacción de un polipéptido de AspRS con su pareja o parejas de unión, o identificar agentes que tengan un efecto agónico o antagónico selectivo o no selectivo en una o más actividades «no canónicas» de un polipéptido de AspRS. Con fines terapéuticos, los agentes o composiciones de AspRS de este documento pueden utilizarse para tratar múltiples enfermedades o afecciones detalladas más adelante.

#### **A. Diagnóstico**

Como se señaló anteriormente, los agentes de AspRS descritos en este documento pueden utilizarse en pruebas diagnósticas. Estas formas de realización incluyen la detección de la secuencia o secuencias del polinucleótido de AspRS o de la correspondiente secuencia o secuencias del polipéptido o porciones del mismo de uno o más fragmentos de proteínas de AspRS recién identificadas. En determinadas realizaciones descritas en este documento, la presencia o los niveles de una o más secuencias de AspRS recién identificadas se asocian o están correlacionados con uno o más tipos o estados celulares. En consecuencia, como se señaló anteriormente, la presencia o los niveles de una secuencia de AspRS pueden utilizarse para distinguir entre diferentes tipos celulares o diferentes estados celulares. La presencia o los niveles de las secuencias de AspRS pueden detectarse mediante técnicas de diagnóstico basadas en polinucleótidos o en polipéptidos.

Algunos de los procedimientos proporcionados en este documento se basan en la expresión diferencial de una secuencia de AspRS para caracterizar la condición o el estado de una célula, tejido o sujeto y para distinguirlos de otras células, tejidos o sujetos. Los ejemplos no restrictivos incluyen procedimientos para detectar la presencia o los niveles de una secuencia de AspRS en una muestra biológica para distinguir entre células o tejidos de diferentes especies, células de diferentes tejidos u órganos, estados de desarrollo celular como neonatal y adulto, estados de diferenciación celular, situaciones como sano, enfermo y en tratamiento, fracciones intracelulares y extracelulares,

además de cultivos de células primarias y otros cultivos de células, tales como cultivos celulares inmortalizados.

La expresión diferencial hace referencia generalmente a una diferencia estadísticamente significativa en uno o más niveles de expresión génica de una secuencia de polinucleótido o polipéptido de AspRS en comparación con los niveles de expresión de la misma secuencia en un control adecuado. La diferencia estadísticamente significativa puede referirse a un aumento o una disminución en los niveles de expresión, medidos por niveles de ARN, niveles de proteína, función de la proteína o cualquier otra medición relevante de la expresión génica como las descritas en el presente documento.

Un resultado se considera normalmente estadísticamente significativo cuando es improbable que se produzca de forma casual. El nivel de significación de una prueba o resultado tiene que ver tradicionalmente con un concepto de hipótesis estadística basado en la frecuencia. En casos sencillos, la significación estadística se puede definir como la probabilidad de tomar la decisión de rechazar la hipótesis nula cuando la hipótesis nula en realidad es verdadera (una decisión conocida como error de tipo I o «determinación de falsos positivos»). Esta decisión suele adoptarse con el valor p: si el valor p es menor que el nivel significativo, entonces se rechaza la hipótesis nula. Cuanto menor sea el valor p, más significativo será el resultado. También se pueden utilizar factores de Bayes para determinar la significación estadística (véase, p. ej., Goodman S., Ann Intern Med 130:1005-13, 1999).

En casos más complicados, pero en la práctica importantes, el nivel de significación de una prueba o resultado puede reflejar un análisis en el que la probabilidad de tomar la decisión de rechazar la hipótesis nula cuando la hipótesis nula es en realidad verdadera no es más que la probabilidad indicada. Este tipo de análisis permite en aquellas aplicaciones en las que la probabilidad de optar por el rechazo pueda ser mucho menor que el nivel de significación para algunos conjuntos de supuestos abarcados dentro de la hipótesis nula.

En determinadas ejemplos de realizaciones descritos en este documento, la expresión diferencial estadísticamente significativa puede incluir situaciones en las que el nivel de expresión de una secuencia dada de AspRS proporcione al menos aproximadamente 1,2X, 1,3X, 1,4X, 1,5X, 1,6X, 1,7X, 1,8X, 1,9X, 2,0X, 2,2X, 2,4X, 2,6X, 2,8X, 3,0X, 4,0X, 5,0X, 6,0X, 7,0X, 8,0X, 9,0X, 10,0X, 15,0X, 20,0X, 50,0X, 100,0X o una mayor diferencia en la expresión (es decir, la expresión diferencial que puede ser una expresión superior o inferior) en una muestra biológica sospechosa en comparación con un control apropiado, incluyendo todos los números enteros y decimales intermedios (p. ej., 1,24X, 1,25X, 2,1X, 2,5X, 60,0X, 75,0X, etc.). En determinadas realizaciones descritas en este documento, la expresión diferencial estadísticamente significativa puede incluir situaciones en las que el nivel de expresión de una secuencia de AspRS dada proporcione al menos aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 por ciento (%) o mayor diferencia en la expresión (es decir, la expresión diferencial que puede ser superior o inferior) en una muestra biológica sospechosa en comparación con un control apropiado, incluyendo todos los números enteros y decimales intermedios.

Como ejemplo adicional, la expresión diferencial también se puede determinar efectuando el test Z, es decir, calculando una puntuación Z absoluta, como se describe en este documento y se conoce en la técnica (véase el Ejemplo 1). El test Z se utiliza normalmente para identificar diferencias significativas entre una media muestral y un valor esperado. Por ejemplo, en comparación con una tabla normal estándar (p. ej., un tejido de control), en un intervalo de confianza del 95 % (es decir, al nivel de significación del 5 %), una puntuación Z con un valor absoluto mayor que 1,96 indica no aleatoriedad. Para un intervalo de confianza del 99 %, si la Z absoluta es mayor que 2,58, significa que  $p < 0,01$  y la diferencia es aún más significativa: la hipótesis nula puede rechazarse con mayor confianza. En estas y otras realizaciones, una puntuación Z absoluta de 1,96; 2; 2,58; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20 o más, incluyendo todos los decimales intermedios (p. ej., 10,1 10,6; 11.2, etc.), puede proporcionar una medida de significación estadística fuerte. En determinadas realizaciones, una puntuación Z absoluta de más de 6 puede suponer una significación estadística excepcionalmente alta.

La similitud sustancial se refiere en general a la ausencia de una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de expresión entre la muestra biológica y el control de referencia. Entre los ejemplos de niveles de expresión sustancialmente similares pueden incluirse situaciones en las que el nivel de expresión de una determinada SSCI GS proporcione menos de aproximadamente 0,05X, 0,1X, 0,2X, 0,3X, 0,4X, 0,5X, 0,6X, 0,7X, 0,8X, 0,9X, 1,0X, 1,1X, 1,2X, 1,3X o 1,4X de diferencia de expresión (es decir, la expresión diferencial que puede ser la expresión superior o inferior) en una muestra biológica sospechosa en comparación con una muestra de referencia, incluyendo todos los decimales intermedios (p. ej., 0,15X, 0,25X, 0,35X, etc.). En determinadas realizaciones descritas en este documento, la expresión diferencial puede incluir situaciones en las que el nivel de expresión de una secuencia dada de AspRS proporcione menos de aproximadamente 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,

18, 19, 20, 30, 40 o 50 por ciento (%) de diferencia en la expresión (es decir, la expresión diferencial que puede ser superior o inferior) en una muestra biológica sospechosa en comparación con una muestra de referencia, incluyendo todos los decimales intermedios.

5 En determinadas realizaciones descritas en este documento, como cuando se utiliza un microarray de Affymetrix para medir los niveles de expresión de una secuencia de polinucleótido o polipéptido de AspRS, la expresión diferencial también puede determinarse por el valor medio de expresión sintetizado por Affymetrix Microarray Suite 5 (Affymetrix, Santa Clara, CA) u otros programas similares, por lo general con un valor medio de expresión a escala 1000.

10

Las realizaciones de la presente descripción incluyen procedimientos de detección de la presencia o los niveles de una secuencia de polinucleótido o polipéptido de AspRS de referencia o una porción del mismo para distinguir entre células, tejidos u otras muestras biológicas de un organismo o especie diferente, donde la presencia o los niveles de dicha secuencia se asocian con un organismo o especie seleccionada. Los ejemplos generales incluyen

15 procedimientos para distinguir entre los seres humanos y cualquier combinación de bacterias, hongos, plantas y otros animales no humanos. Se incluyen dentro de los animales procedimientos para distinguir entre los seres humanos y cualquier combinación de vertebrados e invertebrados, incluidos vertebrados como peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos no humanos, e invertebrados como insectos, moluscos, crustáceos y corales. Se incluyen dentro de los mamíferos no humanos procedimientos para distinguir entre los seres humanos y cualquier

20 combinación de mamíferos no humanos de los órdenes Afrosoricida, Macroscelidea, Tubulidentata, Hyracoidea, Proboscidea, Sirenia, Cingulata, Pilosa, Scandentia, Dermoptera, Primates, Rodentia, Lagomorpha, Erinaceomorpha, Soricomorpha, Chiroptera, Pholidota, Cetacea, Carnivora, Perissodactyla o Artiodactyla. Se incluyen dentro del orden de los primates los monos, simios, gorilas y chimpancés, entre otros conocidos en la técnica. En consecuencia, la presencia o los niveles de una secuencia o variante de polinucleótido o polipéptido de

25 AspRS de referencia, tal como se describe en el presente documento, se puede utilizar para identificar la fuente de una muestra biológica dada, tal como una célula, tejido u órgano, distinguiendo entre cualquier combinación de estos organismos o distinguiendo entre los seres humanos y uno o más de esos organismos, como un panel de organismos. En determinadas realizaciones, también se puede determinar la fuente de una determinada muestra biológica comparando la presencia o los niveles de una secuencia de AspRS o de una porción de la misma con un

30 valor predeterminado.

Las realizaciones de la presente descripción incluyen procedimientos de detección de la presencia o los niveles de una secuencia de polinucleótido o polipéptido de AspRS de referencia o una porción del mismo para distinguir entre células u otras muestras biológicas de diferentes tejidos u órganos. Entre los ejemplos no restrictivos figuran

35 procedimientos para distinguir entre una célula u otra muestra biológica originada a partir de cualquier combinación de piel (p. ej., dermis, epidermis, capa subcutánea), folículos pilosos, sistema nervioso (p. ej., cerebro, médula espinal, nervios periféricos), órganos del sistema auditivo o de equilibrio (p. ej., oído interno, oído medio, oído externo), sistema respiratorio (p. ej., nariz, tráquea, pulmones), tejidos gastroesofágicos, sistema gastrointestinal (p. ej., boca, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso, recto), sistema vascular (p. ej., corazón, vasos

40 sanguíneos y arterias), hígado, vesícula biliar, sistema linfático e inmunitario (p. ej., ganglios linfáticos, folículos linfoides, bazo, timo, médula ósea), sistema urogenital (p. ej., riñones, uréter, vejiga, uretra, cuello del útero, trompas de Falopio, ovarios, útero, vulva, próstata, glándulas bulbouretrales, epidídimo, próstata, vesículas seminales, testículos), sistema musculoesquelético (p. ej., músculos esqueléticos, músculos lisos, huesos, cartílagos, tendones, ligamentos), tejido adiposo, mamas y sistema endocrino (p. ej., hipotálamo, hipófisis, tiroides,

45 páncreas, glándulas suprarrenales). En consecuencia, partiendo de la asociación de una secuencia de polinucleótido o polipéptido de AspRS de las aquí descritas, se pueden emplear estos procedimientos para identificar o caracterizar el tejido u órgano del que se deriva una célula u otra muestra biológica.

Las realizaciones de la presente descripción incluyen procedimientos de detección de la presencia o los niveles de una secuencia de polinucleótido o polipéptido de AspRS de referencia o una porción del mismo para distinguir entre

50 o caracterizar el estado de desarrollo o diferenciación de la célula. También se incluyen procedimientos para diferenciar entre células germinales, células madre y células somáticas. Entre los ejemplos de estados de desarrollo figuran el neonatal y el adulto. Los ejemplos de estados de diferenciación celular incluyen todas las etapas prudenciales e identificables entre una célula totipotente, una célula pluripotente, una célula madre progenitora

55 multipotente y una célula madura totalmente diferenciada.

Una célula totipotente tiene potencial total, por lo general aparece durante la reproducción sexual y asexual e incluye esporas y cigotos, aunque en algunos casos las células pueden desdiferenciarse y recuperar totipotencia. Una célula pluripotente incluye una célula madre que tiene potencial para diferenciarse dando lugar a cualquiera de las tres

capas germinales: endodermo (interior del estómago, tracto gastrointestinal, pulmones), mesodermo (músculos, huesos, sangre, urogenital), y ectodermo (tejidos epidérmicos y sistema nervioso). Las células progenitoras multipotentes normalmente son capaces de diferenciarse dando lugar a un número limitado de tipos de tejidos. Entre los ejemplos de células multipotentes figuran, sin limitarse a ellas, células madre hematopoyéticas (células madre adultas) de la médula ósea que dan origen a células inmunes como glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas, células madre mesenquimales (células madre adultas) de la médula ósea que dan lugar a las células del estroma, células adiposas y diversos tipos de células óseas, células madre epiteliales (células progenitoras) que dan lugar a los distintos tipos de células de la piel y células satélite musculares (células progenitoras) que contribuyen al tejido muscular diferenciado. En consecuencia, la presencia o los niveles de una secuencia concreta de polinucleótido o polipéptido de AspRS se pueden utilizar para distinguir entre o caracterizar los estados de diferenciación celular anteriormente mencionados, en comparación con un nivel de control o predeterminado.

Las realizaciones de la presente descripción incluyen procedimientos de detección de la presencia o los niveles de una secuencia de polinucleótido o polipéptido de AspRS de referencia para caracterizar o diagnosticar la situación de una célula, tejido, órgano o sujeto, donde dicha situación se puede considerar como sana, enferma, en riesgo de enfermar o en tratamiento. Con tales fines de diagnóstico, los términos «diagnóstico» o «diagnosticado» incluyen la identificación de la presencia o naturaleza de una afección patológica, caracterizando el riesgo de desarrollar dicha afección o midiendo el cambio (o la falta de cambios) de una afección patológica en respuesta a la terapia. Los métodos de diagnóstico pueden diferir en cuanto a su sensibilidad y especificidad. En determinadas realizaciones descritas en este documento, la «sensibilidad» de una prueba diagnóstica se refiere al porcentaje de células, tejidos o sujetos enfermos que dan positivo (porcentaje de «verdaderos positivos»). Las células, tejidos o sujetos enfermos no detectados por la prueba se denominan normalmente «falsos negativos». Las células, tejidos o sujetos no enfermos y que dan negativo en la prueba pueden denominarse «verdaderos negativos». En determinadas realizaciones descritas en este documento, la «especificidad» de una prueba diagnóstica se puede definir como uno (1) menos la tasa de falsos positivos, donde la tasa de «falsos positivos» se define como la proporción de esas muestras o sujetos sin la enfermedad que dan resultado positivo. Aunque un procedimiento de diagnóstico concreto no proporcione un diagnóstico definitivo respecto a una afección, es suficiente si proporciona un indicio positivo que ayude en el diagnóstico.

En determinados casos, se puede diagnosticar la presencia o el riesgo de desarrollar una afección patológica mediante la comparación de la presencia o los niveles de una o más secuencias de polinucleótidos o polipéptidos de AspRS de referencia seleccionadas o porciones de las mismas que se correlacionan con la afección, ya sea por aumento o disminución de los niveles, en comparación con un control deseable. Un «control deseable» o «control adecuado» incluye un valor, nivel, rasgo, característica o propiedad determinada en una célula u otra muestra biológica de un tejido u organismo, p. ej., una célula, tejido u organismo normal o de control que presente, p. ej., rasgos normales como la ausencia de la afección. En determinadas realizaciones descritas en este documento, un «control deseable» o «control adecuado» es un valor, nivel, rasgo, característica o propiedad predefinida. Otros controles adecuados serán evidentes para los expertos en la técnica. En el presente documento se describen ejemplos de enfermedades y afecciones.

Las realizaciones de la presente descripción incluyen técnicas de detección basadas en polinucleótidos de AspRS o ácidos nucleicos, que ofrecen determinadas ventajas debido a la sensibilidad de la detección. Por lo tanto, determinadas realizaciones se refieren a la utilización o detección de polinucleótidos de AspRS como parte de un procedimiento de diagnóstico o ensayo. La presencia o los niveles de polinucleótidos de AspRS se pueden medir mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluidos los ensayos de hibridación tales como Northern blot, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa o cualitativa, la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) cuantitativa o cualitativa, microarray, dot o slot blot, o hibridación *in situ* como la hibridación fluorescente *in situ* (FISH), entre otros. Algunos de estos procedimientos se describen con mayor detalle a continuación.

Los polinucleótidos de AspRS tales como el ADN y el ARN pueden ser recogidos o generados a partir de sangre, fluidos biológicos, tejidos, órganos, líneas celulares u otras muestras relevantes utilizando técnicas conocidas en la técnica, como las descritas en Kingston. (2002 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., NY, (véase, p. ej., como se describe por Nelson et al. Proc Natl Acad Sci EE.UU., 99: 11890-11895, 2002) y otros.

Se pueden generar genotecas de ADN complementario (ADNc) con técnicas conocidas en la materia como las descritas en Ausubel *et al.* (2001 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., NY, NY); Sambrook *et al.* (1989 Molecular Cloning, Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory,

Plainview, NY); Maniatis *et ál* (1982 Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY) y otros.

Determinadas realizaciones descritas en este documento pueden emplear procedimientos de hibridación para detectar secuencias de polinucleótidos de AspRS. Los procedimientos para la realización de ensayos de hibridación de polinucleótidos están muy desarrollados. Los procedimientos y las condiciones de los ensayos de hibridación pueden variar dependiendo de la aplicación y se seleccionan según los procedimientos generales de unión conocidos, incluidos los mencionados en: Maniatis *et ál*. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Ed. Cold Spring Harbor, N.Y., 1989); Berger and Kimmel Methods in Enzymology, Vol. 152, Guide to Molecular Cloning Techniques (Academic Press, Inc., San Diego, Calif., 1987); Young and Davism, P.N.A.S, 80: 1194 (1983). Los métodos y aparatos para llevar a cabo reacciones de hibridación repetidas y controladas se han descrito en las patentes de Estados Unidos Números 5 871 928, 5 874 219, 6 045 996 y 6 386 749, 6 391 623.

En determinadas realizaciones descritas en este documento, se pueden emplear procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos para la detección de secuencias de polinucleótidos de AspRS. El término «amplificación» o «amplificación de ácido nucleico» hace referencia a la producción de múltiples copias de un ácido nucleico diana que contenga al menos una porción de la secuencia de ácido nucleico diana específica prevista. Las copias múltiples pueden denominarse amplicones o productos de amplificación. En determinadas realizaciones, la diana amplificada contiene menos que la secuencia completa del gen diana (intrones y exones) o que una secuencia expresada del gen diana (transcripción del splicing de exones y secuencias flanqueantes sin traducir). Por ejemplo, se puede producir unos amplicones específicos mediante la amplificación de una porción del polinucleótido diana utilizando cebadores de amplificación que hibridan con —e inician la polimerización desde— posiciones internas del polinucleótido diana. Preferiblemente, la porción amplificada contiene una secuencia diana detectable que se puede detectar usando cualquiera de los distintos procedimientos conocidos.

La «amplificación selectiva» o «amplificación específica», tal como se utiliza en el presente documento, hace referencia a la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana conforme a la presente descripción donde la amplificación detectable de la secuencia diana se limita sustancialmente a la amplificación de la secuencia diana aportada por una muestra de ácido nucleico de interés que se esté testando y no aportada por la secuencia de ácido nucleico diana aportada por alguna otra fuente de la muestra, como, p. ej., la contaminación presente en los reactivos utilizados durante las reacciones de amplificación o en el entorno en el que se llevan a cabo las reacciones de amplificación.

«Condiciones de amplificación» son aquellas que permiten la amplificación de ácido nucleico conforme a la presente descripción. Las condiciones de amplificación pueden ser, en algunas realizaciones, menos estrictas que las «condiciones de hibridación astringentes» descritas en el presente documento. Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de amplificación de la presente descripción hibridan con sus dianas previstas en condiciones de amplificación pero pueden hibridarse o no en condiciones de hibridación astringentes. Por otro lado, las sondas de detección de la presente descripción suelen hibridar en condiciones de hibridación astringentes. Las condiciones aceptables para llevar a cabo amplificaciones de ácidos nucleicos conforme a la presente descripción pueden ser fácilmente comprobadas por un experto en la materia dependiendo del procedimiento de amplificación concreto empleado.

Muchos procedimientos conocidos de amplificación de ácidos nucleicos requieren termociclado para desnaturalizar alternativamente los ácidos nucleicos bicatenarios e hibridar cebadores; sin embargo, otros procedimientos conocidos de amplificación de ácido nucleico son isotérmicos. La reacción en cadena de la polimerasa (patentes de EE.UU. Números 4 683 195; 4 683 202; 4 800 159; 4 965 188), comúnmente conocida como PCR, utiliza múltiples ciclos de desnaturalización, hibridación de pares de cebadores a las cadenas opuestas y extensión del cebador para aumentar exponencialmente el número de copias de la secuencia diana. En una variación denominada RT-PCR, se utiliza la transcriptasa inversa (RT) para hacer un ADN complementario (ADNc) a partir del ARNm y el ADNc se amplifica por PCR para producir múltiples copias de ADN.

Como se señaló anteriormente, el término «PCR» se refiere a múltiples ciclos de amplificación que amplifican selectivamente una especie de ácido nucleico diana. Se incluyen la PCR cuantitativa (qPCR, PCR en tiempo real), la PCR de transcripción inversa (RT-PCR) y la transcripción inversa de PCR cuantitativa (qRT-PCR), que han sido bien descritas. El término «pPCR» se refiere a la reacción en cadena de polimerasa cuantitativa y el término «qRT-PCR» se refiere a la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa. Se pueden utilizar qPCR y qRT-PCR para amplificar y cuantificar simultáneamente una molécula de ADNc diana. Esto permite tanto la detección como la cuantificación de una secuencia específica en un grupo de ADNc, como un gen o transcrito de AspRS seleccionado.

El término «PCR en tiempo real» puede utilizar colorante de unión a ADN para unir a todos los ADN bicatenarios (bc) de la PCR, causando la fluorescencia del colorante. Un aumento del producto de ADN durante la PCR, por tanto, conduce a un incremento de la intensidad de la fluorescencia y se mide en cada ciclo, permitiendo así que se puedan cuantificar las concentraciones de ADN. Sin embargo, los colorantes de dsADN tales como SYBR Green se unirán a todos los productos de PCR de dsADN. La fluorescencia se detecta y se mide en el termociclador PCR en tiempo real y su incremento geométrico, correspondiente al aumento exponencial del producto, sirve para determinar el ciclo umbral («CT») en cada reacción.

10 El término «valor Ct» hace referencia al número de ciclo umbral, que es el ciclo en el que la amplificación por PCR supera un nivel umbral. Si hay una mayor cantidad de ARNm para un gen particular en una muestra, rebasará el umbral antes que un gen de menor expresión, ya que hay más ARN de partida que amplificar. Por lo tanto, una valor Ct bajo indica una alta expresión génica en una muestra y un valor Ct alto es indicativo de una baja expresión génica.

15

Determinadas realizaciones descritas en este documento pueden emplear la reacción en cadena de la ligasa (Weiss, R. 1991, *Science* 254: 1292), comúnmente conocida como LCR, que utiliza dos conjuntos de oligonucleótidos de ADN complementarios que hibridan con regiones adyacentes del ácido nucleico diana. Los oligonucleótidos de ADN están unidos covalentemente por una ligasa de ADN en ciclos repetidos de desnaturalización térmica, hibridación y

20 ligación para producir un producto oligonucleótido ligado bicatenario detectable.

En determinadas realizaciones descritas en este documento, se pueden utilizar otras técnicas para evaluar las transcripciones de ARN de los transcritos a partir de una genoteca de ADNc en particular, incluyendo el análisis de microarrays (Han, M., *et ál.*, *Nat Biotechnol*, 19: 631-635, 2001; Bao, P., *et ál.*, *Anal Chem*, 74: 1792-1797, 2002; Schena *et ál.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 93:10614-19, 1996; y Heller *et ál.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 94:2150-55, 1997) y SAGE (análisis serial de expresión génica). Como MPSS, SAGE es digital y puede generar un gran número de secuencias de firma. (Véase, p. ej., Velculescu, V. E., *et ál.*, *Trends Genet*, 16: 423-425., 2000; Tuteja R. y Tuteja N. *Bioessays*. Ago 2004; 26(8):916-22), aunque hay órdenes de menor magnitud disponibles con técnicas como MPSS.

30

En determinadas realizaciones descritas en este documento, el término «microarray» incluye un «microarray de ácido nucleico» con múltiples ácidos nucleicos vinculados al sustrato, siendo detectable por separado la hibridación a cada uno de los múltiples ácidos nucleicos unidos. El sustrato puede ser sólido o poroso, plano o no plano, unitario o distribuido. Los microarrays de ácidos nucleicos incluyen todos los dispositivos contemplados en Schena (ed.),

35 DNA Microarrays: A Practical Approach (Practical Approach Series), Oxford University Press (1999); *Nature Genet.* 21(1) (suppl.): 1-60 (1999); Schena (ed.), *Microarray Biochip: Tools and Technology*, Eaton Publishing Company/BioTechniques Books Division (2000). Los microarrays de ácido nucleico pueden incluir una pluralidad de ácidos nucleicos unida al sustrato donde dicha pluralidad de ácidos nucleicos se dispone en una pluralidad de perlas, en lugar de en un sustrato plano unitario, como se describe, p. ej., en Brenner *et ál.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

40 EE.UU. 97(4): 1665-1670 (2000). Ejemplos de microarrays de ácidos nucleicos pueden encontrarse en las patentes de Estados Unidos números 6 391 623, 6,383,754, 6 383 749, 6 380 377, 6 379 897, 6 376 191,6 372 431, 6 351 712 6,344 316, 6 316 193, 6 312 906, 6 309 828,6 309 824, 6 306 643, 6 300 063, 6 287 850, 6 284 497, 6 284 465,6 280 954, 6 262 216, 6 251 601, 6 245 518, 6 263 287, 6 251 601,6 238 866, 6 228 575, 6 214 587, 6 203 989, 6 171 797, 6 103 474,6 083 726, 6 054 274, 6 040 138, 6 083 726, 6 004 755, 6 001 309,5 958 342,

45 5 952 180, 5 936 731, 5 843 655, 5 814 454, 5 837 196,5 436 327, 5 412 087, y 5 405 783.

Los ejemplos adicionales incluyen arrays de ácidos nucleicos disponibles comercialmente de Affymetrix (Santa Clara, California) con la marca GeneChip™. Otros ejemplos de procedimientos de fabricación y uso de arrays figuran, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos números 7 028 629;7 011 949; 7 011 945; 6 936 419;

50 6 927 032; 6 924 103; 6 921 642; y 6 818 394.

La presente descripción, en relación con los arrays y microarrays, también contempla muchos usos para los polímeros unidos a sustratos sólidos. Estos usos incluyen el seguimiento, perfilado, control de la genoteca, genotipado y diagnóstico de la expresión génica. Los métodos de seguimiento y perfilado de la expresión génica y

55 los métodos útiles para el seguimiento y perfilado de la expresión génica se recogen en las patentes de Estados Unidos números 5 800 992, 6 013 449,6 020 135, 6 033 860, 6 040 138, 6 177 248 y 6 309 822. El genotipado y sus usos figuran en las U.S. Ser. números 10/442 021, 10/013 598(U.S. Application N.º 2003/0036069), y en las patentes de Estados Unidos números 5 925 525,6 268 141, 5 856 092, 6 267 152, 6 300 063, 6 525 185, 6 632 611,5 858 659, 6 284 460, 6 361 947, 6 368 799, 6 673 579 y 6 333 179. Otros procedimientos de

amplificación, etiquetado y análisis de ácido nucleico que se pueden utilizar en combinación con los procedimientos descritos en esta memoria están incorporados en las patentes de Estados Unidos números 5 871 928, 5 902 723, 6 045 996, 5 541 061 y 6 197 506.

- 5 Como resultará evidente para los expertos en la técnica, en determinadas realizaciones descritas en este documento se pueden emplear oligonucleótidos, como cebadores o sondas, para la amplificación o detección descritas en el presente documento. Si bien el diseño y la secuencia de los oligonucleótidos dependen de su función, como se describe en el presente documento, se suelen tener en cuenta distintas variables. Entre las principales están: la longitud, la temperatura de fusión ( $T_m$ ), la especificidad, la complementariedad con otros oligonucleótidos del sistema, el contenido de G/C, los tramos de polipirimidina (T, C) o polipurina (A, G) y la secuencia del extremo 3'.

Determinadas realizaciones descritas en este documento, por tanto, incluyen procedimientos para detectar un polinucleótido de AspRS diana en una muestra, donde normalmente el polinucleótido incluye la secuencia de un polinucleótido de AspRS de referencia descrito en la presente memoria, que incluye a) hibridar la muestra con una sonda que incluya una secuencia complementaria al polinucleótido diana de la muestra y que dicha sonda hibride específicamente con dicho polinucleótido diana, en condiciones en las que se forma un complejo de hibridación entre dicha sonda y dichos fragmentos de polinucleótido objetivo, y b) detectar la presencia o ausencia de dicho complejo de hibridación, y opcionalmente, si está presente, la cantidad del mismo. También se incluyen procedimientos para detectar un polinucleótido de AspRS diana en una muestra, que incluya la secuencia de un polinucleótido de AspRS de referencia, tal como se describe en el presente documento, que incluya a) amplificar el polinucleótido diana o fragmento del mismo, y b) detectar la presencia o ausencia de dicho polinucleótido diana objetivo o fragmento del mismo amplificado, y, opcionalmente, si está presente, la cantidad del mismo.

Las realizaciones de la presente descripción incluyen una serie de técnicas de detección basadas en polipéptidos de AspRS, que incluyen técnicas de detección basadas en anticuerpos. Se incluye en estas realizaciones el uso de polipéptidos de AspRS para generar anticuerpos u otros agentes de unión, que pueden ser utilizados entonces en procedimientos de diagnóstico y composiciones para detectar o cuantificar polipéptidos de AspRS seleccionados en una célula u otra muestra biológica, por lo general de un sujeto.

Determinadas realizaciones descritas en este documento pueden emplear metodologías convencionales, como Western blot o electrotransferencia e inmunoprecipitación, ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), citometría de flujo y ensayos de inmunofluorescencia (IFA). Estos conocidos procedimientos utilizan normalmente uno o más anticuerpos monoclonales o policlonales, tal como se describe en el presente documento, que se unen específicamente a un polipéptido de AspRS seleccionado descrito en este documento, o una región única de ese polipéptido de AspRS, y generalmente no se unen de manera significativa a otros polipéptidos de AspRS, tales como un polipéptido de AspRS de longitud completa. En determinadas realizaciones descritas en este documento, la región única del polipéptido de AspRS puede ser codificada por un zona única de unión o una estructura tridimensional particular de una variante de splicing alternativa recién identificada o fragmento de proteína, como un fragmento proteolítico.

En determinadas realizaciones descritas en este documento, se pueden emplear «arrays» tales como «microarrays». En determinadas realizaciones descritas en este documento, un «microarray» también puede hacer referencia a un «microarray de péptido» o «microarray de proteínas» que tenga una colección de sustratos unidos o una serie de polipéptidos, siendo detectable por separado la unión a cada uno de los distintos polipéptidos unidos.

Alternativamente, el microarray de péptido puede tener múltiples agentes de unión, que incluyen, sin limitarse a ellos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, agentes de unión bacteriófagos, agentes de unión de dos híbridos de levadura y aptámeros, que pueden detectar específicamente la unión de los polipéptidos de AspRS descritos en este documento. El array puede basarse en la detección de autoanticuerpos de dichos polipéptidos de AspRS, como se describe, p. ej., en Robinson *et al.*, Nature Medicine 8(3):295-301 (2002). Se pueden encontrar ejemplos de arrays de péptidos en WO 02/31463, WO 02/25288, WO 01/94946, WO 01/88162, WO 01/68671, WO 01/57259, WO 00/61806, WO 00/54046, WO 00/47774, WO 99/40434, WO 99/39210, y WO 97/42507 y en las patentes de Estados Unidos números 6 268 210, 5 766 960, y 5 143 854.

En determinadas realizaciones descritas en este documento, se pueden emplear MS u otros procedimientos basados en el peso molecular para la detección diagnóstica de secuencias de polipéptidos de AspRS. Espectrometría de masas (MS) hace referencia generalmente a una técnica analítica para determinar la composición elemental de una muestra o molécula. La MS también puede emplearse para determinar las estructuras químicas de moléculas como péptidos y otros compuestos químicos.

- En general, el principio de la MS consiste en ionizar compuestos químicos para generar moléculas cargadas o fragmentos de moléculas y a continuación medir proporciones de masa y carga. Un procedimiento de ejemplo de MS consiste en: se carga una muestra en el instrumento de MS y se somete a vaporización, los componentes de la muestra se ionizan mediante uno de los múltiples procedimientos posibles (p. ej., impacto con un haz de electrones), de lo que resulta la formación de partículas con carga positiva, los iones positivos son entonces acelerados por un campo magnético, se calculan los cocientes de masa y carga ( $m/z$ ) de las partículas basándose en los datos del movimiento de los iones a su paso por los campos electromagnéticos y se detectan los iones, que en el paso anterior fueron ordenados según el cociente  $m/z$ .
- 10 Un ejemplo de instrumentos de MS tiene tres módulos: una fuente de iones, que convierte las moléculas de muestra de la fase gaseosa en iones (o, en caso de ionización por electroespray, traslada los iones existentes en solución a la fase gaseosa); un analizador de masas, que ordena los iones por sus masas mediante la aplicación de campos electromagnéticos; y un detector, que mide el valor de un indicador de cantidad y proporciona datos para calcular de las abundancias de cada ion presente.
- 15 La técnica de MS tiene usos tanto cualitativos como cuantitativos, que incluyen la identificación de compuestos desconocidos, la determinación de la composición isotópica de los elementos de una molécula y la determinación de la estructura de un compuesto mediante la observación de su fragmentación. Otros usos incluyen la cuantificación de la cantidad de un compuesto en una muestra o el estudio de los fundamentos de la química de iones en fase gaseosa (la química de iones y neutrales en vacío). En consecuencia, se pueden utilizar técnicas de MS conforme a cualquiera de los procedimientos proporcionados en este documento para medir la presencia o los niveles de un polipéptido de AspRS descrito en este documento en una muestra biológica, y comparar esos niveles con una muestra de control o un valor predeterminado.

## 25 **B. Descubrimiento de compuestos y agentes terapéuticos**

- Determinadas realizaciones descritas en este documento se refieren a la utilización de secuencias de polipéptidos de AspRS o polinucleótidos de AspRS de referencia para el descubrimiento de fármacos, normalmente para identificar agentes que modulen una o más de las actividades no canónicas de la AspRS de referencia. Por ejemplo, determinadas formas de realización descritas en este documento incluyen procedimientos de identificación de una o más «parejas de unión» de un polipéptido de AspRS de referencia o un polipéptido que incluya una secuencia de la AspRS de referencia, como una proteína celular u otra molécula huésped que se asocie con el polipéptido de AspRS y participe en su actividad o actividades no canónicas. También se incluyen procedimientos de identificación de un compuesto (p. ej., un polipéptido) u otro agente que actúe como agonista o antagonista de la actividad no canónica de un polipéptido de AspRS de referencia o variante activa del mismo, por ejemplo mediante la interacción con el polipéptido de AspRS o con una o varias de sus parejas de unión celular.

- Determinadas realizaciones descritas en este documento, por tanto, incluyen procedimientos de identificación de una pareja de unión de un polipéptido de AspRS de referencia, que incluyen a) combinar el polipéptido de AspRS con una muestra biológica en condiciones adecuadas, y b) detectar la unión específica del polipéptido de AspRS con una pareja de unión, identificando así una pareja de unión que se une específicamente al polipéptido de AspRS de referencia. También se incluyen procedimientos de detección de compuestos que se unan específicamente a un polipéptido de AspRS de referencia o una pareja de unión del polipéptido de AspRS, que incluye a) combinar el polipéptido o la pareja de unión con al menos un compuesto de ensayo en condiciones adecuadas, y b) detectar la unión del polipéptido o la pareja de unión al compuesto de ensayo, identificando así un compuesto que se une específicamente al polipéptido o a su pareja de unión. En determinadas realizaciones descritas en este documento, el compuesto es un polipéptido o péptido. En determinadas realizaciones descritas en este documento, el compuesto es una molécula pequeña u otro compuesto químico (p. ej., no biológico). En determinadas realizaciones descritas en este documento, el compuesto es un péptido mimético.

- Se puede emplear cualquier procedimiento adecuado para detectar interacciones proteína-proteína para la identificación de proteínas celulares que interactúen con un polipéptido de AspRS de referencia, interactúen con una o varias de sus parejas de unión celular, o ambas cosas. Los ejemplos de procedimientos tradicionales que se pueden emplear incluyen coinmunoprecipitación, entrecruzamiento y copurificación a través de columnas de gradientes o cromatográficas de células lisadas o proteínas obtenidas de células lisadas, principalmente para identificar en el producto lisado proteínas que interactúen con el polipéptido de AspRS.

En estas y otras realizaciones descritas en el presente documento, al menos una porción de la secuencia de aminoácidos de una proteína que interactúa con un polipéptido de AspRS o su pareja de unión puede determinarse

utilizando técnicas conocidas por los expertos, como la técnica de degradación de Edman. Véase, p. ej., Creighton Proteins: Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman & Co., N.Y., pp. 34-49, 1983. La secuencia de aminoácidos obtenida se puede utilizar como guía para la generación de mezclas de oligonucleótidos que pueden utilizarse para la detección de secuencias génicas que codifican tales proteínas. La detección se puede llevar a cabo, p. ej., mediante técnicas de hibridación convencionales o de PCR descritas en este documento y conocidas en la técnica. Las técnicas para la generación de mezclas de oligonucleótidos y la detección son bien conocidas. Véase, p. ej., Ausubel *et ál.* Current Protocols in Molecular Biology Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989; y Innis *et ál.*, eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications Academic Press, Inc., New York, 1990.

10

Además, se pueden emplear los procedimientos en la identificación simultánea de genes que codifican la pareja de unión u otro polipéptido. Estos procedimientos incluyen, p. ej., el sondeo con genotecas de expresión, de una manera similar a la conocida técnica de sondeo de anticuerpos de genotecas lambda-gt11, utilizando una proteína marcada de AspRS, u otro polipéptido, péptido o proteína de fusión, p. ej., un polipéptido de AspRS variante o un dominio de AspRS fusionado a un marcador (p. ej., una enzima, flúor, proteína luminiscente o colorante) o un dominio Fc de Ig.

Un procedimiento que detecta interacciones de proteínas *in vivo* es el sistema de dos híbridos. Se ha descrito un ejemplo de este sistema (Chien *et ál.*, PNAS USA 88:9578-9582, 1991) y está disponible comercialmente en Clontech (Palo Alto, California). En ciertos casos, se puede utilizar el sistema de dos híbridos u otra metodología similar para examinar bibliotecas de dominio de activación en busca de proteínas que interactúen con el producto génico «cebo». A modo de ejemplo, pero no restrictivo, se puede utilizar un polipéptido de AspRS de referencia o variante como producto génico cebo. También se puede utilizar una pareja de unión de AspRS como producto génico «cebo». Las secuencias genómicas o de ADNc totales se fusionan al ADN que codifica un dominio de activación. Esta biblioteca y un plásmido que codifica un híbrido de un producto génico de AspRS cebo fusionado con el dominio de unión a ADN se transforman simultáneamente en una cepa informadora de levadura y se examinan los transformados resultantes para determinar aquellos que expresan el gen reportero.

También se describen sistemas de tres híbridos, que permiten detectar interacciones de proteína-ARN en la levadura. Véase, p. ej., Hook *et ál.*, RNA. 11:227-233, 2005. En consecuencia, se pueden utilizar estos y otros procedimientos para identificar una pareja de unión celular de un polipéptido de AspRS. También se pueden utilizar estos y otros procedimientos para identificar otros compuestos como agentes de unión o ácidos nucleicos que interactúan con el polipéptido de AspRS, su pareja de unión celular, o ambos.

Como se señaló anteriormente, las parejas de unión, una vez aisladas, pueden ser identificadas y ser utilizadas, a su vez, conjugadas con técnicas convencionales para identificar proteínas u otros compuestos con los que interactúan. En consecuencia, determinadas realizaciones descritas en este documento hacen referencia a procedimientos de detección de un compuesto que se une específicamente a la pareja de unión de un polipéptido de AspRS de referencia, que incluye a) la combinación de la pareja de unión con al menos un compuesto de ensayo en condiciones adecuadas, y b) la detección de la unión de la pareja de unión al compuesto de ensayo, identificando de este modo un compuesto que se une específicamente a la pareja de unión. En determinadas realizaciones descritas en este documento, el compuesto de ensayo es un polipéptido. En determinadas realizaciones descritas en este documento, el compuesto de ensayo es un compuesto químico, como una pequeña molécula o un compuesto péptido mimético.

45

Determinadas realizaciones descritas en este documento incluyen procedimientos de detección de un compuesto que module la actividad de un polipéptido de AspRS de referencia, que incluye a) combinar el polipéptido con al menos un compuesto de prueba en condiciones permisivas para la actividad del polipéptido, b) evaluar la actividad del polipéptido en presencia del compuesto de ensayo, y c) comparar la actividad del polipéptido en presencia del compuesto de ensayo con la actividad del polipéptido en ausencia del compuesto de ensayo, donde un cambio en la actividad del polipéptido en presencia del compuesto de ensayo es indicativo de un compuesto que modula la actividad del polipéptido.

Determinadas realizaciones descritas en este documento incluyen procedimientos de detección de un compuesto que modula la actividad de una pareja de unión de un polipéptido de AspRS de referencia, que incluye a) combinar el polipéptido con al menos un compuesto de prueba en condiciones permisivas para la actividad de la pareja de unión, b) evaluar la actividad de la pareja de unión en presencia del compuesto de ensayo, y c) comparar la actividad de la pareja de unión en presencia del compuesto de ensayo con la actividad de la pareja de unión en ausencia del compuesto de ensayo, donde un cambio en la actividad de la pareja de unión en presencia del compuesto de ensayo

es indicativo de un compuesto que modula la actividad de la pareja de unión. Normalmente, estas y otras realizaciones relacionadas incluyen la evaluación de una actividad no canónica seleccionada que está asociada con el polipéptido de AspRS o su pareja de unión. Se incluyen condiciones *in vitro* e *in vivo* como las condiciones de cultivo celular.

5

Determinadas realizaciones descritas en este documento incluyen procedimientos de detección de un compuesto para determinar la eficacia como agonista total o parcial de un polipéptido de AspRS de referencia o fragmento activo o variante del mismo, que incluye a) exponer una muestra que incluye el polipéptido a un compuesto, y b) detectar la actividad agonista en la muestra, normalmente mediante la medición de un aumento en la actividad no canónica del polipéptido de AspRS. Determinados procedimientos descritos en este documento incluyen a) exponer una muestra que incluye una pareja de unión del polipéptido de AspRS a un compuesto, y b) detectar la actividad agonista en la muestra, normalmente mediante la medición de un aumento en la actividad no canónica seleccionada del polipéptido de AspRS. Determinadas realizaciones descritas en este documento incluyen composiciones que incluyen un compuesto agonista identificado por el procedimiento y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

También se describen procedimientos de detección de un compuesto para determinar la eficacia como antagonista total o parcial de un polipéptido de AspRS de referencia, que incluye a) exponer una muestra que incluye el polipéptido a un compuesto, y b) detectar la actividad antagonista en la muestra, normalmente mediante la medición de una disminución en la actividad no canónica del polipéptido de AspRS. Determinados procedimientos descritos en este documento incluyen a) exponer una muestra que incluye una pareja de unión del polipéptido de AspRS a un compuesto, y b) detectar la actividad antagonista en la muestra, normalmente mediante la medición de una disminución en la actividad no canónica seleccionada del polipéptido de AspRS. Determinadas realizaciones descritas en este documento incluyen composiciones que incluyen un compuesto antagonista identificado por el procedimiento y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En determinadas realizaciones descritas en este documento, se pueden diseñar sistemas *in vitro* para identificar compuestos capaces de interactuar con o modular una secuencia de referencia de AspRS o su pareja de unión. Algunos de los compuestos identificados por tales sistemas pueden ser útiles, p. ej., en la modulación de la actividad de la ruta o en la elaboración de componentes de la propia ruta. También se pueden usar en detecciones para identificar compuestos que interrumpen las interacciones entre los componentes de la ruta; o pueden interrumpir tales interacciones directamente. Un ejemplo de enfoque implica la preparación de una mezcla de reacción del polipéptido de AspRS y un compuesto de ensayo en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que los dos interactúen y se unan, formando así un complejo que se puede eliminar o detectar en la mezcla de reacción

35

Se pueden llevar a cabo ensayos de detección *in vitro* de múltiples maneras. Por ejemplo, un polipéptido de AspRS, una pareja de unión celular o uno o varios compuestos de prueba se pueden anclar en una fase sólida. En estas y otras realizaciones descritas en el presente documento, se pueden detectar y captar los complejos resultantes en la fase sólida al final de la reacción. En un ejemplo de ese procedimiento, el polipéptido de AspRS o su pareja de unión están anclados en una superficie sólida y el o los compuestos de prueba, que no están anclados, se pueden marcar, directamente o indirectamente, de modo que se pueda detectar su captura por el componente en la superficie sólida. En otros ejemplos, el o los compuestos de prueba están anclados a la superficie sólida y el polipéptido de AspRS o su pareja de unión, que no están anclados, se marcan o se vuelven detectables de algún modo. En determinadas realizaciones descritas en este documento, se pueden utilizar convenientemente placas de microtitulación como fase sólida. El componente anclado (o compuesto de ensayo) se puede inmovilizar mediante anclajes no covalentes o covalentes. El anclaje no covalente puede llevarse a cabo simplemente recubriendo la superficie sólida con una solución de la proteína y secando. Alternativamente, se puede utilizar un anticuerpo inmovilizado, preferiblemente un anticuerpo monoclonal, específico para la proteína que se va a inmovilizar para anclar la proteína a la superficie sólida. Las superficies pueden prepararse con antelación y almacenarse.

50

Para llevar a cabo un ensayo a modo de ejemplo, el componente no inmovilizado se añade normalmente a la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Una vez completada la reacción, se eliminan los componentes que no han reaccionado (p. ej., mediante lavado) en condiciones tales que cualquier complejo específico que se haya formado permanezca inmovilizado sobre la superficie sólida. La detección de complejos anclados en la superficie sólida puede llevarse a cabo en muchas formas distintas. Por ejemplo, cuando el componente previamente no inmovilizado está premarcado, la detección del marcador inmovilizado en la superficie indica que se han formado complejos. Cuando el componente previamente no inmovilizado no está marcado, se puede utilizar un marcador indirecto para detectar los complejos anclados en la superficie; p. ej., utilizando un anticuerpo marcado específico para el componente previamente no inmovilizado (el anticuerpo, a su vez, puede

55

estar marcado directa o indirectamente con un anticuerpo anti-Ig marcado).

Alternativamente, se puede determinar la presencia o ausencia de unión de un compuesto de ensayo, p. ej., utilizando la resonancia de plasmón superficial (SPR) y el cambio en el ángulo de resonancia como índice, donde un polipéptido de AspRS o una pareja de unión celular se inmoviliza sobre la superficie de un chip sensor comercializado (p. ej., fabricado por Biacore™) de acuerdo con un procedimiento convencional, el compuesto de ensayo se pone en contacto con el mismo, y el chip sensor se ilumina con una luz de una determinada longitud de onda desde un ángulo concreto. La unión de un compuesto de ensayo también se puede medir mediante la detección de la aparición de un pico correspondiente al compuesto de ensayo por un procedimiento en el que un polipéptido de AspRS o una pareja de unión celular se inmoviliza sobre la superficie de un chip de proteína adaptable a un espectrómetro de masas, un compuesto de ensayo se pone en contacto con el mismo y un procedimiento de ionización como MALDI-MS, ESI-MS, FAB-MS o similar se combina con un espectrómetro de masas (p. ej., espectrómetro de masas de doble enfoque, espectrómetro de masas cuadrupolo, espectrómetro de masas de tiempo de vuelo, espectrómetro de masas de transformada de Fourier, espectrómetro de masas de ciclotrón de ion o similares).

En determinadas realizaciones descritas en este documento, se pueden utilizar ensayos basados en células, ensayos basados en vesículas de membrana o ensayos basados en fracciones de membrana para identificar compuestos que modulan las interacciones en la ruta no canónica del polipéptido de AspRS seleccionado. Con este fin, se pueden utilizar líneas celulares que expresen un polipéptido de AspRS o una pareja de unión, o una proteína de fusión que contenga un dominio o fragmento de dichas proteínas (o una combinación de los mismos), o líneas celulares (p. ej., células COS, células CHO, células HEK293, células Hela etc.) que hayan sido genéticamente modificadas para expresar dicha proteína o proteínas o proteína o proteínas de fusión. Los compuestos de ensayo que influyen en la actividad no canónica se pueden identificar controlando el cambio (p. ej., un cambio estadísticamente significativo) en esa actividad en comparación con una cantidad de control o predeterminada.

Para las realizaciones descritas en este documento que se refieren a agentes antisentido y ARNi, p. ej., también se incluyen procedimientos de selección de un compuesto para determinar la eficacia al alterar la expresión de un polinucleótido de referencia de AspRS, que incluye a) exponer una muestra que incluye el polinucleótido de referencia de AspRS a un compuesto como un oligonucleótido antisentido potencial, y b) detectar la expresión alterada del polinucleótido de AspRS. En ciertos ejemplos no restrictivos, se pueden emplear estas y otras realizaciones en ensayos basados en células o en ensayos de traducción libres de células, de acuerdo con los métodos rutinarios de la técnica. También se incluyen los antisentido y agentes de ARNi identificados por tales procedimientos.

Asimismo se incluye cualquiera de los procedimientos anteriores u otros procedimientos de detección conocidos en la técnica que se adapten a la detección de alto rendimiento (HTS). La HTS utiliza normalmente la automatización para ejecutar una detección de un ensayo frente a una biblioteca de compuestos candidatos, p. ej., un ensayo que mida el aumento o disminución de una actividad no canónica, como se describe en el presente documento.

### **C. Métodos de tratamiento**

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a procedimientos de uso de las composiciones de la presente descripción para el tratamiento de una célula, tejido o sujeto con la composición descrita en el presente documento. Las células o tejidos que se pueden modular son preferiblemente células de mamíferos o, más preferiblemente, células humanas. Tales células pueden proceder de un sujeto sano o enfermo.

En consecuencia, los agentes de AspRS aquí descritos, incluidos polipéptidos de AspRS, polinucleótidos de AspRS, vectores basados en polinucleótidos de AspRS, oligonucleótidos antisentido, agentes ARNi, así como agentes de unión tales como péptidos, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno, péptidos miméticos y otras moléculas pequeñas, se pueden utilizar para tratar múltiples enfermedades o afecciones asociadas a las actividades no canónicas de una AspRS de referencia. Son ejemplos de dichas actividades no canónicas la modulación de la proliferación celular, la modulación de la migración celular, la modulación de la diferenciación celular (p. ej., hematopoyesis), la modulación de la apoptosis u otras formas de muerte celular, la modulación de la señalización celular, la modulación de la angiogénesis, la modulación de la unión celular, la modulación del metabolismo celular, la modulación de la producción o actividad de citoquinas, la modulación de la actividad de receptores de citoquinas, la modulación de la inflamación y similares.

Se incluyen terapias basadas en polinucleótidos, como terapias antisentido y terapias de interferencia de ARNi, que

normalmente se relacionan con la reducción de la expresión de una molécula diana, como una variante particular de splicing de un polipéptido de AspRS o una pareja de unión celular de un polipéptido de AspRS, que de otro modo contribuye a su actividad no canónica. Las terapias antisentido o de ARNi normalmente actúan como antagonistas de la actividad no canónica, p. ej. reduciendo la expresión del polipéptido de AspRS de referencia. También se incluyen polipéptidos, anticuerpos, péptidos miméticos u otras terapias basadas en moléculas pequeñas, que agonizan o antagonizan la actividad no canónica de un polipéptido de AspRS de referencia, mediante la interacción directa con el polipéptido de AspRS, su pareja o parejas de unión celular o ambos.

En determinadas realizaciones de la presente descripción, por ejemplo, se proporcionan métodos para modular actividades celulares terapéuticamente relevantes, que incluyen, aunque sin limitaciones, el metabolismo celular, la diferenciación celular, la proliferación celular, la muerte celular, la movilización celular, la migración celular, la transcripción génica, la traducción del ARNm, la impedancia celular, la producción de citoquinas y similares, lo que incluye poner en contacto una célula con una composición de AspRS como las descritas. De acuerdo con ello, las composiciones de AspRS se pueden emplear esencialmente en el tratamiento de cualquier célula o tejido o sujeto pueda beneficiarse de la modulación de una o varias de esas actividades.

Las composiciones de AspRS descritas en este documento también pueden utilizarse en cualquiera de una serie de contextos terapéuticos que incluyen, p. ej., los relativos al tratamiento o prevención de enfermedades neoplásicas, enfermedades del sistema inmune (p. ej., enfermedades autoinmunes e inflamatorias), enfermedades infecciosas, enfermedades metabólicas, enfermedades neuronales y neurológicas, enfermedades musculares y cardiovasculares, enfermedades asociadas con la hematopoyesis aberrante, enfermedades asociadas con la angiogénesis aberrante, enfermedades asociadas con la supervivencia celular aberrante y otras.

Por ejemplo, en determinadas realizaciones ilustrativas descritas en este documento, se pueden utilizar las composiciones de AspRS aquí descritas para modular la angiogénesis, p. ej., a través de la modulación de la proliferación o señalización de células endoteliales. La proliferación o señalización de células endoteliales se puede controlar utilizando una línea celular apropiada (p. ej., células pulmonares endoteliales microvasculares humanas (HMVEC-L) y células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), y utilizando un ensayo apropiado (p. ej., ensayos de migración de células endoteliales, ensayos de proliferación de células endoteliales, ensayos de formación de tubo, ensayos de tapón de matrigel, etc.), muchos de los cuales son conocidos y están disponibles en la técnica.

Por lo tanto, en realizaciones relacionadas descritas en este documento, las composiciones descritas pueden emplearse en el tratamiento de esencialmente cualquier célula o tejido o sujeto que pueda beneficiarse de la modulación de la angiogénesis. Por ejemplo, en algunas formas de realización descritas en este documento, se puede poner en contacto una célula o tejido o sujeto que esté experimentando o sea susceptible de sufrir angiogénesis (p. ej., una afección angiogénica) con una composición adecuada de la descripción para inhibir la afección angiogénica. En otras realizaciones descritas en este documento, se puede poner en contacto una célula o tejido que esté experimentando o sea susceptible de sufrir una angiogénesis insuficiente (p. ej., una afección angiostática) con una composición apropiada descrita en este documento con el fin de interferir en la actividad angiostática o promover la angiogénesis.

Entre los ejemplos ilustrativos y no restrictivos de condiciones angiogénicas figuran la degeneración macular relacionada con la edad (AMD), el cáncer (tanto sólido como hematológico), las anomalías del desarrollo (organogénesis), la ceguera diabética, la endometriosis, la neovascularización ocular, la psoriasis, la artritis reumatoide (RA) y las decoloraciones de la piel (p. ej., hemangioma, nevus flammeus o nevus simplex). Los ejemplos de afecciones antiangiogénicas incluyen, aunque sin limitarse a ellas, enfermedades cardiovasculares,estenosis, lesión tisular tras reperusión de tejido isquémico o insuficiencia cardíaca, inflamación crónica y cicatrización de heridas.

Las composiciones de la presente descripción también pueden ser útiles como inmunomoduladores para el tratamiento de indicaciones anti o proinflamatorias mediante la modulación de las células que median, directa o indirectamente, en enfermedades, afecciones y trastornos autoinmunes o inflamatorios. La utilidad de las composiciones descritas en el presente documento como inmunomoduladores se puede controlar utilizando cualquiera de las técnicas conocidas y disponibles, incluidos, p. ej., ensayos de migración (p. ej., utilizando leucocitos o linfocitos), ensayos de producción de citoquinas o ensayos de viabilidad celular (p. ej., utilizando células B, células T, monocitos o células NK).

«Inflamación» hace referencia en general a la respuesta biológica de tejidos a estímulos nocivos como agentes

patógenos, células dañadas (p. ej., heridas) e irritantes. El término «respuesta inflamatoria» se refiere a los mecanismos específicos por los que se logra y se regula la inflamación, incluidas, simplemente a modo de ilustración, la activación o migración de células inmunes, la producción de citoquinas, la vasodilatación, incluyendo la liberación de cininas, la fibrinólisis y la coagulación, entre otros descritos en este documento y conocidos en la técnica. Idealmente, la inflamación es un intento de protección del organismo tanto para eliminar los estímulos perjudiciales como para iniciar el proceso de recuperación del tejido o tejidos afectados. En ausencia de inflamación, las heridas e infecciones no se curarían nunca, creando una situación en la que la destrucción progresiva del tejido pondría en peligro la supervivencia. Por otra parte, la inflamación excesiva o crónica puede estar asociada a múltiples enfermedades, como la fiebre del heno, la aterosclerosis o la artritis reumatoide, entre otras descritas en este documento y conocidas en la materia.

Los signos clínicos de la inflamación crónica dependen de la duración de la enfermedad, de las lesiones inflamatorias, de la causa y del área anatómica afectada. (Véase, p. ej., Kumar *et ál.*, Robbins Basic Pathology-8th Ed., 2009 Elsevier, Londres; Miller, LM, Pathology Lecture Notes, Atlantic Veterinary College, Charlottetown, PEI, Canadá). La inflamación crónica se asocia con multitud de enfermedades o afecciones patológicas, como alergias, enfermedad de Alzheimer, anemia, estenosis de la válvula aórtica, artritis tales como la artritis reumatoide y la osteoartritis, cáncer, insuficiencia cardíaca congestiva, fibromialgia, fibrosis, ataque cardíaco, insuficiencia renal, lupus, pancreatitis, derrame cerebral, complicaciones quirúrgicas, enfermedad pulmonar inflamatoria, enfermedad inflamatoria del intestino, aterosclerosis, trastornos neurológicos, diabetes, trastornos metabólicos, obesidad y psoriasis, entre otras descritas en este documento y conocidas en la materia. Por lo tanto, las composiciones de AspRS descrita en el presente documento se pueden utilizar para tratar o controlar la inflamación crónica, modular cualquiera de las respuestas inflamatorias crónicas individuales o tratar cualquiera de las enfermedades o afecciones asociadas con la inflamación crónica.

Determinadas respuestas inflamatorias específicas incluyen la producción y actividad de citoquinas y las rutas relacionadas. Por ejemplo, determinados ejemplos de realizaciones tienen que ver con la modulación de la señalización celular mediante factor nuclear kB-(NF-kB) así como mediante el aumento de las actividades cadena abajo de este factor de transcripción. En ciertos casos, los aumentos en la actividad del NF-kB pueden conducir a aumentos en la señalización o actividad de citoquinas, como las citoquinas proinflamatorias (p. ej., TNF- $\alpha$ ) o antiinflamatorias (p. ej., IL-10).

Los criterios para evaluar los signos y síntomas de las afecciones inflamatorias y otras, incluidos con fines de realizar un diagnóstico diferencial y también para controlar tratamientos como la determinación de si se ha administrado una dosis terapéuticamente eficaz en el transcurso del tratamiento, por ejemplo, la determinación de la mejoría de acuerdo con criterios clínicos aceptados, serán evidentes para los expertos en la técnica y se ilustran por las enseñanzas de, p. ej., Berkow *et ál.*, eds., The Merck Manual, 16th edition, Merck and Co., Rahway, N.J., 1992; Goodman *et ál.*, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th edition, Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y., (2001); Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 3rd edition, ADIS Press, Ltd., Williams and Wilkins, Baltimore, MD. (1987); Ebadi, Pharmacology, Little, Brown and Co., Boston, (1985); Osolci al., eds., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, Mack Publishing Co., Easton, PA (1990); Katzung, Basic and Clinical Pharmacology, Appleton and Lange, Norwalk, CT (1992).

También se describen en este documento procedimientos para modular una respuesta inmune, como una respuesta inmune innata. Tal como aquí se utiliza, el término «respuesta inmune» incluye una reacción cuantificable u observable a un antígeno, composición de vacuna o molécula inmunomoduladora mediada por una o más células del sistema inmune. Una respuesta inmune normalmente comienza con una molécula de antígeno o inmunomodulador que se une a una célula del sistema inmune. Una reacción a una molécula de antígeno o inmunomoduladora puede ser mediada por muchos tipos de células, incluyendo una célula que se une inicialmente a una molécula de antígeno o inmunomoduladora y las células que participan en la mediación de respuesta inmune innata, humoral y mediada por células.

Una «respuesta inmune innata», tal como se utiliza en el presente documento, puede implicar la unión de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o de un polipéptido de AspRS a los receptores de la superficie celular, tales como los receptores de tipo toll. La activación de los receptores de tipo toll y las rutas de señalización Ipaf en respuesta a PAMP u otras señales conduce a la producción de moléculas inmunomoduladoras, como citoquinas y moléculas coestimuladoras, que inducen o mejoran la respuesta inmune. Las células implicadas en la respuesta inmune innata incluyen, p. ej., células dendríticas, macrófagos, células asesinas naturales y neutrófilos, entre otros.

Determinadas realizaciones descritas en este documento hacen referencia al aumento de la respuesta inmune innata. Otras realizaciones descritas en este documento se refieren a la disminución de la respuesta inmune innata. En ciertos aspectos, una respuesta inmune innata es mediada por uno o más receptores de tipo toll (TLR), como TLR2 o TLR4. Determinados polipéptidos de AspRS descritos se unen a los TLR como TLR2 o TLR4. Los TLR reconocen los PAMP que distinguen a agentes infecciosos de sí mismos y median en la producción de moléculas inmunomoduladoras, como las citoquinas, necesarias para el desarrollo de la inmunidad adaptativa efectiva (Aderem, A and Ulevitch, R. J. Nature 406: 782-787 (2000) and Brightbill, H. D., Immunology 101: 1-10 (2000)). Los miembros de la familia de los receptores de tipo toll reconocen una variedad de tipos de antígenos y pueden discriminar entre los patógenos. Por ejemplo, TLR2 reconoce diversos hongos, bacterias grampositivas y componentes de micobacterias, TLR4 reconoce los lipopolisacáridos de gramnegativas (LPS) y TLR9 reconoce ácidos nucleicos tales como CpG de ADN bacteriano.

Las composiciones de AspRS que estimulan la inmunidad innata (p. ej., a través de TLR2 o TLR4) pueden ser útiles en el tratamiento de una amplia variedad de afecciones, tanto en solitario como en combinación con otras terapias. Entre los ejemplos específicos de esas afecciones figuran enfermedades infecciosas, tales como enfermedades infecciosas bacterianas, virales y parasitarias. Las composiciones de AspRS que estimulan la inmunidad innata también pueden ser útiles como adyuvantes de vacunas, para mejorar la respuesta inmune de un sujeto al antígeno primario, ya sea en una vacuna viva, atenuada o de otro tipo.

Ejemplos de agentes o enfermedades virales infecciosas (y sus correspondientes vacunas) son, entre otras, Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, Hepatitis E, calicivirus con diarrea, diarrea por rotavirus, neumonía por *Haemophilus influenzae* B y enfermedad invasiva, gripe, sarampión, paperas, rubeola, neumonía asociada a Parainfluenza, virus sincitial respiratorio (VSR), síndrome respiratorio agudo severo (SARS), virus del papiloma humano, herpes genital simple de tipo 2, VIH/SIDA, fiebre del dengue, encefalitis japonesa, encefalitis transmitida por garrapatas, virus del Nilo Occidental, fiebre amarilla, virus de Epstein-Barr, fiebre de Lassa, fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, fiebre hemorrágica del Ébola, fiebre hemorrágica de Marburgo, rabia, fiebre del Valle del Rift, viruela, lepra, infecciones respiratorias superiores e inferiores, poliomielititis, entre otras descritas en este documento.

Ejemplos de agentes o enfermedades por infecciones bacterianas son, entre otros, *Bacillus anthracis*, *Borellia burgdorferi*, *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Clostridium botulinum*, *C. difficile*, *C. perfringens*, *C. tetani*, *Corynebacterium diphtheriae* (p. ej., difteria), *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium leprae*, *M. tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoea*, *N. meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia reckettsii*, *Salmonella typhi*, *S.typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Treponema pallidum*, *Vibrio cholera*, *Yersinia pestis*, *Bordatella pertussis*, y otitis media (p. ej., provocada por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* o *Moraxella catarrhalis*), entre otras aquí descritas.

Ejemplos de enfermedades infecciosas parasitarias son, entre otras, amebiasis (p. ej., *Entamoeba histolytica*), anquilostomiasis (p. ej., parásitos nematodos como *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale*), leishmaniasis, malaria (cuatro especies de parásito protozoario *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*), esquistosomiasis (esquistosoma parasitaria; *S. mansoni*, *S. haematobium* y *S. japonicum*), *Onchocerca volvulus* (ceguera de los ríos), *Trypanosoma cruzi* (enfermedad de Chagas / enfermedad del sueño americana), y *Dracunculus medinensis*, filariasis linfática.

Determinadas composiciones de AspRS descritas pueden ser útiles en el tratamiento o la reducción del choque endotóxico, que a menudo resulta de la exposición a antígenos extraños, como lipopolisacáridos (LPS). Debido a que el choque endotóxico puede estar mediado por señalización de TLR y a que los fragmentos de AspRS endógenos de origen natural pueden estimular a los TLR, ciertos agentes de unión, agentes antisentido o agentes ARNi aquí descritos pueden volver a un sujeto más resistente al choque endotóxico antagonizando o, por el contrario, reduciendo la estimulación del TLR2 o TLR4 mediante fragmentos endógenos de AspRS.

También se describen procedimientos de tratamiento de enfermedades inmunes. Enfermedades, trastornos o afecciones ilustrativas del sistema inmunológico que se pueden tratar de acuerdo con la presente descripción son, entre otras, las inmunodeficiencias primarias, la trombocitopenia inmune mediada, el síndrome de Kawasaki, trasplantes de médula ósea (p. ej., trasplante de médula ósea reciente en adultos o niños), leucemia linfática crónica de células B, infección por VIH (p. ej., infección adulta o pediátrica por VIH), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, púrpura postransfusional y similares.

Además, otras enfermedades, trastornos y afecciones incluyen síndrome de Guillain-Barré, anemia (p. ej., anemia asociada al parvovirus B19, pacientes con mieloma múltiple estable que tienen alto riesgo de infección (p. ej., infección recurrente), anemia hemolítica autoinmune (p. ej., anemia inmuno-hemolítica por anticuerpos calientes),  
5 trombocitopenia (p. ej., trombocitopenia neonatal), y neutropenia inmune mediada), trasplantes (p. ej., receptores negativos en citomegalovirus [CMV] de órganos positivos en CMV), hipogammaglobulinemia (p. ej., neonatos hipogammaglobulinémicos con factor de riesgo de infección o morbilidad), epilepsia (p. ej., epilepsia intratable), síndromes de vasculitis sistémicas, miastenia gravis (p. ej., descompensación en la miastenia gravis), dermatomiositis y polimiositis.

10

Otras enfermedades, trastornos y afecciones autoinmunes son, entre otras, la anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia neonatal autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, autoimmunocytopenia, anemia hemolítica, síndrome antifosfolípido, dermatitis, encefalomiелitis alérgica, miocarditis, policondritis recidivante, cardiopatía reumática, glomerulonefritis (p. ej., la nefropatía por IgA), esclerosis múltiple, neuritis, la oftalmía uveítis,  
15 poliendocrinopatías, púrpura (p. Ej., púrpura de Henloch-Schoenlein), enfermedad de Reiter, síndrome de la persona rígida, inflamación pulmonar autoinmune, síndrome de Guillain-Barré, diabetes mellitus dependiente de insulina y enfermedad ocular inflamatoria autoinmune.

Otras enfermedades, trastornos o afecciones autoinmunes son tiroiditis autoinmune; hipotiroidismo, incluidas la tiroiditis de Hashimoto y la tiroiditis caracterizada, p. ej., por la citotoxicidad celular y humoral de la tiroides; LES (caracterizado a menudo, p. ej., por inmunocomplejos circulantes y generados localmente); Síndrome de Goodpasture (que suele caracterizarse, p. ej., por anticuerpos antimembrana basal); pénfigo (que suele caracterizarse, p. ej., por anticuerpos epidérmicos acantolíticos); autoinmidades de receptores como, p. ej., la enfermedad de Graves (que suele caracterizarse, p. ej., por los anticuerpos contra un receptor de la hormona que  
25 estimula la tiroides; miastenia gravis, que suele caracterizarse, p. ej., por anticuerpos contra el receptor de acetilcolina); resistencia a la insulina (que suele caracterizarse, p. ej., por los anticuerpos del receptor de insulina); anemia hemolítica autoinmune (que suele caracterizarse, p. ej., por fagocitosis de los glóbulos rojos sensibilizados por anticuerpos); y púrpura trombocitopénica autoinmune (que suele caracterizarse, p. ej., por fagocitosis de plaquetas sensibilizadas por anticuerpos).

30

Otras enfermedades, trastornos y afecciones autoinmunes incluyen, sin limitarse a ellas, la artritis reumatoide (que suele caracterizarse, p. ej., por complejos inmunes en articulaciones); esclerodermia con anticuerpos anti-colágeno (que suelen caracterizarse, p. ej., por anticuerpos nucleolares y otros nucleares); enfermedad mixta del tejido conectivo, (que suele caracterizarse, p. ej., por anticuerpos a los antígenos nucleares extraíbles, p. ej.,  
35 ribonucleoproteína); polimiositis y dermatomiositis (que suelen caracterizarse, p. ej., por anticuerpos antinucleares no histónicos); anemia perniciosa (que suele caracterizarse, p. ej., por anticuerpos anti células parietales, antimicrosomales y antifactor intrínseco); enfermedad idiopática de Addison (que suele caracterizarse, p. ej., por citotoxicidad celular adrenal y humoral); infertilidad (que suele caracterizarse, p. ej., por anticuerpos antispennatozoal); glomerulonefritis (que suele caracterizarse, p. ej., por complejos inmunes o anticuerpos de  
40 membrana basal glomerular); por glomerulonefritis primaria, por nefropatía IgA; penfigoide ampolloso (que suele caracterizarse, p. ej., IgG y complemento en la membrana basal); síndrome de Sjögren (que suele caracterizarse, p. ej., por múltiples anticuerpos tisulares o por el anticuerpo antinuclear no histónico específico [SS-B]); diabetes mellitus (que suele caracterizarse, p. ej., por anticuerpos de células de islote humorales o celulares); y la resistencia a fármacos adrenérgicos, incluida la resistencia a fármacos adrenérgicos con asma o fibrosis quística (que suele  
45 caracterizarse, p. ej., por anticuerpos contra el receptor beta adrenérgico).

Entre otras enfermedades, trastornos o afecciones autoinmunes figuran la hepatitis crónica activa (que suele caracterizarse, p. ej. por anticuerpos de músculo liso); cirrosis biliar primaria (que suele caracterizarse, p. ej., por anticuerpos anti-mitocondriales); otras insuficiencias de glándulas endocrinas (caracterizadas, p. ej., por anticuerpos  
50 tisulares específicos en algunos casos); vitiligo (que suele caracterizarse, p. ej., por anticuerpos anti-melanocitos); vasculitis (que suele caracterizarse, p. ej., por inmunoglobulinas y complemento en las paredes de los vasos o bajo complemento del suero); condiciones post-infarto de miocardio (que suelen caracterizarse, p. ej., por anticuerpos anti-miocardio); síndrome de cardiotomía (que suele caracterizarse, p. ej., por anticuerpos anti-miocardio); urticaria (que suele caracterizarse, p. ej., por anticuerpos de IgG e IgM a IgE); dermatitis atópica (que suele caracterizarse,  
55 p. ej., por anticuerpos IgG e IgM a IgE); asma (que suele caracterizarse, p. ej., por anticuerpos IgG e IgM a IgE); miopatías inflamatorias; y otros trastornos inflamatorios, granulomatosos, degenerativos y atróficos.

También se describen procedimientos de modulación de la hematopoyesis y afecciones relacionadas. Ejemplos de procesos hematopoyéticos que pueden modularse con polipéptidos de AspRS descritos son, aunque sin limitarse a

ellos, la formación de células mieloides (p. ej., células eritroides, mastocitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas mieloides, granulocitos, tales como basófilos, neutrófilos y eosinófilos, megacariocitos, plaquetas) y células linfoides (p. ej., células asesinas naturales, células linfoides dendríticas, células B y células T). Ciertos procesos hematopoyéticos específicos incluyen, entre otras, eritropoyesis, granulopoyesis, linfopoyesis, megacariopoyesis, trombopoyesis. También figuran procedimientos para modular el tráfico o la movilización de células hematopoyéticas, incluidas las células madre hematopoyéticas, células progenitoras, eritrocitos, granulocitos, linfocitos, megacariocitos y trombocitos.

Los procedimientos de modulación de la hematopoyesis descritos en este documento pueden ponerse en práctica *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo* o en cualquier combinación de los mismos. Estos procedimientos se pueden practicar en cualquier muestra biológica, cultivo celular o tejido que contenga células madre hematopoyéticas, células progenitoras hematopoyéticas u otras células madre o progenitoras que sean capaces de diferenciarse a lo largo del linaje hematopoyético (p. ej., células madre derivadas de tejido adiposo). Para los procedimientos *in vivo* y *ex vivo*, se pueden aislar o identificar las células madre y células progenitoras, tanto de origen hematopoyético como otro, de acuerdo con las técnicas y características descritas en este documento y conocidas en la técnica.

En otras realizaciones descritas en este documento, se pueden utilizar las composiciones de AspRS descritas para modular la proliferación o supervivencia celular y, en consecuencia, para tratar o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones caracterizadas por anomalías en la proliferación o supervivencia celular. Por ejemplo, en determinadas realizaciones descritas en este documento, se pueden utilizar las composiciones de AspRS modular la apoptosis o para tratar enfermedades o afecciones asociadas a la apoptosis anormal. La apoptosis es el término utilizado para describir la cascada de señalización celular conocida como muerte celular programada. Existen diversas indicaciones terapéuticas para moléculas que inducen la apoptosis (p. ej., cáncer), así como para aquellas que inhiben la apoptosis (es decir, accidentes cerebrovasculares, infarto de miocardio, sepsis, etc.). La apoptosis puede ser controlada por cualquiera de las distintas técnicas disponibles conocidas, que incluyen, p. ej., ensayos que miden la fragmentación del ADN, las alteraciones en la asimetría de la membrana, la activación de las caspasas apoptóticas o la liberación de citocromo C y AIF.

Son ejemplos, entre otros, de enfermedades ilustrativas asociadas al aumento de la supervivencia celular o la inhibición de la apoptosis cánceres (tales como linfomas foliculares, carcinomas y tumores dependientes de hormonas, incluidos entre otros cáncer de colon, tumores cardiacos, cáncer pancreático, melanoma, retinoblastoma, glioblastoma, cáncer de pulmón, cáncer intestinal, cáncer testicular, cáncer de estómago, neuroblastoma, mixoma, mioma, linfoma, endoteloma, 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 Sjögren, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, diabetes autoinmune, cirrosis biliar, enfermedad de Behcet, enfermedad de Crohn, polimiositis, lupus eritematoso sistémico y glomerulonefritis inmune, gastritis autoinmune, púrpura trombocitopénica autoinmune y artritis reumatoide) e infecciones virales (como el virus del herpes, virus de la viruela y adenovirus), inflamación, enfermedad de injerto contra huésped (aguda o crónica), rechazo agudo de injerto y rechazo crónico de injerto.

Otros ejemplos de enfermedades o afecciones asociadas con el aumento de la supervivencia celular son la progresión o metástasis de tumores malignos y trastornos tales como leucemia (incluidas leucemias agudas, como, p. ej., leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, incluidas la mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia) y leucemias crónicas, como, p. ej., leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica, síndrome mielodisplásico, policitemia vera, linfomas (p. ej., enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedades de cadena pesada y tumores sólidos, incluidos entre otros sarcomas y carcinomas tales como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomyosarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de glándulas sebáceas, 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, menangioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.

Enfermedades ilustrativas asociadas con el aumento de la apoptosis incluyen, sin limitarse a ellas, SIDA (como

nefropatía inducida por VIH y encefalitis por VIH), enfermedades neurodegenerativas (como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentosa, degeneración cerebelar y tumor cerebral o enfermedad asociada a priones), trastornos autoinmunes como esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, diabetes autoinmune, cirrosis biliar, enfermedad de Behcet, 5 enfermedad de Crohn, polimiositis, lupus eritematoso sistémico, glomerulonefritis asociada al sistema inmunológico, gastritis autoinmune, púrpura trombocitopénica y artritis reumatoide, síndromes mielodisplásicos (como anemia aplásica), enfermedad de injerto contra huésped (aguda o crónica), lesión isquémica (como las causadas por infarto de miocardio, accidente cerebrovascular y lesión por reperfusión), lesión o enfermedad hepática, como, p. ej., daño hepático por hepatitis, cirrosis, lesión por isquemia o reperfusión, colestasis (lesión del conducto biliar) y cáncer de 10 hígado, enfermedad hepática inducida por toxinas (como la causada por el alcohol), choque séptico, colitis ulcerosa, caquexia y anorexia.

En otras realizaciones descritas en este documento, se pueden utilizar las composiciones descritas en el tratamiento de enfermedades o trastornos neuronales o neurológicos, incluidos ejemplos como enfermedad de Parkinson, 15 enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, corea de Huntington, hemiplejía 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, neoplasias del sistema nervioso, 20 síndromes neurocutáneos, enfermedades neurodegenerativas, síndromes de neurotoxicidad, trastornos de la motilidad ocular, trastornos del sistema nervioso periférico, trastornos pituitarios, pencefalia, síndrome de Rett, trastornos del sueño, trastornos de la médula espinal, apoplejía, corea de Sydenham, síndrome de Tourette, traumatismos y lesiones del sistema nervioso, etc.

25 Además, realizaciones adicionales descritas en este documento se refieren al uso de las composiciones de la descripción en el tratamiento de trastornos metabólicos como la adrenoleucodistrofia, la enfermedad de Krabbe (leucodistrofia de células globoides), leucodistrofia metacromática, enfermedad de Alexander, enfermedad de Canavan (leucodistrofia esponjiforme), enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, síndrome de Cockayne, enfermedad de Hurler, síndrome de Lowe, enfermedad de Leigh, enfermedad de Wilson, enfermedad de Hallervorden-Spatz, 30 enfermedad de Tay-Sachs, etc. La utilidad de las composiciones de la presente descripción en la modulación de procesos metabólicos puede controlarse utilizando cualquiera de las distintas técnicas conocidas y disponibles, incluidos, p. ej., ensayos para medir la lipogénesis de adipocitos o la lipólisis de adipocitos.

En realizaciones más específicas de la descripción, pueden utilizarse composiciones de AspRS descritas para 35 modular la señalización celular, p. ej., a través de proteínas de señalización celular (p. ej., Akt). Se puede controlar la señalización celular utilizando cualquiera de los distintos ensayos bien conocidos. Por ejemplo, la inducción de eventos de señalización celular generales se puede controlar mediante patrones de fosforilación alterada de una serie de proteínas diana. La detección de las actividades de señalización celular en respuesta al tratamiento de células con polipéptidos de AspRS sirve, por lo tanto, como indicador de efectos biológicos diferenciados. Las 40 proteínas diana utilizadas para este ensayo se pueden seleccionar con el fin de abarcar componentes clave de las principales cascadas de señalización celular, proporcionando de ese modo una perspectiva amplia del panorama de señalización celular y de su relevancia terapéutica. En general, dichos ensayos implican el tratamiento de células con polipéptidos de AspRS seguido por la inmunodetección con anticuerpos que detectan específicamente las formas fosforiladas (activadas) de las proteínas diana.

45 Algunos ejemplos, no restrictivos, de proteínas diana utilizadas para controlar eventos de señalización celular terapéuticamente relevantes son: p38 MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos; activada por estrés celular y citoquinas inflamatorias; implicadas en la diferenciación celular y la apoptosis); SAPK/JNK (proteína quinasa activada por estrés/Jun-amino-terminal quinasa; activadas por estrés celular y citoquinas inflamatorias); Erk1/2, 50 p44/42 MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos Erk1 y Erk2; activadas por una amplia variedad de señales extracelulares; implicadas en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular); y Akt (activada por la insulina y diversos factores de crecimiento o supervivencia; involucrada en la inhibición de la apoptosis, la regulación de la síntesis de glucógeno, la regulación del ciclo celular y el crecimiento celular). También se puede controlar la fosforilación de residuos de tirosina general como indicador general de cambios en la señalización celular mediada 55 por fosforilación.

Por supuesto, también pueden emplearse otras clases de proteínas, como moléculas de adhesión celular (p. ej., cadherinas, integrinas, claudinas, cateninas, selectinas, etc.) o canales iónicos, en el seguimiento de eventos o actividades celulares moduladas por las composiciones descritas.

En otras realizaciones específicas de la descripción, se pueden utilizar las composiciones de AspRS descritas para modular la producción de citoquinas por las células, p. ej., por células inmunes como monocitos o leucocitos. La producción de citoquinas puede controlarse mediante cualquiera de los distintos ensayos conocidos (RT-PCR, ELISA, ELISPOT, citometría de flujo, etc.). En general, dichos ensayos implican el tratamiento de células con polipéptidos de AspRS seguido por la detección de ARNm de citoquina o polipéptidos para medir los cambios en la producción de citoquinas. La detección de aumentos o disminuciones en la producción de citoquinas en respuesta al tratamiento de células con polipéptidos de AspRS sirve, por lo tanto, como indicador de efectos biológicos diferenciados. Los polipéptidos de AspRS descritos pueden inducir, mejorar o inhibir una respuesta inmune o inflamatoria modulando la producción de citoquinas. Por ejemplo, los polipéptidos y composiciones de AspRS descritos pueden utilizarse para alterar el perfil de citoquinas (p. Ej., de tipo 1 frente a tipo 2) en un sujeto. Ejemplos de citoquinas que se pueden medir para controlar los efectos biológicos de las composiciones de AspRS son, entre otros IL-1ra, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-12p40, IL-15, IL-18, IL-23 TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1, GRO- $\alpha$ , GM-CSF, G-CSF, etc.

Los siguientes ejemplos se proporcionan únicamente a modo de ejemplo y no son restrictivos. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente multitud de parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse para producir resultados esencialmente similares.

## 20 EJEMPLOS

### EJEMPLO 1

#### GENERACIÓN DE FRAGMENTOS DE ASPARTIL-ARNT SINTETASA (ASPRS) HUMANA

La AspRS humana recombinante de longitud completa con una secuencia de aminoácidos como la expuesta en la SEQ ID NO: 1 se expresó y se purificó de *E. coli* utilizando cromatografía níquel-IMAC. Para generar fragmentos de AspRS por proteólisis controlada, la proteína de longitud completa se trató con 42 nM de elastasa de neutrófilos humanos durante 30 minutos antes de la separación de los fragmentos por SDS-PAGE al 4-12 % MOPS o 12 % de solución reguladora MES (Figura 1C y D). Las digestiones con geles SDS-PAGE al 4-12 % MOPS revelaron un solo fragmento de proteína de aproximadamente 19 kDa (Figura 1 C), mientras que las digestiones con geles SDS-PAGE al 12 % de solución reguladora MES revelaron al menos tres fragmentos de péptidos adicionales más pequeños, de entre 3 y 6 kDa (Figura 1 D).

### 35 EJEMPLO 2

#### ACTIVACIÓN AKT DE FRAGMENTOS DE ASPRS EN CÉLULAS ENDOTELIALES

Se generaron grupos de fragmentos de AspRS añadiendo 42 nM de elastasa de neutrófilos a 2  $\mu$ g de AspRS recombinante de longitud completa durante 30 minutos a 37 °C. Las reacciones se detuvieron con la adición de alfa 1-antitripsina (Serpina A1) en exceso de 10 veces de la proteasa. Se trataron células endoteliales aórticas bovinas (BAEC) con grupos de 50 nm de proteínas de AspRS de longitud completa no escindidas o escindidas con elastasa de neutrófilos. Se incubaron las células con fragmentos de AspRS durante 10 y 15 minutos, se recogieron y se sometieron a electrotransferencia de Western con un anticuerpo que reconoce específicamente sólo la forma fosforilada (activada) de la molécula de señalización Akt. Este tratamiento dio lugar a una fuerte activación reproducible de Akt mediante fosforilación (Figuras 2A y 2B). Este efecto es significativo debido a la función de Akt en la regulación de la apoptosis, la síntesis de glucógeno, la regulación del ciclo celular y el crecimiento celular.

### EJEMPLO 3

#### 50 IDENTIFICACIÓN DE SITIOS DE ESCISIÓN DE ELASTASA DE NEURÓFILOS EN ASPRS

Se analizaron fragmentos generados por escisión con elastasa de neutrófilos (Figura 1 D) mediante LC/MS/MS para determinar las masas exactas de cada fragmento. Además, se escindieron fragmentos individuales de una ejecución con gel de SDS-PAGE al 4-12 % MOPS o 12 % de solución reguladora MES y se sometieron a digestión con tripsina en gel seguida por el análisis con LC/MS/MS para identificar la porción de la proteína de longitud completa de la que se generó el fragmento y para identificar los sitios de escisión sin tripsina que pudieran atribuirse a la elastasa de neutrófilos. La identidad de esos límites de los péptidos se resume en la Tabla 2.

Tabla 2 - Límites de péptidos Aspás

Fragmento	Masa total (Da)	Proteasa utilizada	Límite N-term.	Límite C-term.
D1	19437 18370	elastasa	1	154
D2	21590	elastasa	1	174
D3	4367 4468	elastasa	1	31
D4	3309	elastasa	399	425
D5	2517	elastasa	413	476
D6	3479	elastasa	397	425

**EJEMPLO 4**

5

**FRAGMENTO DE ASPRS AUMENTA LA SECRECIÓN DE TNF- $\alpha$  DE PBMC**

Se trataron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos con dosis de 100 nM de proteína de AspRS de duración completa y un fragmento de AspRS, D1 (Tabla 2), durante 24 horas. Se utilizó EMAPII (polipéptido endotelial activador de monocitos II, EMAPII, conocido por aumentar la secreción de TNF- $\alpha$  a partir de PBMC, como control positivo. Se observó un incremento de la secreción de TNF- $\alpha$  en respuesta a la AspRS de longitud completa y ese aumento fue de magnitud similar a la observada en el control positivo EMAPII. Sin embargo, inesperadamente el fragmento de AspRS D1 indujo la secreción de TNF- $\alpha$  hasta un nivel casi 6 veces mayor que la observada tanto con la AspRS de longitud completa como con el control positivo EMAPII (Figura 3). Por lo tanto, el fragmento D1 de AspRS tiene una nueva función que está enmascarada en gran medida en la proteína de longitud completa.

**EJEMPLO 5****FRAGMENTO DE ASPRS D1 INDUCE SECRECIÓN *IN VITRO* DE CITOQUINAS DISTINTA QUE LA ASPRS COMPLETA**

Se incubaron una AspRS de longitud completa (100 nM) o un fragmento de AspRS D1 (100 nM) con  $1 \times 10^6$  células mononucleares de sangre periférica (PBMC) durante 24 horas. Tras 24 horas de incubación, se recogieron los sobrenadantes, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y luego se analizaron múltiples citoquinas. Se midieron 27 citoquinas distintas de los sobrenadantes y se compararon con sobrenadantes de PBMC tratados con solución reguladora. Las barras de error son representativas de 2 repeticiones biológicas. Como muestra la Figura 4, el fragmento de AspRS D1 presentó una gran estimulación de numerosas citoquinas por encima y más allá de las estimulaciones observadas con AspRS de longitud completa (p. ej., IL1- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, MIP1- $\alpha$ , MIP1- $\beta$ , GRO- $\alpha$ , MCP-1, e IL-1ra).

**EJEMPLO 6****FRAGMENTO DE ASPRS INDUCE REGULACIÓN POSITIVA DE MARCADOR CD71 EN MONOCITOS**

35

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un donante de sangre normal. Se trataron  $1,5 \times 10^6$  PBMC con una dosis de 200 nM del fragmento de AspRS D1 (que consistía en los 154 primeros aminoácidos de la proteína de longitud completa) durante 24 horas. PBMC tratadas con 10  $\mu$ g/mL de lectina fitohemaglutinina (PHA) sirvieron de control positivo. Como muestra la Figura 5, se observó una regulación positiva del marcador de proliferación CD71 en los monocitos tratados con D1 tras la tinción con un anticuerpo anti-CD71 (Beckton-Dickinson) y el análisis de las muestras mediante citometría de flujo. No hubo un aumento significativo en la regulación positiva de CD71 en la población de linfocitos separada de las mismas muestras. Por lo tanto, D1 tiene una capacidad específica de tipo celular para activar monocitos en una mezcla de PBMC.

**EJEMPLO 7****FRAGMENTO DE ASPRS AUMENTA LA SECRECIÓN DE TNF- $\alpha$  DE MONOCITOS Y MACRÓFAGOS**

Se trataron líneas celulares tanto de monocitos (THP-1) como de macrófagos (RAW 264.7) con D1 etiquetado C-

terminal (C-D1) o AspRS de longitud completa (C-DRS) a 100 nM. Se recogió el sobrenadante tras 2, 4, 8 y 24 horas y a continuación se analizó la secreción de TNF- $\alpha$ . Como muestra la Figura 6, se observó la cantidad máxima de secreción de TNF- $\alpha$  después del tratamiento con C-D1 entre 2 y 4 horas, pero después disminuyó a las 8 y 24 horas. La secreción de TNF- $\alpha$  después del tratamiento con C-DRS fue insignificante en todos los puntos temporales examinados. El aumento de la secreción de TNF- $\alpha$  después del tratamiento con C-D1 era dependiente de la dosis. Además, el tratamiento de células con 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12,5nM y 6 nM de C-D1, N-D1 y C-DRS durante 4 horas demostró que sólo el tratamiento con C-D1 aumentó la secreción de TNF- $\alpha$ .

#### **EJEMPLO 8**

10

#### **FRAGMENTO DRS D1 INDUCE QUIMIOTAXIS DE UNA LÍNEA CELULAR DE MACRÓFAGOS**

Para evaluar la migración de células *in vitro*, se rellenaron unas 24-well Transwell con membranas de policarbonato (tamaño de poro 5 $\mu$ m, Costar) con 0,5 mg/ml de gelatina de PBS y se dejaron secar al aire. Las células RAW 264.7 separadas (línea celular de monocitos/macrófagos de ratón) se lavaron una vez con DMEM fresco y se suspendieron en 2x10<sup>7</sup> células/ml con 0,1 % de BSA/DMEM. Se diluyó AspRS de longitud completa (DRS) o D1 con 0,1 % de BSA/DMEM en diferentes concentraciones. Se añadieron las células RAW 264.7 a la cámara superior de 2x10<sup>6</sup> células en 100  $\mu$ l por pocillo. Las cámaras inferiores se llenaron con 500  $\mu$ l por pocillo de medios que contenían DRS o D1. Tras 24 horas a 37 °C, se añadió calceína AM (Invitrogen) a las cámaras inferiores con una concentración final de 8 $\mu$ M para teñir las células migradas. Tras una incubación de 30 minutos, las células que no habían migrado se retiraron de la superficie superior de la membrana Transwell con un hisopo de algodón. Las células migradas de la superficie de la membrana inferior se contaron en microscopio de fluorescencia en campos de alta potencia. Como muestra la Figura 7, D1 indujo la migración de modo dependiente de la dosis, mientras que la AspRS de longitud completa estimuló poca o ninguna migración en las mismas concentraciones.

25

#### **EJEMPLO 9**

#### **SECRECIÓN DE TNF- $\alpha$ DE MACRÓFAGOS INDUCIDA POR FRAGMENTO DE ASPRS PUEDE INHIBIRSE CON U0126**

30

Se trataron previamente células de macrófagos (264.7 RAW) con inhibidores de moléculas pequeñas U0126 o LY294022 a 100 nM durante una hora y a continuación con D1 a 50 nM o LPS a 1 ng/ml durante 4 horas más. Se recogió el sobrenadante, que se analizó para determinar la secreción de TNF- $\alpha$ . Como muestra la Figura 8, la secreción de TNF- $\alpha$  fue inhibida por U0126 en D1 y en las células tratadas con LPS. Sin embargo, LY294022 solamente inhibió la secreción de TNF- $\alpha$  en las células tratadas con LPS.

35

#### **EJEMPLO 10**

#### **FRAGMENTO DE ASPRS D1 INHIBE LA ANGIOGÉNESIS INDUCIDA POR VEGF**

40

El propósito de este experimento fue evaluar la actividad anti-angiogénica del fragmento D1 de AspRS. Se incorporó la proteína D1 directamente en tapones de Matrigel® para determinar su capacidad para inhibir la angiogénesis inducida por VEGF en un ensayo de tapones Matrigel® modificado. Los ratones hembra NCR (8 ratones/grupo) obtenidos pesaban de 21 a 25 g el día 1 del experimento. Se generaron bolsas de aire en los animales de ensayo mediante la inyección de 1 ml de aire en el espacio subcutáneo interescapular los días 1, 4 y 6, utilizando una aguja de calibre 27. En el día 7, se inyectaron en las bolsas de aire creadas previamente 0,5 ml de Matrigel® (VWR) con VEGF (Cell Sciences) + Salina, VEGF + Sutent (Pfizer Pharmaceuticals) o VEGF + proteína D1. En el día 13 (6 días después del implante), los animales fueron eutanasiados y se extirparon, fotografiaron y pesaron los tapones de Matrigel®. El principal criterio de valoración utilizado para evaluar la actividad fue el contenido de hemoglobina por 50 mg de peso de tapón Matrigel® húmedo. Como muestra la Figura 9, D1 causó una inhibición de la angiogénesis inducida por VEGF.

50

#### **EJEMPLO 11**

#### **FRAGMENTO DE ASPRS C-TERMINAL INDUCE SECRECIÓN DE TNF- $\alpha$ EN MONOCITOS**

Se trataron células de monocitos (THP-1) con D1 C-terminal o N-terminal o AspRS de longitud completa a 100 nM durante cuatro horas. Después de lo cual, se recogió el sobrenadante y se analizó para determinar la secreción de TNF- $\alpha$ . Como muestra la Figura 10, la inducción de la secreción de TNF- $\alpha$  fue mayor en las células tratadas con D1

C-terminal. El D1 N-terminal indujo una respuesta mucho menor, lo que indica que la región N-terminal del fragmento D1 probablemente juega un papel importante en su actividad de citoquinas. Todos los demás grupos de tratamiento tuvieron una inducción de la secreción de TNF- $\alpha$  significativamente menor.

## 5 EJEMPLO 12

### FRAGMENTO DE ASPRS D1 CONTIENE UN DOMINIO ESPECÍFICO DE MAMÍFEROS DE DRS HUMANO

Como muestra la Figura 11, sólo se encuentra un péptido de 32 aminoácidos en el N-terminal del DRS de mamíferos y no en DRS de levadura. Esta región de la proteína es prescindible para la actividad canónica de aminoacilación de ARNt sintetasa y se supone que contiene una posible hélice anfifílica, según Jacobo-Molina y Yang (1989), Escalante y Yang, JBC (1992). En función de la importancia observada del N-terminal de D1 en relación con su actividad de citoquinas, esta región única puede ser una importante mediadora en la actividad de las citoquinas de D1.

15

## EJEMPLO 13

### IDENTIFICACIÓN DE FRAGMENTO ENDÓGENO D1 DE MACRÓFAGOS

Como se muestra en la Figura 12A, se detectó un fragmento de AspRS en una línea celular de macrófagos de ratón (RAW264.7) utilizando análisis proteómicos LC/MS/MS. La Figura 12A muestra los pasos mediante los que se sometió a los macrófagos de ratón RAW264.7 a análisis SDS-PAGE. Se cortaron bandas de proteínas y se analizaron mediante LC MS/MS y se identificó un fragmento N-terminal de AspRS como D1. Este análisis de espectro de masas reveló que el fragmento D1 incluye la porción N-terminal de la unidad de monómero del residuo 501 del homodímero de AspRS (que consiste aproximadamente en los residuos 1-171 de la AspRS de longitud completa). El fragmento D1 incluye el dominio de unión del anticodón de AspRS humana (véase la Figura 12B) y tiene similitud estructural con la citoquina EMAPII que contiene un dominio de plegamiento OB altamente similar. La citoquina EMAPII se encuentra como dominio diferenciado en p43 (una proteína unida en el complejo de sintetasas multi-ARNt de células de mamífero), donde, en condiciones apoptóticas, se extirpa y se secreta para servir de citoquina inmunomoduladora. Existe un dominio similar de tipo EMAPII en la región C-terminal de la TyrRS humana. Sin embargo, en contraste con EMAP-II y los dominios homólogos que se encuentran en TyrRS y p43, D1 tiene una extensión de 22 aminoácidos única en el N-terminal que se encuentra sólo en eucariotas superiores y forma una hélice anfifílica.

## 35 EJEMPLO 14

### ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE ASPRS

Para entender mejor la estructura y el origen fisiológico de D1, se cristalizó AspRS humana nativa y se determinó su estructura tridimensional a una resolución de 1,9Å (véase la figura 12C). La parte de la estructura correspondiente a D1 forma un dominio que contiene un plegamiento OB separado mientras que el dominio catalítico de C-terminal se asemeja bastante al de la levadura y la AspRS bacteriana. El conector que abarca los residuos 154 y 182 que conectan el fragmento D1 y el dominio catalítico estaba estructuralmente desordenado, lo que sugiere su alta flexibilidad. La flexibilidad de esta región conectora y su aparente accesibilidad a las proteasas sugirieron que su escisión por proteasas endógenas liberaría D1 partiendo de AspRS nativa. El tratamiento de AspRS humana nativa recombinante con elastasa PMN confirmó esta expectativa por escisión y liberación limpia de D1 en el residuo 154 (véase el Ejemplo 3).

## EJEMPLO 15

50

### FRAGMENTO DE ASPRS D1 INDUCE SECRECIÓN *IN VIVO* E *IN VITRO* DE CITOQUINAS Y UNIÓN A CÉLULAS INMUNES

Los macrófagos son actores clave en la inmunidad innata y producen y secretan un gran número de citoquinas, incluidas las implicadas en el metabolismo celular y la inflamación. Para investigar la posible conexión entre el fragmento D1 de AspRS y la inflamación, se inyectó proteína D1 (10 mg/kg) por vía intravenosa en ratones sanos y se midieron los cambios en las citoquinas inflamatorias (tanto pro como antiinflamatorias) secretadas en el torrente sanguíneo en relación con los controles vehiculares. Como la AspRS y el D1 humanos y de ratón tienen un 96,8 % de identidad de secuencia, se utilizó AspRS humana recombinante y D1 en todos los estudios.

La Figura 13A muestra los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-10 en suero *in vivo* de ratones inyectados por vía intravenosa con 10 mg/kg de D1. Los ratones presentan un aumento de TNF- $\alpha$  al cabo de 2 horas que se elimina rápidamente a las 6 horas mientras que los niveles de IL-10 siguen aumentando.

5

Para confirmar estos resultados *in vivo*, también se expuso PBMC que representa una mezcla de monocitos y linfocitos, aislada a partir de donantes humanos, a la proteína D1 *in vitro* (así como a proteína AspRS de longitud completa) y se testaron los medios para la secreción de TNF- $\alpha$  o IL-10 en respuesta al tratamiento. De manera similar a los efectos observados *in vivo*, el tratamiento con D1 dio lugar a la secreción de TNF- $\alpha$  e IL-10 a partir de esta población de células mixtas (Figura 13B). Los efectos eran específicos de D1 y no se observaron con AspRS nativa, lo que ilustra los efectos de aislar este dominio N-terminal de ARNt sintetasa parental por el proceso de resección.

Para investigar qué células dentro de la mezcla de PBMC fueron objetivo de D1, se analizó mediante citometría de flujo su unión a las diferentes subpoblaciones de células dentro de la mezcla. Como se muestra en la Figura 13C, se observó una fuerte unión de D1 a los monocitos, con casi el 100 % de los monocitos de la mezcla unido por una molécula de D1. En contraste, no se detectó unión de la AspRS nativa a los monocitos (datos no mostrados). También se observó la unión de la proteína D1 a un subconjunto de linfocitos (~ 14%). Los análisis adicionales de la población de linfocitos unidos revelaron que la unión de D1 se produce tanto en células B (~ 80% del total de células B se consolidaron) como en células T (~ 20% de las células T totales se consolidaron) (véase la Figura 13C, recuadro). Tanto en monocitos como en linfocitos, los efectos eran específicos de D1 y no se observaron con AspRS nativa (datos no mostrados). Estos datos apoyan el papel de D1 en la unión directa y quizás en la modulación de células implicadas en la respuesta inmune.

## 25 EJEMPLO 16

### SEÑALES DE D1 CON FACTOR NUCLEAR KB (NF-KB)

El factor nuclear kB (NF-kB) es un factor de transcripción diseñado para desempeñar un papel importante en la aparición de la inflamación mediante la estimulación de la transcripción de citoquinas proinflamatorias (como TNF- $\alpha$ ) y, durante la resolución de la inflamación, para estimular entonces la expresión de citoquinas antiinflamatorias como IL-10. NF-kB también juega un papel central dirigiendo las respuestas celulares a muchos estímulos, incluidos el estrés oxidativo, los patógenos virales y bacterianos y las citoquinas inflamatorias. En consecuencia, se investigaron los efectos de D1 en la activación de NF-kB en macrófagos.

35

Para este experimento, se incubaron con PBS, D1 o AspRS de longitud completa las células RAW-Blue que codifican un gen reportero secretado de fosfatasa alcalina embrionaria inducible por NF-kB. Como muestra la Figura 14A, las células tratadas mostraron una fuerte activación dependiente de la dosis de NF-kB con D1, en comparación con la falta de activación por AspRS de longitud completa o PBS.

40

## EJEMPLO 17

### D1 SE UNE Y SEÑALIZA A TRAVÉS DE TLR2 Y TLR4

Se puede activar el NF-kB a través de varios receptores de la superficie celular de macrófagos, incluidos los receptores de tipo toll (TLR) que reconocen patrones. Para investigar la posible relación con la familia de receptores TLR, 7 líneas celulares HEK293 distintas fueron establemente cotransfectadas con genes reporteros inducibles por NF-kB (que codifican fosfatasa alcalina embrionaria secretada) y genes que codifican un grupo de receptores de tipo toll diferenciados (TLR2, TLR3, TLR4, TLR 5, TLR 7, TLR 8 y TLR9). Como muestra la Figura 14B, se observó activación de NF-kB inducida por D1 sólo en TLR2 o TLR4 y no en los TLR 3, 5, 7, 8 o 9.

Se utilizaron experimentos de citometría de flujo para establecer si D1 se unía a TLR2 o TLR4. En estos experimentos, se incubó D1 etiquetado como V5 (100 nM) o AspRS (100 nM) con células HEK293 que expresan de manera estable en TLR2 o TLR4. El vector vacío de células HEK293 transfectadas sirvió como control de unión nulo. La unión se evaluó mediante la detección de FITC-V5 utilizando citometría de flujo. La Figura 14C muestra que D1 se une con fuerza a células HEK transfectadas de forma estable sobrexpresadas en TLR2 o TLR4, pero mucho menos a células HEK transfectadas con el vector solo y que no expresan TLR2 ni TLR4.

## EJEMPLO 18

## LA HÉLICE ANFIFÍLICA EN LA ACTIVIDAD DE D1

El trabajo previo estableció los LPS como ligandos para TLR2 y 4. De hecho, un lípido A agonista (OM174) ligado para TLR2 y 4 mostró efectos similares *in vivo* a los observados en D1, a saber, la liberación transitoria de TNF- $\alpha$  (1-2 horas) y los consiguientes incrementos de la secreción de IL-10. D1 codifica un plegamiento de OB de tipo EMAP II. Como D1, el dominio EMAP-II, cuando se libera por escisión proteolítica de p43, estimula la secreción de TNF- $\alpha$  a partir de monocitos. El dominio EMAP-II también muestra actividad adicional en neutrófilos (que estimulan la migración y secreción de mieloperoxidasa). D1, sin embargo, no actúa en los neutrófilos (datos no mostrados). Una distinción entre EMAP-II y D1 es la hélice anfifílica única contenida dentro de los 22 primeros aminoácidos de D1. Por lo tanto, se investigó el papel de la hélice anfifílica en la actividad de D1.

Inicialmente, se eliminó de D1 toda la región de la hélice anfifílica de esos 22 aminoácidos para dar  $\Delta$ 22 D1. También se generaron determinadas mutaciones puntuales. Por ejemplo, como hélice anfifílica, la hélice D1 N-terminal humana contiene residuos de carga positiva en un lado de la hélice y residuos de carga negativa en el otro. El D1 de eucariotas inferiores tiene una hélice ligeramente más larga que tiene carga positiva en ambos lados. Se ha demostrado que los residuos con carga positiva de esta hélice fortalecen la unión de ARNt, siendo especialmente importante la secuencia de consenso LSKKXLKXXK (SEQ ID NO: 6). La evolución de esta hélice de una carga positiva a una hélice anfifílica (a través de la progresión de AspRS menos a más eucariotas) se produce mediante una transición concertada de 3 residuos altamente conservados para crear un cluster de cargas negativas en un lado de la hélice que es estrictamente conservado en eucariotas superiores (Figura 4A y B). Se planteó la hipótesis de que estos residuos cargados negativamente en particular, en el contexto de un plegamiento de OB de tipo EMAP II, pudieran contribuir a la actividad de la nueva hélice de 22 aminoácidos anexa a D1. Para explorar esta posibilidad, se efectuaron las sustituciones en los 3 residuos conservados del cluster de eucariotas superiores con carga negativa (E12, E16, D19) (véase la Figura 15B) para cambiar de nuevo a la forma de eucariota inferior (E12S, E16K, D19K) con su cluster cargado positivamente (SKK D1).

Se trataron entonces PBMC con 50 nm de D1, AspRS de longitud completa, el  $\Delta$ 22 mutante y los mutantes de carga AAA y SKK. En comparación con D1 intacto,  $\Delta$ 22 D1 indujo muy poca liberación de TNF- $\alpha$  o IL-10 a partir de PBMC (ver Figura 15C). Los mutantes AAK y SKK de D1 también vieron reducida su actividad (en una cuarta parte en el caso de SKK) tanto en la secreción de TNF- $\alpha$  como de IL-10, en comparación con D1. Estas observaciones sugieren un papel del N-terminal de la hélice anfifílica en la unión al receptor.

También respalda esta conclusión un N-V5-D1, con la etiqueta V5 en el extremo N en lugar del C-terminal, creado y probado tanto para la liberación de TNF- $\alpha$  como para ensayos de unión. El N-V5-D1 fue incapaz de unirse o inducir la secreción de TNF- $\alpha$  a partir de PBMC (datos no mostrados). Por lo tanto, la actividad de D1 se puede reducir con una fusión de péptidos en el extremo N-terminal, lo que refuerza aún más el papel de la región anfifílica del N-terminal en la actividad de D1.

## 40 EJEMPLO 19

### LA ACTIVIDAD DE D1 NO SE DEBE A LA CONTAMINACIÓN POR ENDOTOXINAS

El D1 recombinante utilizado en estos estudios se purificó de *E. coli* y demostró tener un nivel de endotoxina bacteriana con un LPS inferior a 12 UE/mg. No obstante, el LPS es un fuerte estimulante de la señalización de TLR2 y TLR4 y los experimentos se llevaron a cabo para eliminar cualquier posible traza de endotoxina responsable de los resultados observados con D1. Con ese propósito, se expresó un gen que codifica D1 con una secuencia de secreción en células HEK293 transfectadas. Se recogieron, concentraron e incubaron con PBMC los medios condicionados que contenían secreción de D1.

Como muestra la Figura 16A, estos medios estimularon la secreción de TNF- $\alpha$ , mientras que los medios de células transfectadas con el vector solo no estimularon la secreción. Además, la liberación de TNF- $\alpha$  estimulada por D1 no se vio afectada por la polimixina B, un conocido desactivador de endotoxina (véase la Figura 16B). En contraste, como también muestra la Figura 16B, la activación estimulada por LPS de la secreción de TNF- $\alpha$  fue bloqueada completamente por la polimixina B. Como muestra la Figura 16C, al tratar D1 con proteinasa-K, que digiere completamente las proteínas pero no las endotoxinas, la actividad TNF- $\alpha$  en PBMC quedó totalmente anulada. La actividad de D1, por lo tanto, no se debe a la contaminación por endotoxinas.

## EJEMPLO 20

**EXPERIMENTOS *IN VIVO* EN RATONES *KNOCK-IN* CON  $\Delta 22$  ASPRS**

Debido a que la variante  $\Delta 22$  de AspRS no estimula la secreción de TNF- $\alpha$  a través de TLR2 y TLR4, como se  
 5 mostró anteriormente, la generación de un ratón *knock-in* con  $\Delta 22$  AspRS permite examinar los efectos fisiológicos  
 del N-terminal de AspRS sin comprometer la actividad canónica y de aminoacilación esencial de la AspRS. Los  
 experimentos iniciales se centran en examinar los potenciales efectos protectores de la eliminación de la región  $\Delta 22$   
 de la AspRS, que se ha demostrado que contribuyen a la actividad de la AspRS como ligando endógeno de TLR2 y  
 TLR4.

10

Se lleva a cabo un experimento de choque endotóxico para comprobar si los ratones *knock-in* con una  $\Delta 22$  AspRS  
 son más resistentes al choque endotóxico debido a su falta de ligando endógeno para TLR2 y TLR4. En este  
 experimento, se inyecta por vía intraperitoneal a ratones de origen natural y *knock-in*  $\Delta 22$  AspRS LPS (1 mg/ratón)  
 en combinación con D-GalN (20 mg) en una solución salina de 200 $\mu$ L por dosis. Este es un modelo comúnmente  
 15 utilizado para el choque endotóxico o séptico que se traduce en una letalidad casi total en ratones de origen natural  
 (ver Car *et ál*, J Exp Med,179:1437-44, 1994). Se cree que, al eliminar un ligando del receptor de tipo toll  
 proinflamatorio endógeno (es decir, la región de AspRS representada por  $\Delta 22$ ), los ratones deberían ser resistentes  
 a la letalidad inducida por el choque endotóxico.

20 Se lleva a cabo un experimento de tolerancia a LPS para comprobar si los macrófagos de  $\Delta 22$  AspRS de ratones  
 son menos tolerantes a la estimulación con LPS debido a la falta de desensibilización de la señalización del receptor  
 de tipo toll. Los macrófagos de estos ratones *knock-in* no deberían haber estado expuestos a los efectos  
 proinflamatorios de un ligando endógeno de TLR2 y TLR4 (es decir, la región de AspRS representada por  $\Delta 22$ ). Para  
 examinar esta posibilidad, se estimula *ex vivo* a macrófagos peritoneales de ratones de origen natural y *knock-in* con  
 25  $\Delta 22$  AspRS con LPS (100 ng/ml) durante 24 horas, lo que da lugar a una activación y producción de citoquinas que  
 pueden analizarse con ELISA (véase Sato *et ál.*, J Immunol. 165:7096-101, 2000). Los macrófagos de los ratones  
 $\Delta 22$  AspRS deberían mostrar una respuesta más fuerte a los LPS debido a la falta de señal proinflamatoria que de  
 otro modo contribuye a la inducción de la tolerancia.

**30 LISTADO DE SECUENCIAS****[0335]**

<110> ATYR PHARMA, INC. Adams, Ryan A. Hong, Fei Zhao, Ji Piehl, Kristi Armour, Eva R. D'Arigo,  
 35 Kenny Greene, Leslie Ann Merriman, Eve

<120> COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS QUE COMPRENDEN ASPARTIL-ARNT SINTETASAS  
 CON ACTIVIDADES BIOLÓGICAS NO CANÓNICAS

<130> 120161.412PC

<140> PCT

<141> 31/03/2010

<150> US 61/165,194

<151> 31/03/2009

<160> 23

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

<211> 501

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Pro Ser Ala Ser Ala Ser Arg Lys Ser Gln Glu Lys Pro Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Ile Met Asp Ala 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  
 177ln Ala Val Phe Arg Leu Gln Ser Gly Ile Cys His Leu Phe Arg Glu

ES 2 560 674 T3

		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> 2  
 <211> 2322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

5

atctcgagat agccgcagct ctccgcatct ttctggagcc gcacctccac ggggagtcgg 60  
 agcgcgtgtg ctgagacccc agggctcggga gggcggagac tgggagggag ggagaagccc 120  
 ctttggcctg ccttacggaa gcctgcgagg gagggtggtg tccactgccc agttccgtgt 180  
 cccgatgcc agcgcagcg ccagccgcaa gagtccaggag aagcccggg agatcatgga 240  
 cggcggcgaa gattatgcta aagagagata tggaaatct tcaatgatac aatcacaaga 300  
 aaaaccagat cgagttttgg ttccgggttag agacttgaca atacaaaaag ctgatgaagt 360  
 tgtttgggta cgtgcaagag ttcatacaag cagagctaaa gggaaacagt gtttcttagt 420  
 cctacgtcag cagcagttta atgtccaggc tcttgtggcg gtgggagacc atgcaagcaa 480  
 gcagatgggt aaatttgctg ccaacatcaa caaagagagc attgtggatg tagaaggtgt 540  
 tgtgagaaaa gtgaatcaga aaattggaag ctgtacacag caagacgttg agttacatgt 600  
 tcagaagatt tatgtgatca gtttggctga acccctctg cccctgcagc tggatgatgc 660  
 tgttcggcct gaggcagaag gagaagagga aggaagagct actgttaacc aggatacaag 720  
 217 ttagacaac agagtcattg atcttaggac atcaactagt caggcagctc tccgtctcca 21-10

gtctggcatc tgccatctct tccgagaaac ttaattaac aaaggttttg tggaaatcca 840  
 aactcctaaa attatttcag ctgccagtga aggaggagcc aatgttttta ctgtgtcata 900  
 ttttaaaaat aatgcatacc tggctcagtc cccacagcta tataagcaa tgtgcatttg 960  
 tgctgatttt gagaaggttt tctctattgg accagatttc agagcggaaag actctaatac 1020  
 ccatagacat ctaactgagt ttggttggtt ggacattgaa atggctttta attaccatta 1080  
 ccacgaagtt atggaagaaa ttgctgacac catggtacaa atattcaaag gacttcaaga 1140  
 aaggtttcag actgaaattc aaacagttaa taacagttc ccatgtgagc cattcaaatt 1200  
 tttggagcca actetaagac tagaatattg tgaagcattg gctatgctta gggaagctgg 1260  
 agtcgaaatg ggagatgaag acgatctgag cacaccaaat gaaaagctgt tgggtcattt 1320  
 ggtaaaggaa aagtatgata cagattttta tattctgat aaatatccat tggctgtaag 1380  
 acctttctat acctgctctg acccaagaaa tcccaaacag tccaactctt acgatatgtt 1440  
 catgagagga gaagaaatat tgtcaggagc tcaaagaata catgatcctc aactgctaac 1500  
 agagagagct ttacatcatg gaattgattt ggagaaaatt aaggcttaca ttgattcctt 1560  
 ccgctttgga gcccctctc atgctggtgg aggcattgga ttggaacgag ttactatgct 1620  
 gtttctggga ttgcataatg ttcgtcagac ctccatgttc cctcgtgatc ccaaacgact 1680  
 cactccttaa attcacactt tgccacttaa ctccagtggt gatgacagag cgagaccctg 1740  
 cctcaaaaaa aaaaaaaaaa aaagaaagcc acacttattc ttttcagtaa cctgctagtg 1800  
 cacaggctgt actttaggtt cttaaaatat gcactagaat aaatttgcaa ggccctaaaa 1860  
 taccactgtt atttttggag taattcagta taggttcggt taaaagagat ttttataact 1920  
 tcagacatgc atcagtagga aataacttga gaaattcata tggttatggt acaaattcat 1980  
 attctgttac tacagtaaac gttaagagtt ttaaacagtt aagattgtac aatttttctt 2040  
 cttttctata ttacaagggc cccagtgtta atgtcttaga ttttcagtat ttgaacttat 2100  
 ttttttaaat tctgtcattg agataagaat aattcaggta gcatctgaaa ttttaatgaa 2160  
 tgtataattg gcatatcatg gaaaattaac cagaaagtat cagttcttaa aagttatgcc 2220  
 tagaaattat gtaaagctaa actactgggt agaaagtatt cagtgtataa ttgtattaat 2280  
 ttgttaaat ctaaacttga atttcaataa aattttaaag ct 2322

5 <210> 3  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 3

Met Pro Ser Ala Ser Ala Ser Arg Lys Ser Gln Glu Lys Pro Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Ile Met Asp Ala Ala Glu Asp Tyr Ala Lys Glu Arg Tyr Gly Ile Ser  
 20 25 30

15 <210> 4  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

20 <400> 4

ES 2 560 674 T3

Met Pro Ser Ala Asn Ala Ser Arg Lys Gly Gln Glu Lys Pro Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Ile Val Asp Ala Ala Glu Asp Tyr Ala Lys Glu Arg Tyr Gly Val Ser  
 20 25 30

5 <210> 5  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de consenso de residuos con carga positiva de la hélice anfifílica de AspRS

15 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 5, 9, 10  
 <223> Xaa = cualquier aminoácido no cargado positivamente

<400> 5

Leu Ser Lys Lys Xaa Leu Lys Lys Xaa Xaa Lys  
 1 5 10

20 <210> 6  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Anopheles gambiae

25 <400> 6

Glu Glu Pro Val Gly Ala Gly Ala Glu Ala Thr Ser Lys Lys Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Lys Lys Ala Ala Lys Asp Ala Glu Lys  
 20 25

30 <210> 7  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Ixodes scapularis

<400> 7

Asp Glu Asn Ala Ala Leu Gly Pro Asp Gly Gln Pro Leu Ser Lys Lys  
 1 5 10 15  
 Ala Leu Lys Lys Gln Ala Lys Glu Gln Glu Lys  
 20 25

35 <210> 8  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Lottia gigantea

40 <400> 8

Asp Gly Lys Pro Thr Ser Lys Lys Gly Leu Lys Lys Gln Gln Lys Glu  
 1 5 10 15  
 Ala Glu Lys

45 <210> 9  
 <211> 27

<212> PRT  
 <213> *Helobdella robusta*

<400> 9

5

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

<210> 10  
 <211> 23

<212> PRT  
 <213> *Xenopus tropicalis*

10

<400> 10

Ser Ala Ala Ser Glu Glu Gln Ala Gln Ser Lys Lys Ala Leu Lys Lys  
 1 5 10 15  
 Gln Gln Lys Glu Ala Glu Lys  
 20

<210> 11  
 <211> 26

<212> PRT  
 <213> *Takifugu rubripes*

15

<400> 11

20

Ser Cys Phe Ser Ala Ala Glu Ala Glu Gln Ala Gln Ser Lys Lys Gly  
 1 5 10 15  
 Leu Lys Lys Gln Gln Lys Glu Ala Glu Lys  
 20 25

<210> 12  
 <211> 26

<212> PRT  
 <213> *Tetraodon nigroviridis*

25

<400> 12

Asp Val Lys Gly Ala Ala Glu Glu Glu Gln Ala Gln Ser Lys Lys Gly  
 1 5 10 15  
 Leu Lys Lys Gln Gln Lys Glu Ala Glu Lys  
 20 25

30

<210> 13  
 <211> 27

<212> PRT  
 <213> *Gasterosteus aculeatus*

35

<400> 13

Glu Ala Pro Gly Ala Thr Glu Glu Glu Gln Gln Ala Gln Ser Lys Lys  
 1 5 10 15  
 Gly Leu Lys Lys Gln Gln Lys Glu Ala Glu Lys  
 20 25

40

<210> 14  
 <211> 23  
 <212> PRT

ES 2 560 674 T3

<213> Gallus gallus

<400> 14

Pro Ser Ala Ala Gly Arg Gly Gln Gly Lys Asp Arg Arg Pro Asp Asn  
 1 5 10 15  
 Glu Glu Gln Pro Ala Ala Asp  
 20

5

<210> 15

<211> 21

<212> PRT

<213> Bos taurus

10

<400> 15

Pro Ser Ala Ser Ala Ser Arg Lys Ser Gln Glu Lys Pro Arg Glu Ile  
 1 5 10 15  
 Met Asp Ala Ala Glu  
 20

15

<210> 16

<211> 20

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

20

<400> 16

Pro Ser Ala Asn Ala Ser Arg Lys Ser Gln Glu Lys Pro Arg Glu Ile  
 1 5 10 15  
 Asp Ala Ala Glu  
 20

25

<210> 17

<211> 21

<212> PRT

<213> Mus musculus

30

<400> 17

Pro Ser Ala Ser Ala Ser Arg Lys Ser Gln Glu Lys Pro Arg Glu Ile  
 1 5 10 15  
 Met Asp Ala Ala Glu  
 20

35

<210> 18

<211> 21

<212> PRT

<213> Procavia capensis

<400> 18

Pro Ser Ala Ser Ala Gly Arg Lys Asn Gln Glu Lys Pro Arg Glu Ile  
 1 5 10 15  
 Met Asp Ala Ala Glu  
 20

40

<210> 19

<211> 21

ES 2 560 674 T3

<212> PRT  
 <213> Monodelphis domestica

<400> 19

5

**Pro Ser Ala Ile Ala Ser Arg Lys Thr Gln Glu Lys Pro Arg Glu Ile**  
 1 5 10 15  
**Met Asp Ala Ala Glu**  
 20

<210> 20  
 <-211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Tarius syrincta

10

<400> 20

**Pro Ser Ala Ser Ala Ser Arg Arg Ser Gln Glu Lys Pro Arg Glu Ile**  
 1 5 10 15  
**Met Asp Ala Ala Glu**  
 20

15

<210> 21  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Pongo abelii

20

<400> 21

**Pro Ser Ala Ser Ala Ser Arg Lys Ser Gln Glu Lys Pro Arg Glu Ile**  
 1 5 10 15  
**Met Asp Ala Ala Glu**  
 20

25

<210> 22  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Pan troglodytes

30

<400> 22

**Pro Ser Ala Asp Ala Ser Arg Lys Ser Gln Glu Lys Pro Arg Glu Ile**  
 1 5 10 15  
**Met Asp Ala Ala Glu**  
 20

35

<210> 23  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 23

**Pro Ser Ala Ser Ala Cys Arg Lys Ser Gln Glu Lys Pro Arg Glu Ile**  
 1 5 10 15  
**Met Asp Ala Ala Glu**  
 20

40

**REIVINDICACIONES**

1. Polipéptido aislado de aspartil-ARNt sintetasa (AspRS) que consiste en 50-200 aminoácidos de longitud, que tiene una actividad antiinflamatoria y comprende los residuos de aminoácidos 1-154, 1-171 o 1-174 de la SEQ ID NO: 1, o un fragmento o variante activo de la SEQ ID NO: 1, donde el fragmento activo tiene al menos 50 aminoácidos de longitud y el fragmento o variante activo tiene al menos 80 % de identidad de secuencia a lo largo de su longitud con los residuos 1-154, 1-171, o 1-174 de la SEQ ID NO: 1, y donde el polipéptido de AspRS comprende una hélice anfifílica.
- 10 2. Polipéptido de AspRS aislado según la reivindicación 1, donde el polipéptido consiste esencialmente en (a) los residuos de aminoácidos 1-154, 1-171 o 1-174 de la SEQ ID NO: 1, o (b) una variante activa que tenga al menos 80 % de identidad de secuencia con un polipéptido de (a).
- 15 3. Polipéptido aislado de AspRS según la reivindicación 1 o 2, que consiste esencialmente en los residuos 1-154 de la SEQ ID NO: 1.
- 20 4. Polipéptido de AspRS aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la actividad antiinflamatoria es la inducción de la producción o actividad de citoquinas antiinflamatorias, la unión a uno o varios receptores de tipo toll, o ambas.
5. Polipéptido de AspRS aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además una pareja de fusión heteróloga o una derivación química y/o enzimática en uno o más aminoácidos constituyentes.
- 25 6. a) Polinucleótido aislado que codifica un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o un complemento del mismo, b) vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado según a) o una célula huésped que comprende un vector de expresión según b).
- 30 7. Composición que comprende un polipéptido de AspRS según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o un polinucleótido según la reivindicación 6 para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria o autoinmune.
8. Composición para el uso según la reivindicación 7, donde la composición tiene un nivel de endotoxina bacteriana que contiene un LPS inferior a aproximadamente 12 UE/mg.
- 35 9. Composición para el uso según la reivindicación 7 u 8, donde la composición se formula para su administración por vía oral, parenteral, intravenosa, intranasal, por inhalación, por aerosol, intracraneal o intramuscular.
- 40 10. Composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde el polipéptido aislado está modificado por pegilación.
11. Composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde el polipéptido aislado está fusionado a un fragmento Fc.
- 45 12. Uso del polipéptido de aspartil-ARNt sintetasa (AspRS) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para la identificación de una pareja de unión del polipéptido de AspRS, que comprende a) combinar el polipéptido de AspRS con una muestra biológica en condiciones adecuadas y b) detectar la unión específica del polipéptido de AspRS con una pareja de unión, identificando de este modo una pareja de unión que se une específicamente al polipéptido de AspRS.
- 50

1MPSASASRKSGEKPREIMDAAEYAKERYGISSMI  
 QSCEKPDRLVVRDLTIQKADEVVWVYRVRVHTSR  
 AKGKOCFLVLRQQQFNVDALVAVGDHASKOMVKFA  
 ANINKESYDVEGVVRKVNIGKIGSCTIQDQVVELHYQKI  
 VVLSLAEPRLPQLQDVAVRPEAEGEEEGRAIVNQDT  
 RLQNRVYDLRTSISQAVFRLQSGICHLFRETINKGFV  
 EIQTPKIISAASEGGANVFTVSYFKNINAYLAQSPOLYK  
 QMCGICADFEKAVFESIGPVRFAEDSNTHRLTEFVGLDI  
 EMAFNYHYHEVMEEIADTMVQIFKGLQERFQTEIQTY  
 NIKQFPCEPFKLEPTLRLLEYCEALAMLREAGVEMGD  
 EDDLSTPNEKILGHVKEKYDTDFYLDKYPLAVRPF  
 YTMPDPRNPKQSNYSYDMFMRGEEILSQAQRHDPQ  
 LLTERALHHGIDLEKIKAVIDSFRFGAPPHAGGGIGLE  
 RVTMLFLGLHNVQRQ TSMFPRDPKRLTP 501

FIG. 1B

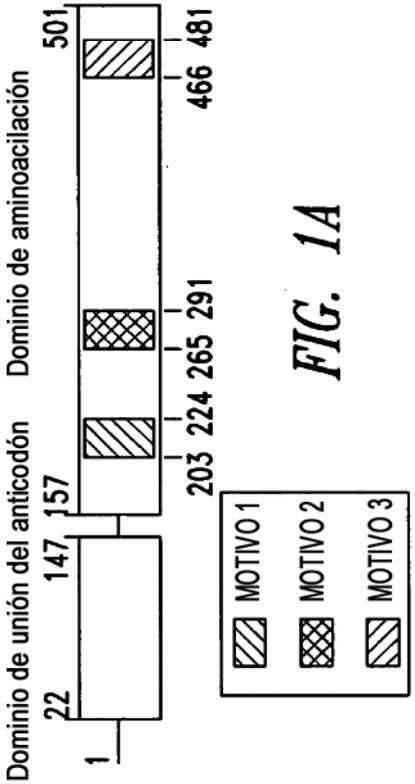


FIG. 1A

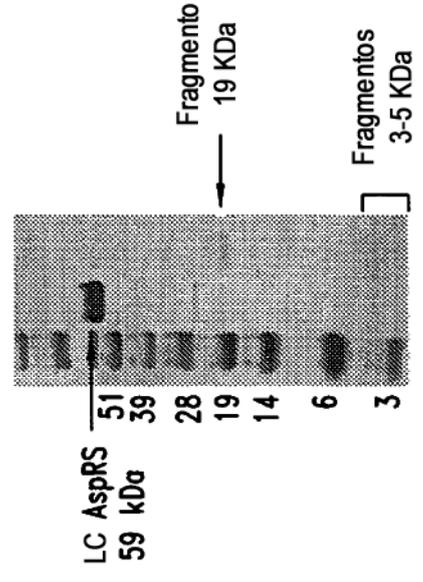


FIG. 1D

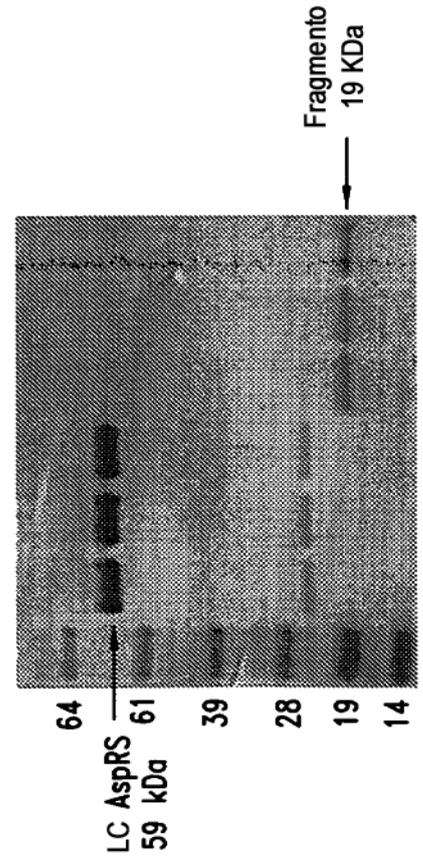
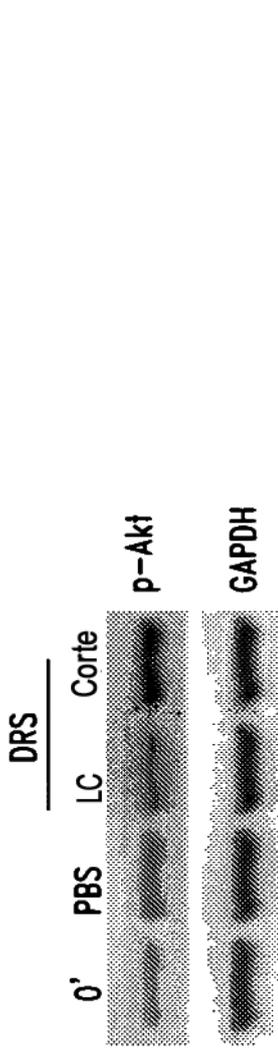
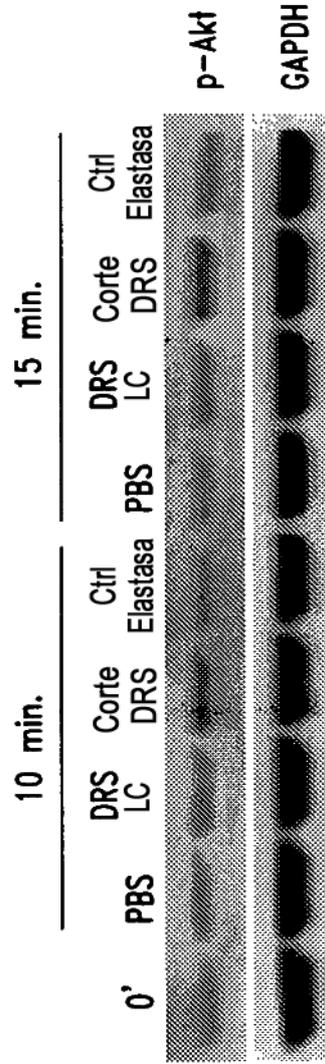


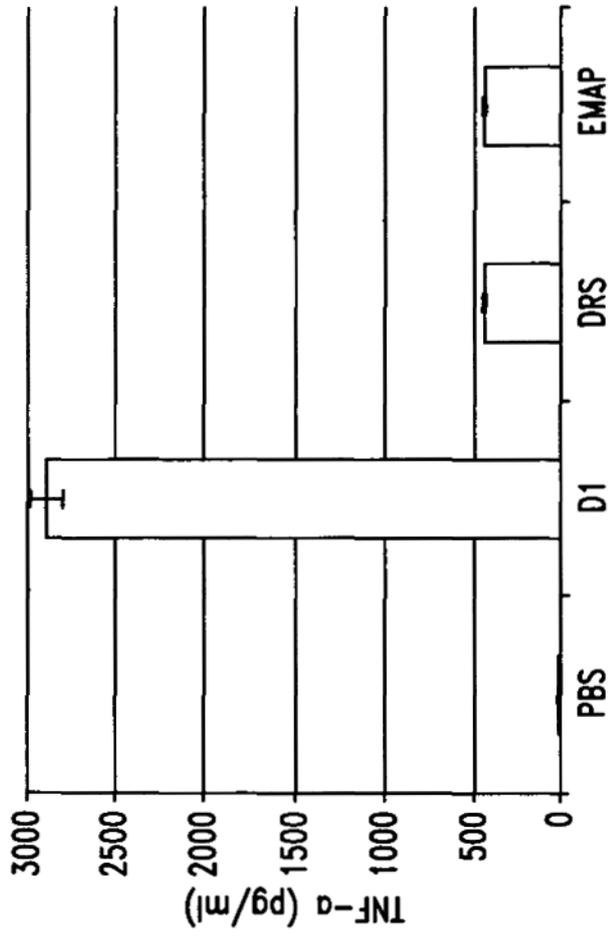
FIG. 1C



**FIG. 2A**



**FIG. 2B**



*FIG. 3*

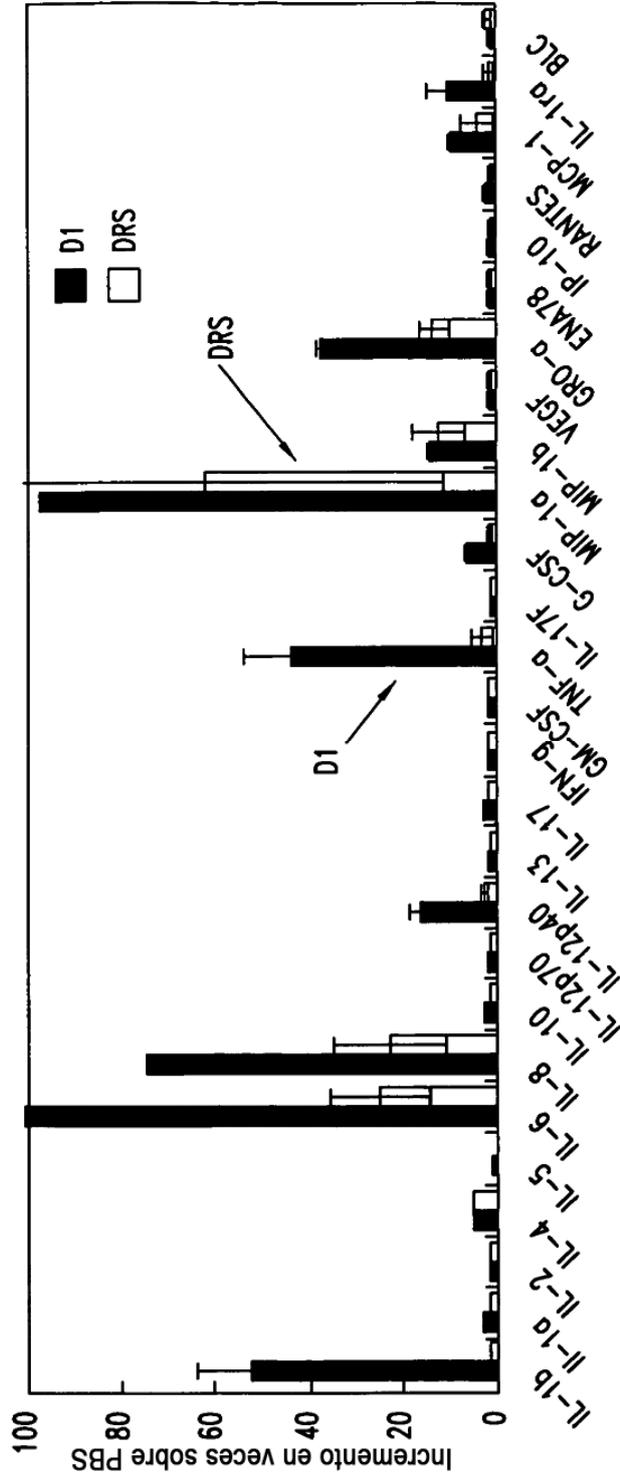


FIG. 4

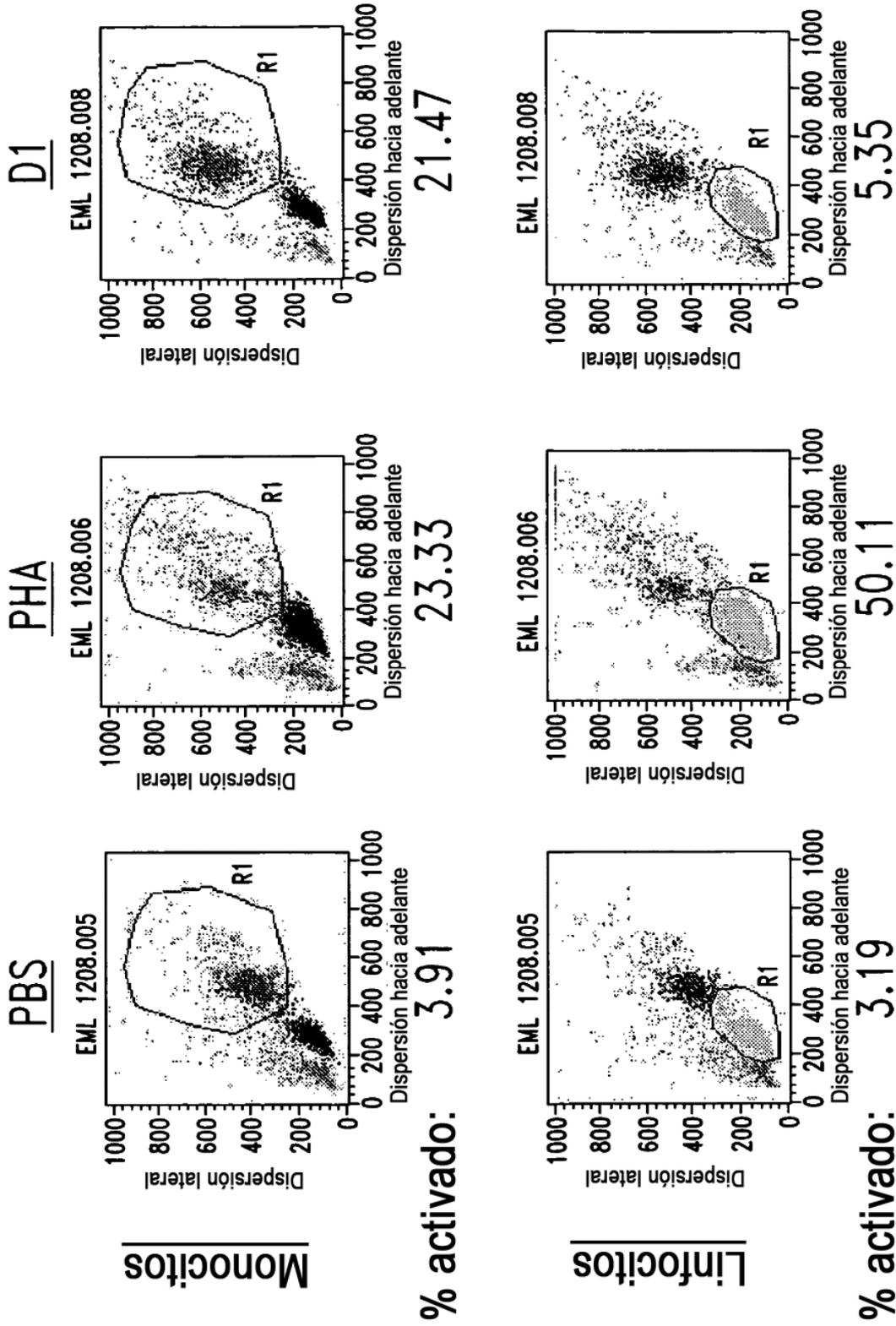


FIG. 5

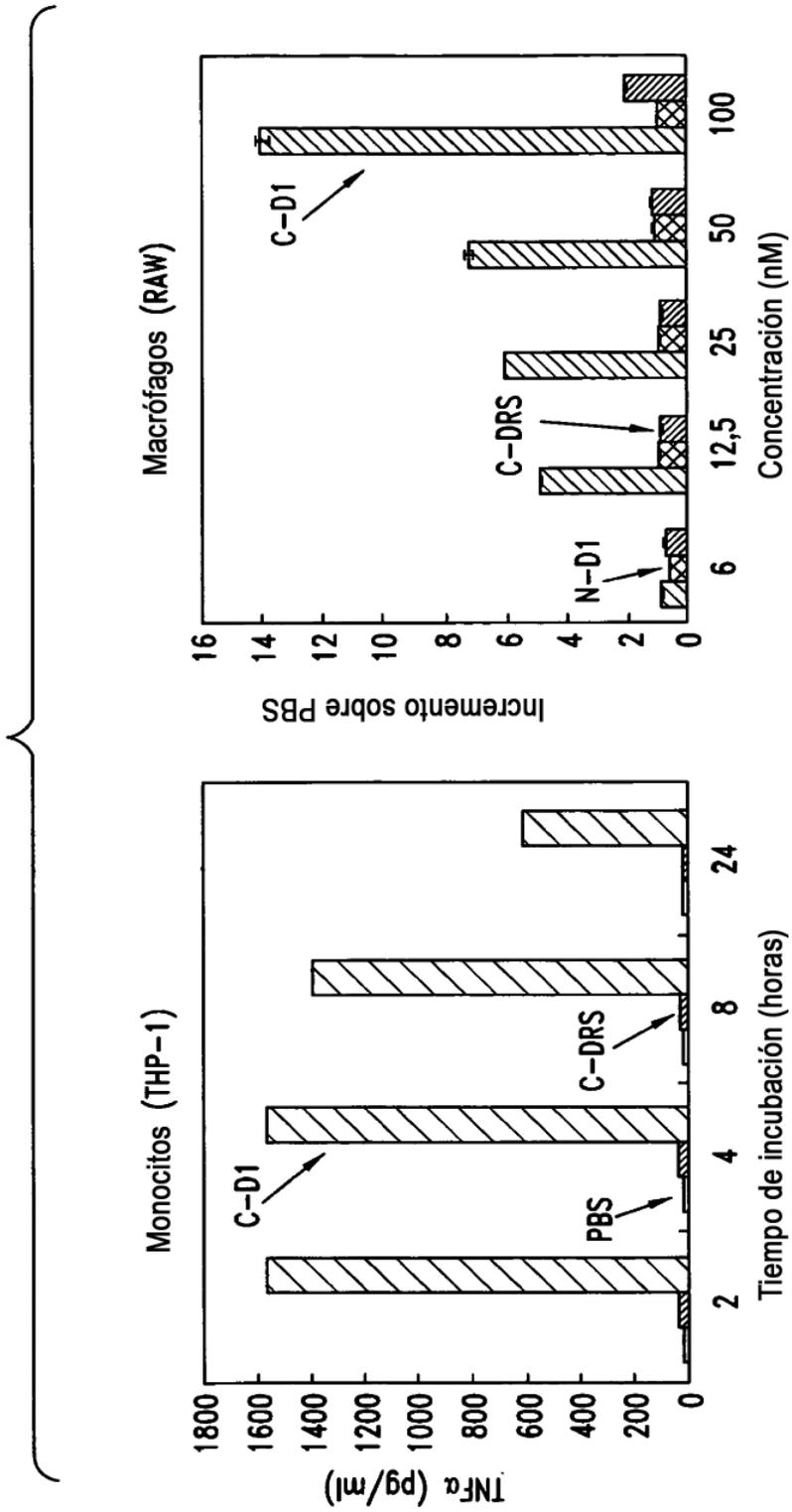


FIG. 6

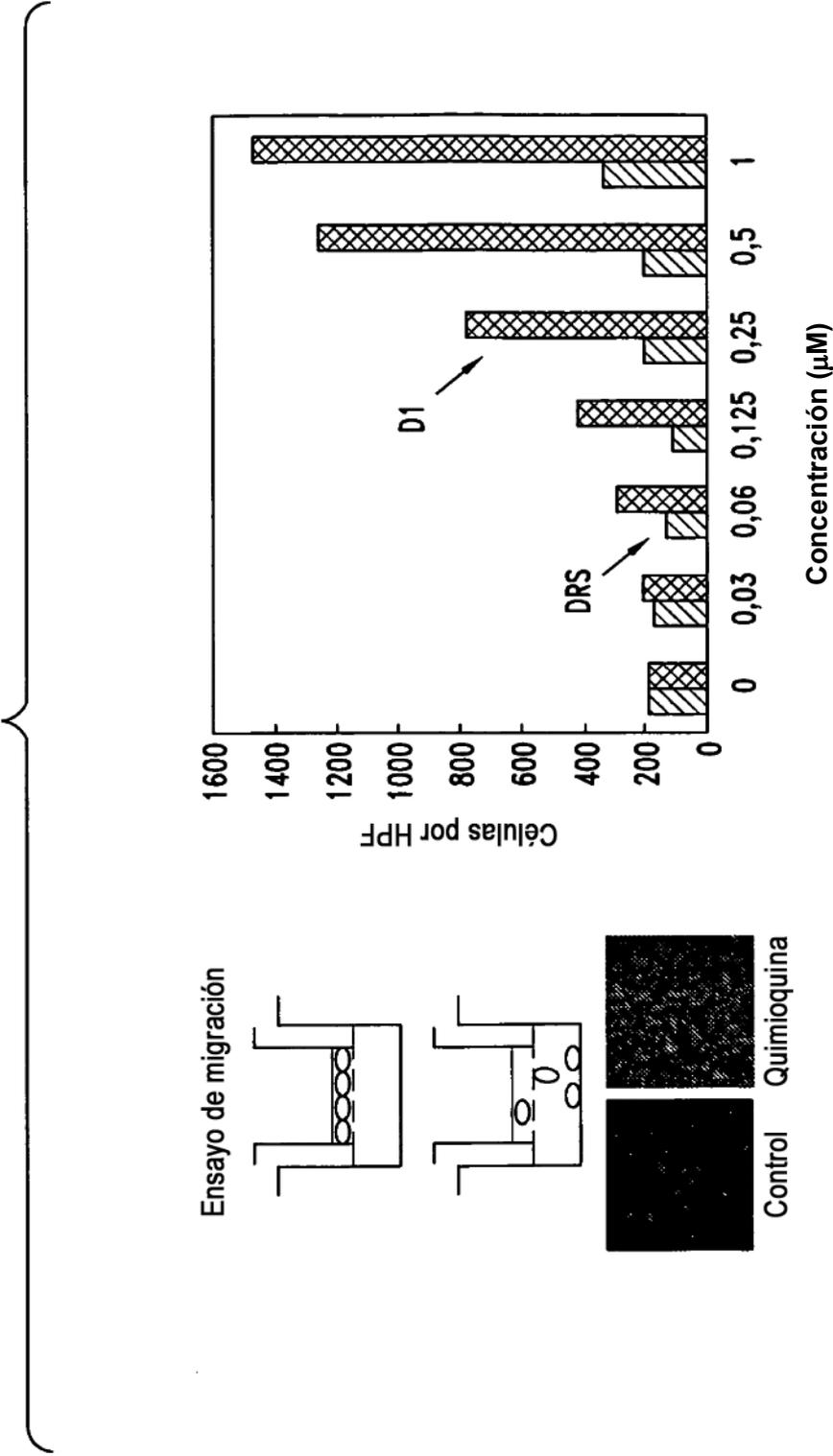
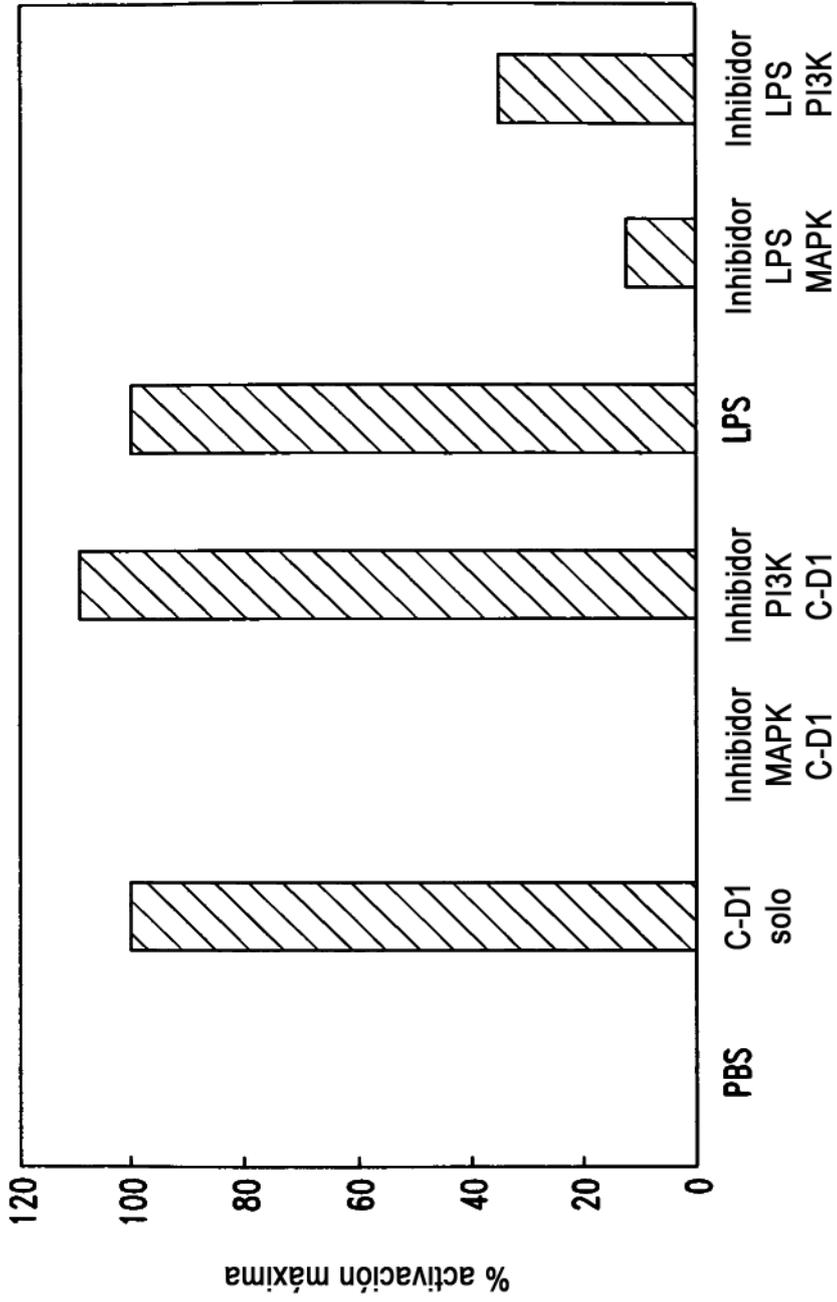
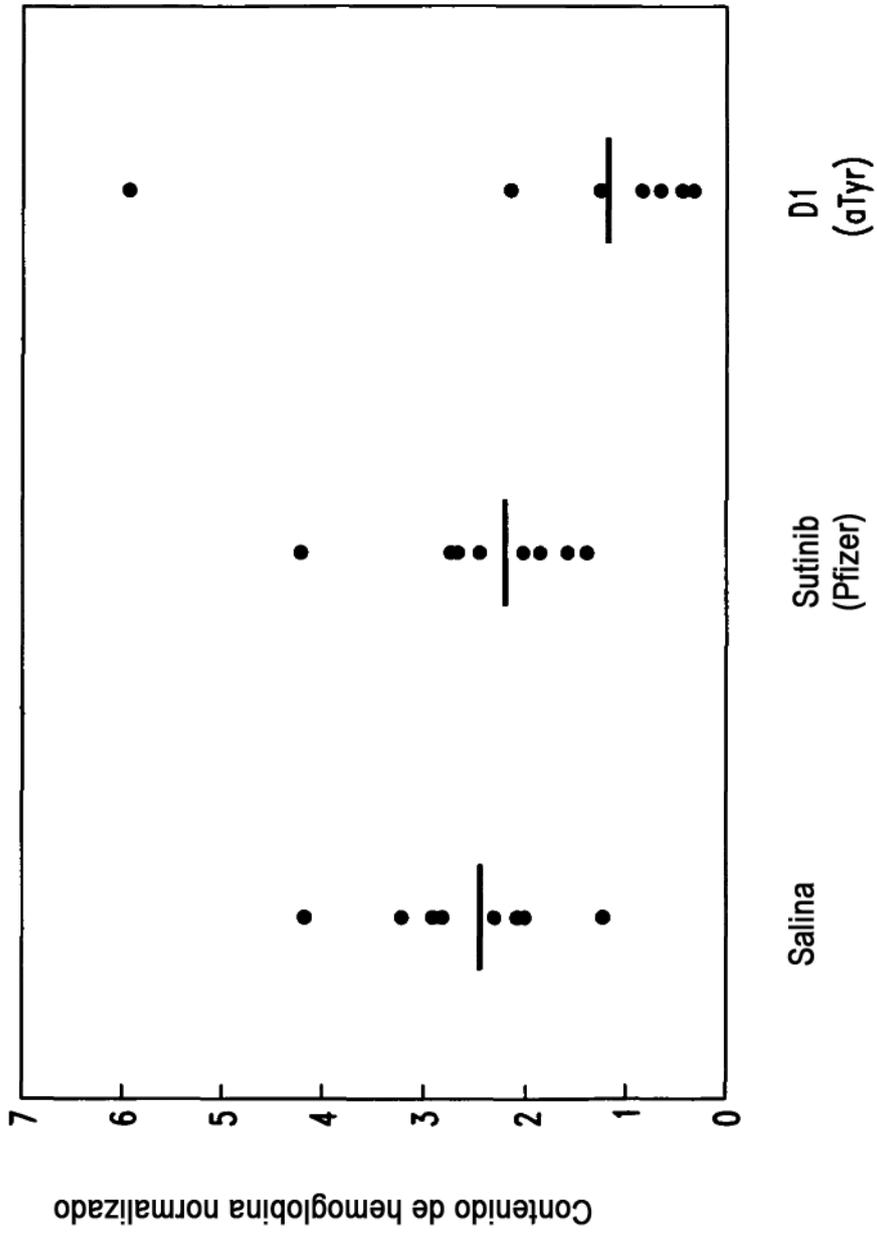


FIG. 7



*FIG. 8*



*FIG. 9*

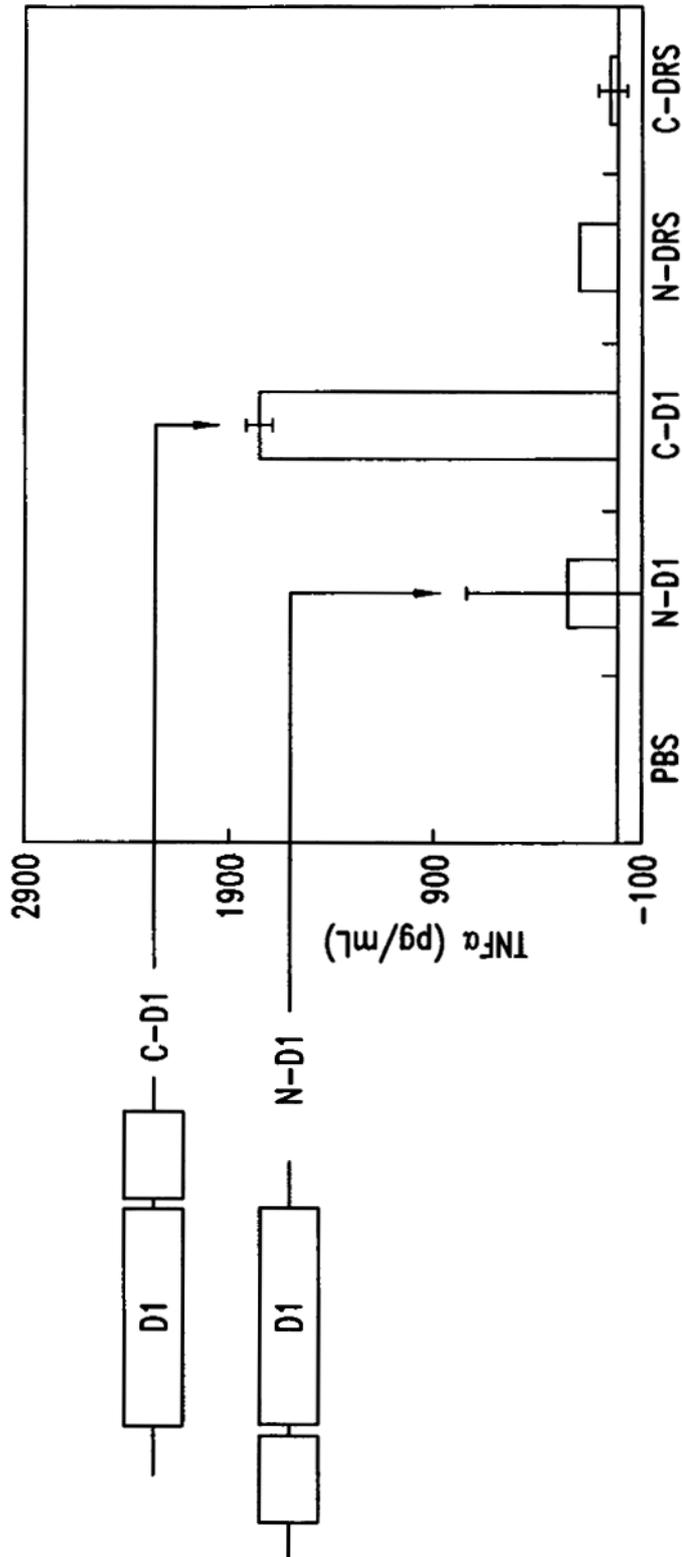
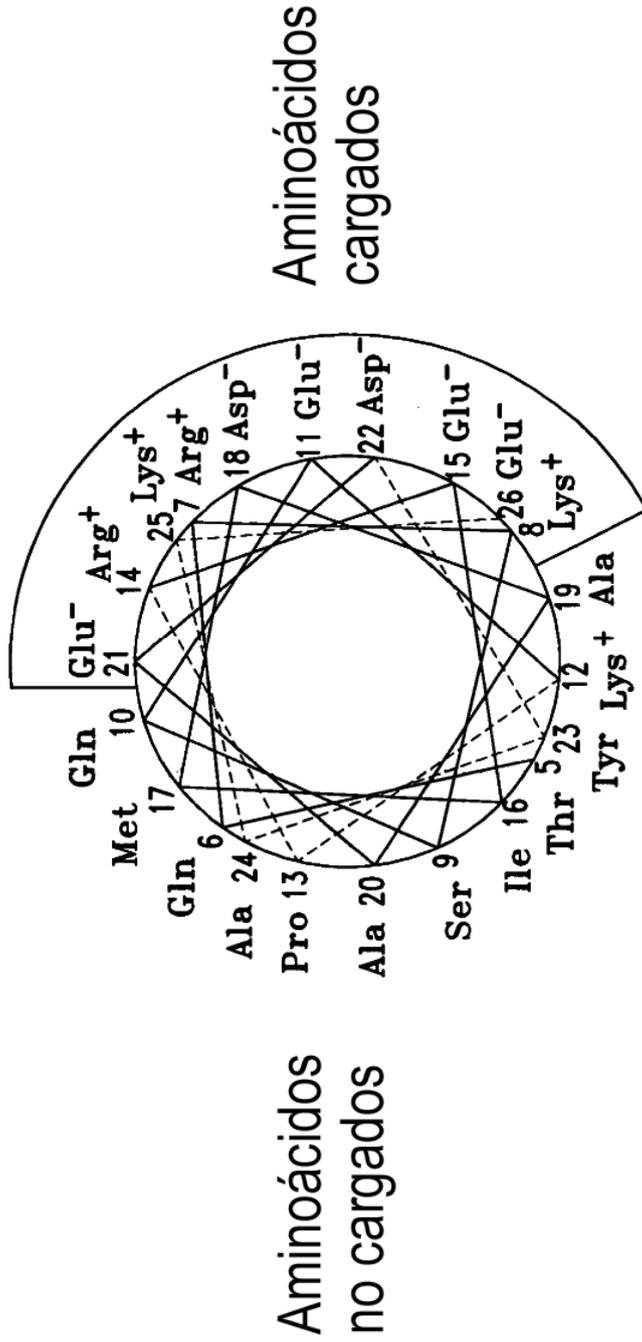


FIG. 10



**DRS humano** MPSASASRKSQEKPREIIMDAEYAKERYGIS  
**DRS de rata** MPSANASRKGQEKPREIVDAEYAKERYGVS  
 \*\*\*\*\*. \*\*\*\*\*: \*\*\*\*\*: \*

FIG. 11

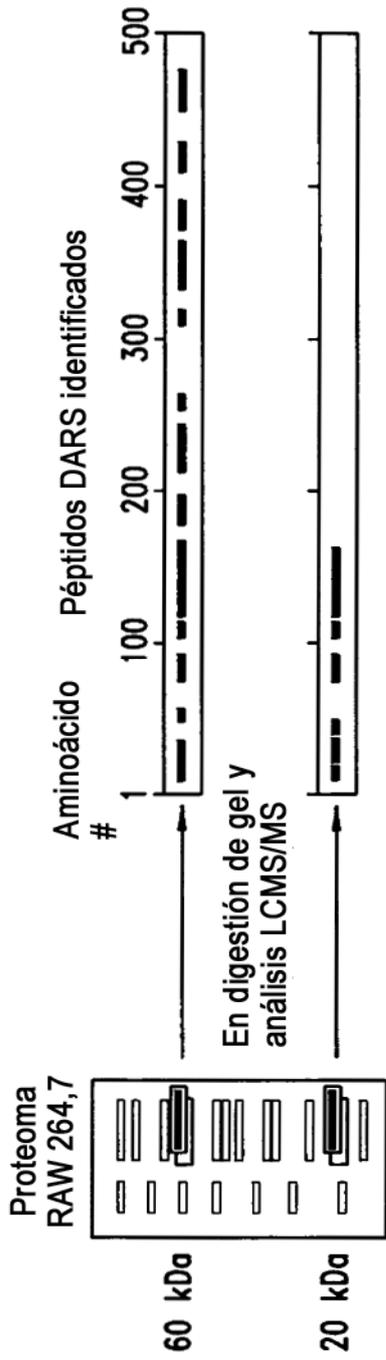


FIG. 12A

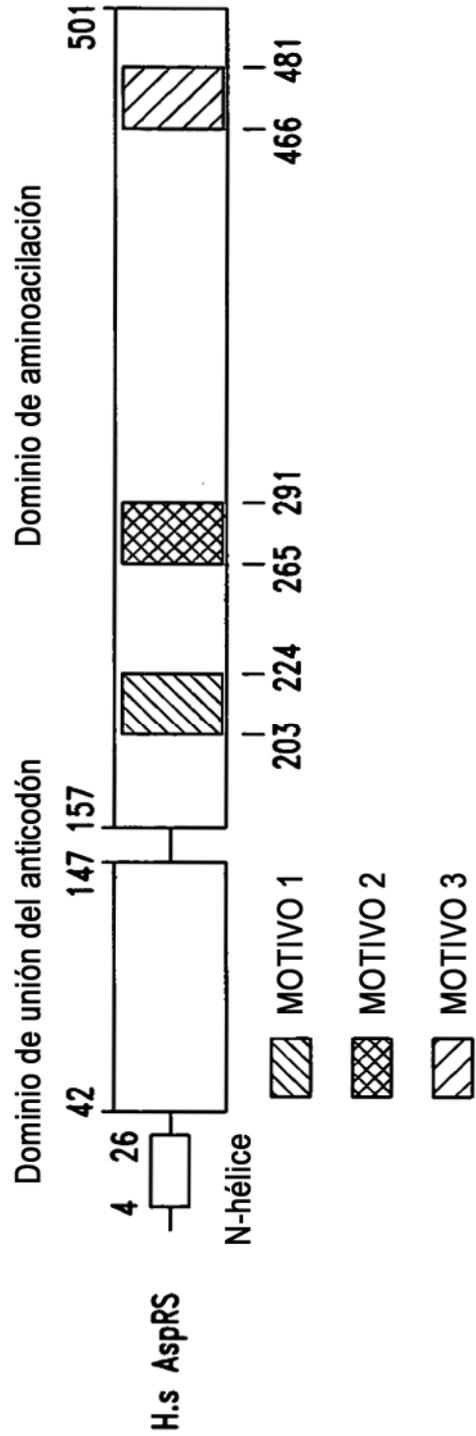
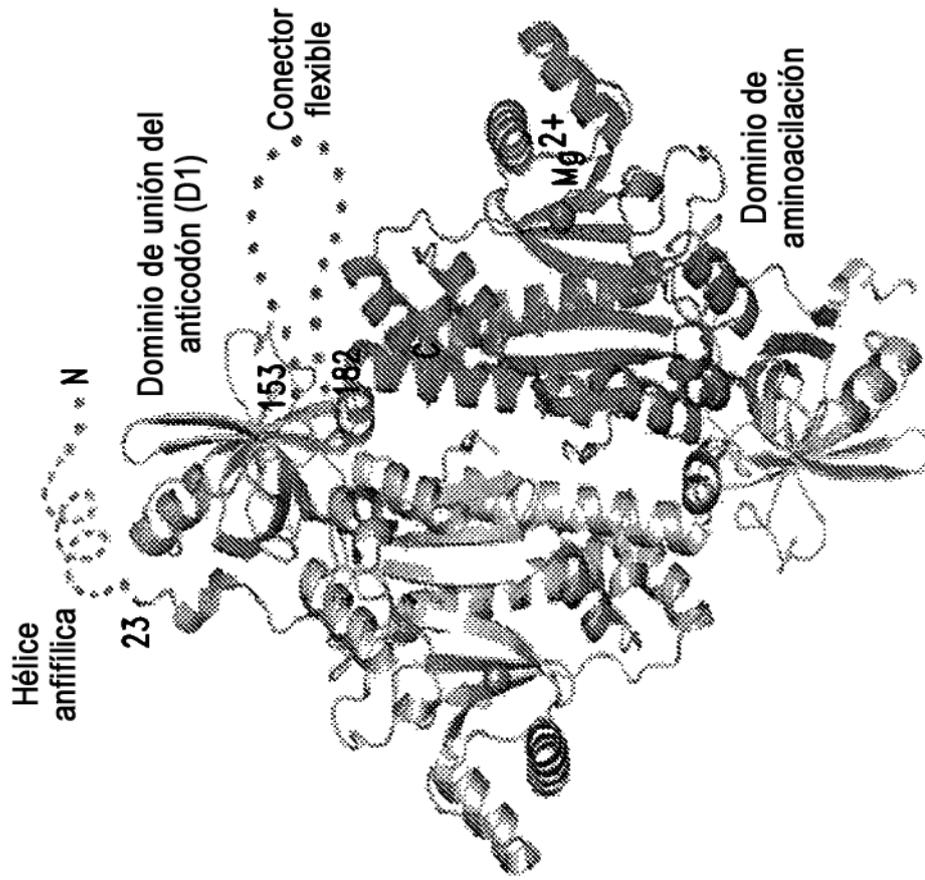


FIG. 12B



*FIG. 12C*

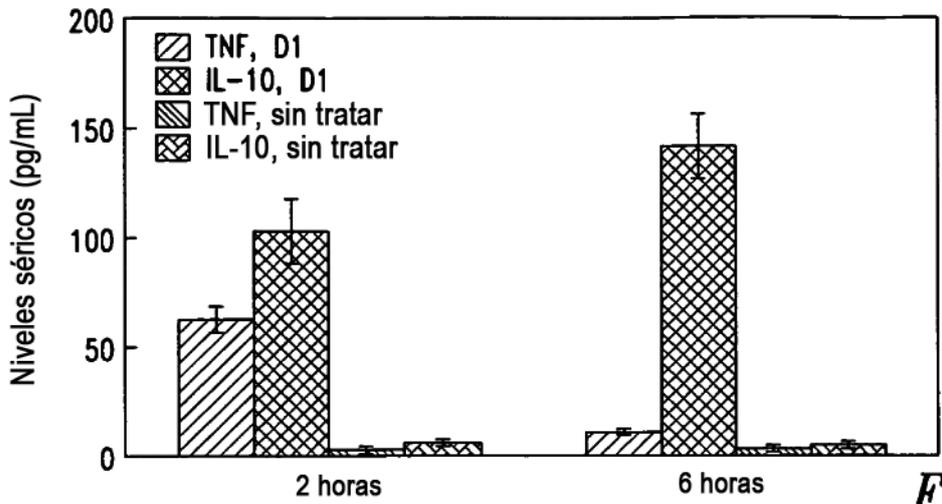


FIG. 13A

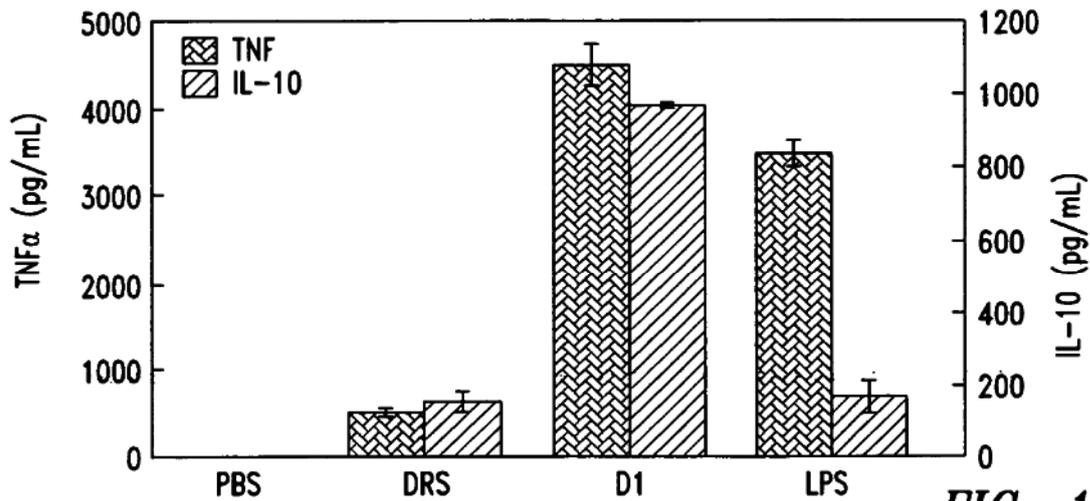


FIG. 13B

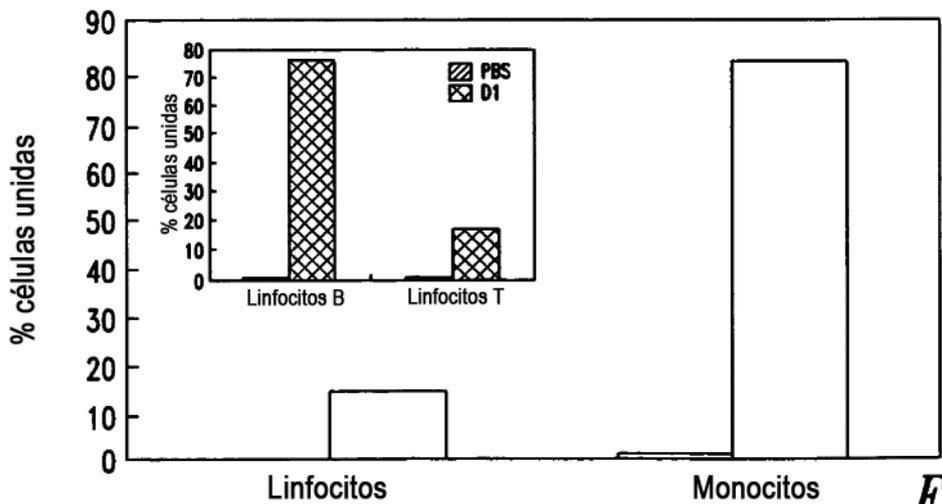
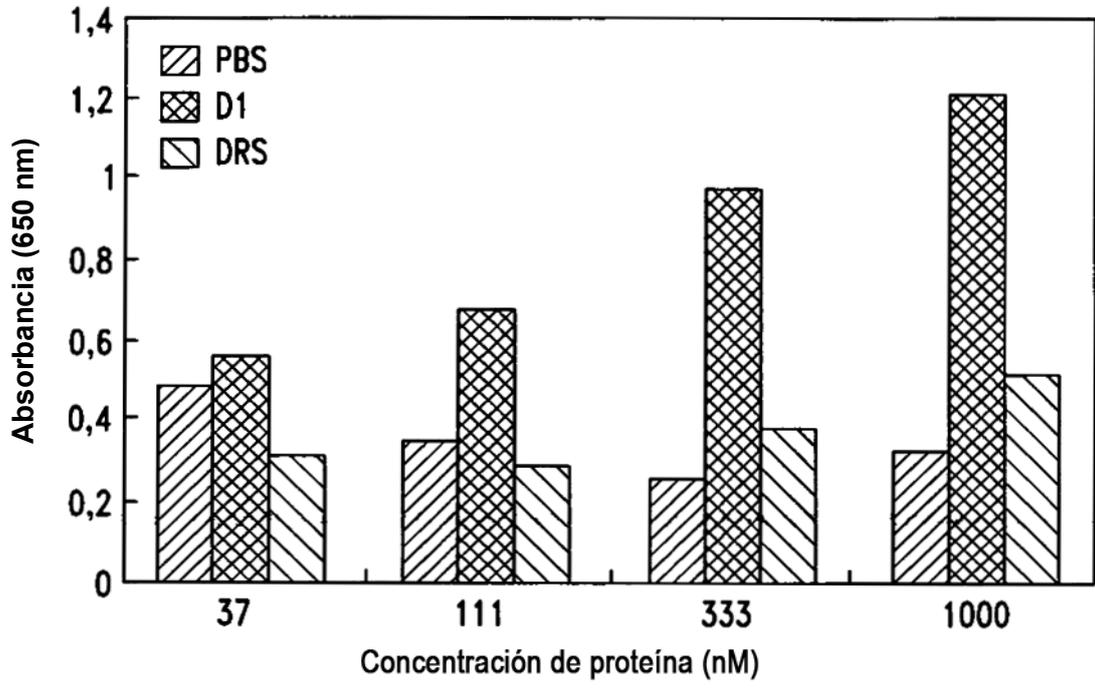


FIG. 13C



**FIG. 14A**

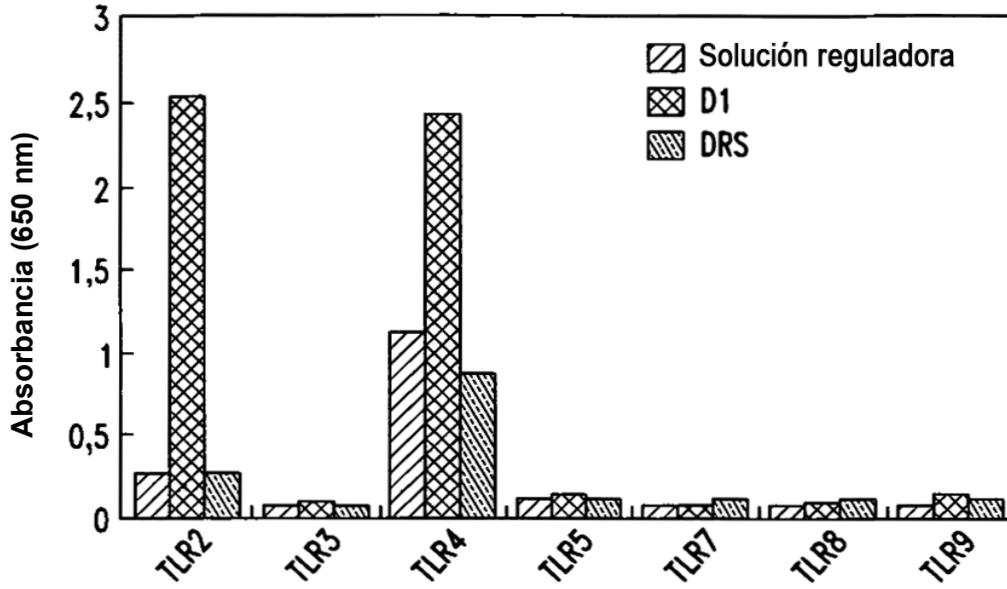


FIG. 14B

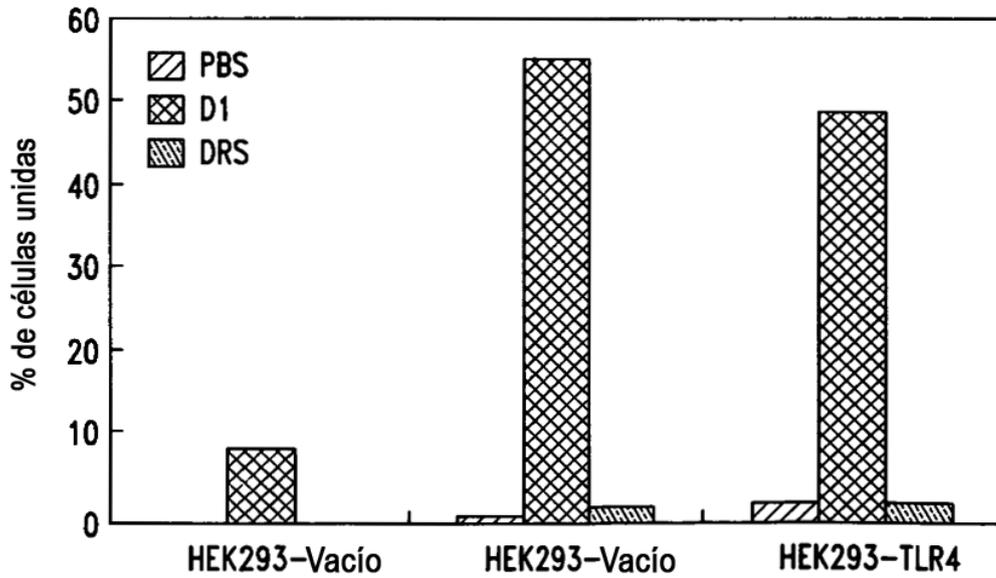


FIG. 14C



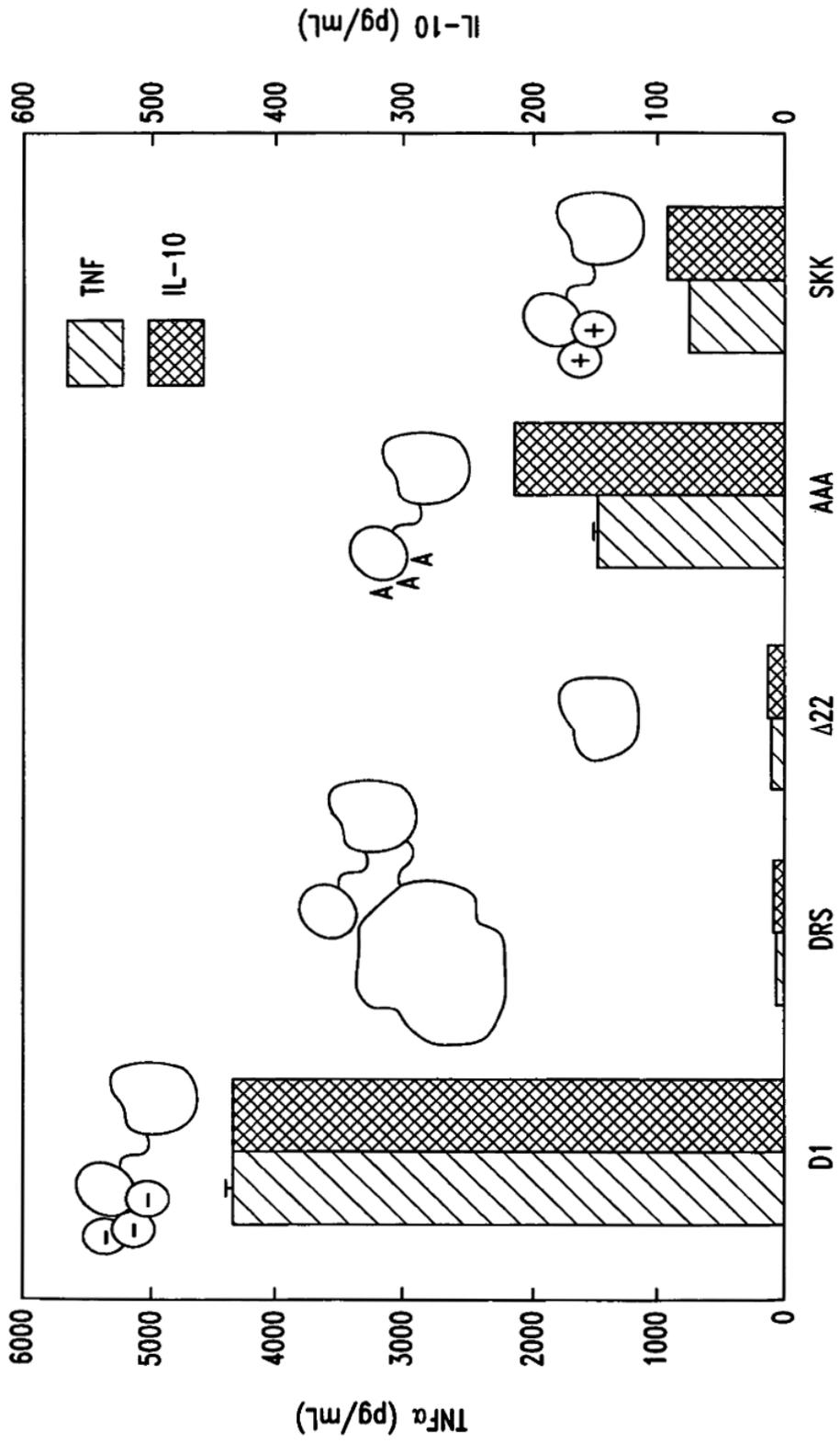
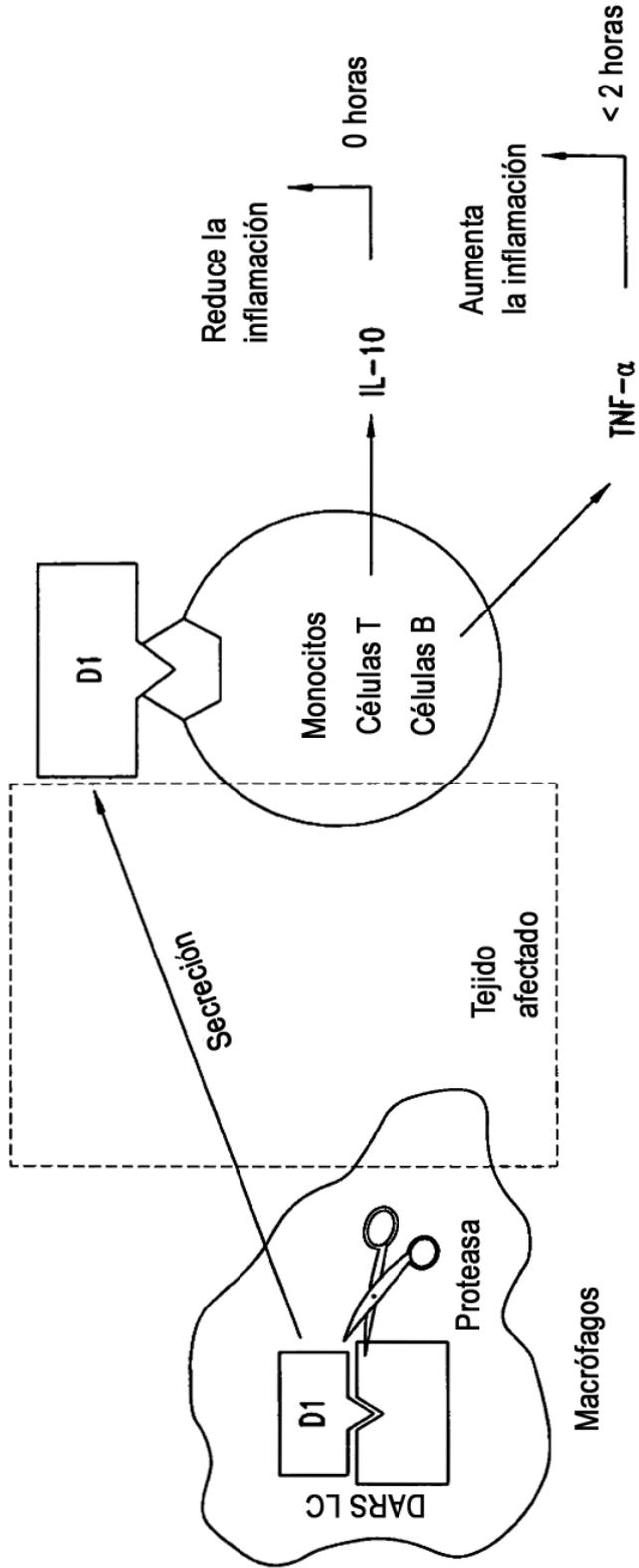
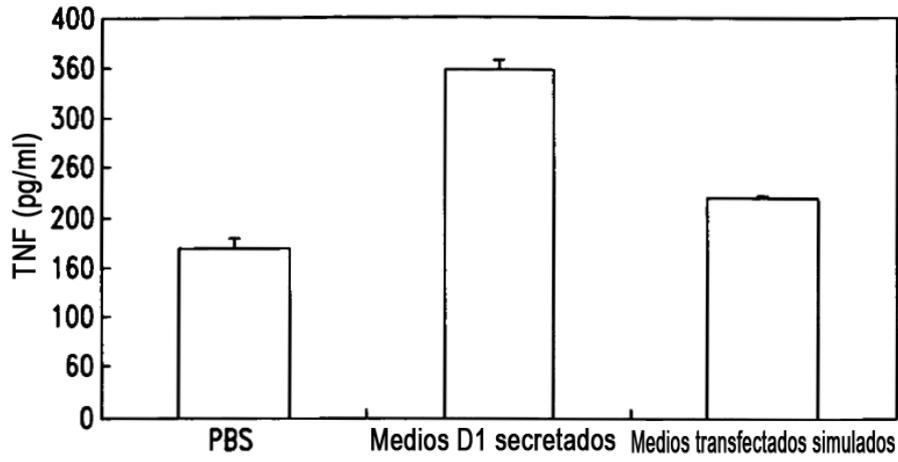


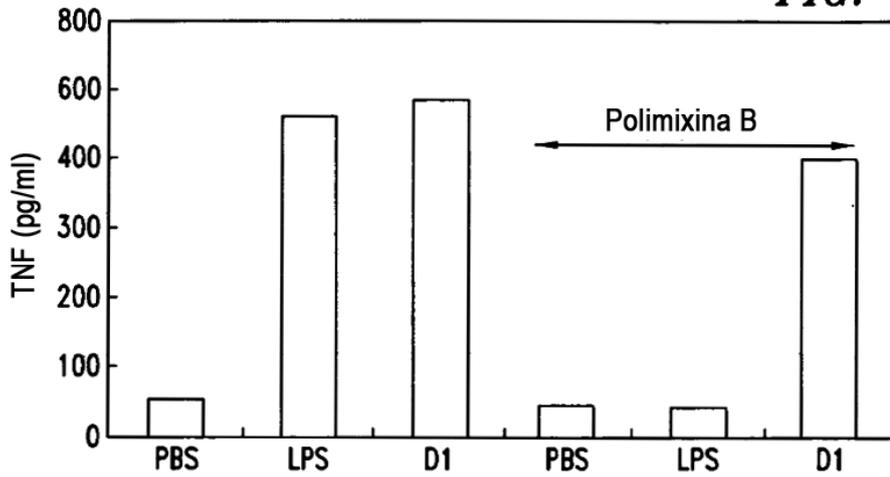
FIG. 15C



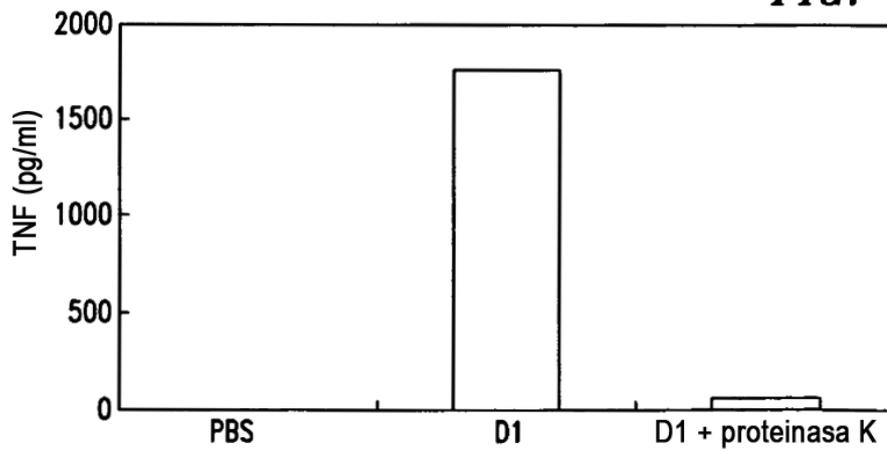
**FIG. 15D**



*FIG. 16A*



*FIG. 16B*



*FIG. 16C*