

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4573238号
(P4573238)

(45) 発行日 平成22年11月4日 (2010. 11. 4)

(24) 登録日 平成22年8月27日 (2010. 8. 27)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 14/00 (2006. 01)

C O 7 K 14/00

C 1 2 N 1/15 (2006. 01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006. 01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 28 (全 281 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-557493 (P2003-557493)
 (86) (22) 出願日 平成14年10月11日 (2002. 10. 11)
 (65) 公表番号 特表2005-514024 (P2005-514024A)
 (43) 公表日 平成17年5月19日 (2005. 5. 19)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/032657
 (87) 国際公開番号 W02003/057134
 (87) 国際公開日 平成15年7月17日 (2003. 7. 17)
 審査請求日 平成17年9月6日 (2005. 9. 6)
 (31) 優先権主張番号 60/328, 624
 (32) 優先日 平成13年10月11日 (2001. 10. 11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/414, 155
 (32) 優先日 平成14年9月27日 (2002. 9. 27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 500049716
 アムジエン・インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・913
 20-1789、サウザンド・オークス、
 ワン・アムジエン・センター・ドライブ (番地なし)
 (74) 代理人 100062007
 弁理士 川口 義雄
 (74) 代理人 100113332
 弁理士 一入 章夫
 (74) 代理人 100114188
 弁理士 小野 誠
 (74) 代理人 100103920
 弁理士 大崎 勝真

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトアンギオポエチン-2の特異的結合物質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 25 のアミノ酸配列を含む、Ang-2 に結合し得るポリペプチドであって、配列番号 25 の Fc のアミノ酸配列が配列番号 60 であるポリペプチド、または生理的に許容されるその塩。

【請求項 2】

配列番号 25 のアミノ酸配列からなる請求項 1 に記載のポリペプチドまたは生理的に許容されるその塩。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

10

【請求項 4】

配列番号 46 に記載されている請求項 3 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

請求項 3 または 4 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 7】

原核細胞である請求項 6 に記載の宿主細胞。

【請求項 8】

大腸菌である請求項 7 に記載の宿主細胞。

20

【請求項 9】

真核細胞である請求項 6 に記載の宿主細胞。

【請求項 10】

有効量の請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドおよび医薬上許容されるその担体とを含む医薬組成物。

【請求項 11】

哺乳動物における血管新生を阻害する医薬の製造における請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドの使用。

【請求項 12】

対象における血管新生の治療のための医薬の製造における請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドの使用。

10

【請求項 13】

哺乳動物において血管新生を調節するための医薬の製造における請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドの使用。

【請求項 14】

哺乳動物において有害な血管新生を特徴とする腫瘍増殖を阻害するための医薬の製造における請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドの使用。

【請求項 15】

哺乳動物におけるガンの治療のための医薬の製造における請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドおよび化学療法剤の使用。

20

【請求項 16】

前記化学療法剤が、5-FU、CPT-11 及びタキソテール (Taxotere) の少なくとも 1 つである、請求項 15 に記載の使用。

【請求項 17】

哺乳類において血管透過性又は血漿漏出の少なくとも 1 つを調節するための医薬の製造における請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドの使用。

【請求項 18】

哺乳類において、眼血管新生疾患、血管芽細胞腫、血管腫、炎症性疾患、慢性炎症性障害、子宮内膜症、新生物性疾患、骨関連疾患、又は乾癬の少なくとも 1 つを治療するための医薬の製造における請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドの使用。

30

【請求項 19】

炎症性疾患が関節炎である請求項 18 に記載の使用。

【請求項 20】

請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドを含む、哺乳類における血管新生を阻害するための医薬組成物。

【請求項 21】

請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドを含む、対象における血管新生を治療するための医薬組成物。

【請求項 22】

請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドを含む、哺乳類における血管新生を調節するための医薬組成物。

40

【請求項 23】

請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドを含む、哺乳動物において有害な血管新生を特徴とする腫瘍増殖を阻害するための医薬組成物。

【請求項 24】

請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドおよび化学療法剤を含む、哺乳動物におけるガンの治療のための医薬組成物。

【請求項 25】

前記化学療法剤が、5-FU、CPT-11 及びタキソテール (Taxotere) の少なくとも 1 つである、請求項 24 に記載の医薬組成物。

50

【請求項 26】

請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドを含む、哺乳類において血管透過性又は血漿漏出の少なくとも 1 つを調節するための医薬組成物。

【請求項 27】

請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドを含む、哺乳類において、眼血管新生疾患、血管芽細胞腫、血管腫、炎症性疾患、慢性炎症性障害、子宮内膜症、新生物性疾患、骨関連疾患、又は乾癬の少なくとも 1 つを治療するための医薬組成物。

【請求項 28】

炎症性疾患が関節炎である請求項 27 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本出願は、その全体が参照してここに組み込まれる、2001 年 10 月 11 日出願の米国特許仮出願通し番号第 60/328,624 号に対する優先権を主張するものである。

【0002】

本発明は、アンギオポエチン-2 (Ang-2) を認識し、アンギオポエチン-2 に結合する特異的結合物質に関する。より明細には、本発明は、Ang-2 に特異的に結合する特異的結合物質及びそのフラグメントの生産、診断的使用及び治療的使用に関する。

【背景技術】

【0003】

20

既存の血管からの新しい血管の形成である血管新生は、多くの生理的及び病的過程にとって不可欠である。通常、血管新生はプロ及び抗血管新生因子によって厳密に調節されているが、癌、眼血管新生疾患、関節炎、及び乾癬などの疾患の場合には、その過程が消失してしまうことがある。Folkman, J., Nat. Med., 1:27-31 (1995)。

【0004】

調節不全の又は有害な血管新生に関連することが知られている多くの疾患が存在する。そのような疾患は、網膜症（糖尿病性網膜症を含む）、加齢性黄斑変性、乾癬、血管芽細胞腫、血管腫、動脈硬化症、リウマチ様又はリウマチ性炎症性疾患などの炎症性疾患、特に関節炎（慢性関節リウマチを含む）、又は慢性喘息、動脈又は移植後アテローム硬化症、子宮内膜症などの他の慢性炎症性疾患、及び新生物性疾患、例えばいわゆる固形腫瘍及び液状（又は造血系）腫瘍（白血病及びリンパ腫など）を含むが、これらに限定されない。有害な血管新生に関連する他の疾患は、当業者には明白である。

30

【0005】

多くのシグナル伝達系が血管新生の調節に関係付けられているが、最も広く特性付けられ且つ最も内皮細胞選択的な系は、Tie-2 受容体チロシンキナーゼ（「Tie-2」又は「Tie-2R」（「ORK」とも称される）と称される；マウス Tie-2 は「tek」とも称される）及びそのリガンドであるアンギオポエチンを含む（Gales, N. W. と Yancopoulos, G. D., Genes Dev. 13:1055-1066 [1999]）。4 つの既知のアンギオポエチンが存在する；アンギオポエチン-1（「Ang-1」）からアンギオポエチン-4（「Ang-4」）まで。これらのアンギオポエチンは「Tie-2 リガンド」とも称される。（Davis, S. ら、Cell, 87:1161-1169 [1996]；Grosios, K. ら、Cytogene t Cell Genet, 84:118-120 [1999]；Holash, J. ら、Investigative Ophthalmology & Visual Science, 42:1617-1625 [1999]；Kobli zek, T. I. ら、Current Biology, 8:529-532 [1998]；Lin, P. ら、Proc Natl Acad Sci USA, 95:8829-8834 [1998]；Maison pierre, P. C. ら、Science, 277:55-60 [1997]；Papapetropoulos, A. ら、Lab Invest, 79:2

40

50

13-223 [1999] ; Sato, T. N. ら、Nature, 375:70-74 [1998] ; Shyu, K. G. ら、Circulation, 98:2081-2087 [1998] ; Suri, C. ら、Cell, 87:1171-1180 [1996] ; Suri, C. ら、Science, 282:468-471 [1998] ; Valenzuela, D. M. ら、Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 96:1904-1909 [1999] ; Witzernbichler, B. ら、J Biol Chem, 273:18514-18521 [1998])。Ang-1のTie-2への結合は培養内皮細胞における受容体リン酸化を刺激するが、Ang-2は、Tie-2受容体リン酸化を作動することと拮抗することの両方が認められている (Davis, S. ら、[1996]、前出; Maisonpierre, P. C. ら、[1997]、前出; Kim, I., J. H. Kim ら、Oncogene 19(39):4549-4552 (2000); Teichert-Kuliszewska, K., P. C. Maisonpierre ら、Cardiovascular Research 49(3):659-70 (2001))。

【0006】

マウスTie-2とAng-1ノックアウトの表現型は類似しており、Ang-1が刺激するTie-2リン酸化は、内皮細胞-支持細胞接着の維持を通して胎内での発生中の脈管のリモデリングと安定化を仲介することを示唆する (Dumont, D. J. ら、Genes & Development, 8:1897-1909 [1994] ; Sato, T. N. ら、Nature, 376:70-74 [1995] ; Suri, C. ら、[1996]、前出)。脈管安定化におけるAng-1の役割は成体において保存されると思われ、Ang-1は成体では広く且つ構成的に発現される (Hanahan, D., Science, 277:48-50 [1997] ; Zagzag, D. ら、Experimental Neurology, 159:391-400 [1999])。これに対し、Ang-2の発現は主として血管リモデリングの部位に限定され、そこでAng-2はAng-1の機能を遮断し、それによって血管新生を助ける血管形成性の状態を誘導すると思われる (Hanahan, D., [1997]、前出; Holash, J. ら、Science, 284:1994-1998 [1999] ; Maisonpierre, P. C. ら、[1997]、前出)。

【0007】

数多くの公表試験が、報告されているところによれば、血管新生に関連した疾患状態における血管選択的Ang-2発現を明らかにしている。これらの病的状態は、例えば乾癬、黄斑変性及び癌を含む (Bunon, G. ら、American Journal of Pathology, 155:1967-1976 [1999] ; Etoh, T. ら、Cancer Research, 61:2145-2153 [2001] ; Hangai, M. ら、Investigative Ophthalmology & Visual Science, 42:1617-1625 [2001] ; Holash, J. ら、[1999]、前出; Kuroda, K. ら、Journal of Investigative Dermatology, 116:713-720 [2001] ; Otani, A. ら、Investigative Ophthalmology & Visual Science, 40:1912-1920 [1999] ; Stratman, A. ら、American Journal of Pathology, 153:1459-1466 [1998] ; Tanaka, S. ら、J Clin Invest, 103:34-345 [1999] ; Yoshida, Y. ら、International Journal of Oncology, 15:1221-1225 [1999] ; Yuan, K. ら、Journal of Periodontal Research, 35:165-171 [2001] ; Zagzag, D. ら、[1999]、前出)。これらの試験の大半が癌に焦点を合わせており、多くの腫瘍型が血管Ang-2発現を提示すると思われる。病的血管新生におけるその発現と異なり、正常組織でのAng

10

20

30

40

50

Ang-2発現は極めて限られている (Maisonpierre, P. C. ら、[1997]、前出; Mezquita, J. ら、Biochemical and Biophysical Research Communications, 260: 492-498 [1991])。健常成人では、血管新生の3つの主要部位は卵巣、胎盤及び子宮である; これらは、Ang-2 mRNAが検出される正常 (すなわち非癌性) 組織の中の主要組織である。

【0008】

一部の機能試験は、Ang-2が腫瘍血管新生に関与することを示唆している。Ahmadら (Cancer Res., 61: 1255-1259 [2001]) はAng-2の過剰発現を述べており、報告によれば、それがマウス異種移植モデルにおける腫瘍増殖の上昇に結びつくことを示している。報告によればAng-2の過剰発現を腫瘍の血管分布過多に結びつけるデータを提示している、EtOHら、前出及びTanakaら、前出も参照のこと。しかし、一方で、Yuら (Am. J. Path., 158: 563-570 [2001]) は、ルイス肺癌腫及びTA3乳癌細胞におけるAng-2の過剰発現が、対応する形質転換体を注入したマウスの生存を延長させたことを示すデータを報告している。

【0009】

この数年間に、様々な公表文献が抗癌治療のための可能性のある標的としてAng-1、Ang-2及び/又はTie-2を示唆してきた。例えば、米国特許第6, 166, 185号、5, 650, 490号及び5, 814, 464号は各々、抗Tie-2リガンド抗体及び受容体の概念を開示している。Linら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 8829-8834 [1998]) は、可溶性Tie-2を発現するアデノウイルスをマウスに注入した; 可溶性Tie-2は、報告によればマウスによって発現される腫瘍の数と大きさを低下させた。関連する試験では、Linら (J. Clin. Invest., 100: 2072-2078 [1997]) は可溶性形態のTie-2をラットに注入した; この化合物は、報告によればラットにおいて腫瘍の大きさを低減した。Siemeisterら (Cancer Res., 59: 3185-3189 [1999]) は、Tie-2の細胞外ドメインを発現するヒト黒色腫細胞系を生成し、これらの細胞系をヌードマウスに注入して、可溶性Tie-2は腫瘍増殖及び腫瘍血管新生の「有意の阻害」をもたらすと結論した。この情報に鑑みて、及びAng-1とAng-2の両方がTie-2に結合すると仮定して、Ang-1、Ang-2又はTie-2が抗癌治療のための魅力的な標的であるかどうかはこれらの試験からは明らかでない。

【0010】

該分子の半減期を改善するための、Ig定常領域などの安定な血漿タンパク質へのある種のペプチドの融合が、例えば、2000年5月4日公開のPCT特許公開公報WO00/24782号に述べられている。

【0011】

該分子の半減期を改善するための、Ig定常領域などの安定な血漿タンパク質への他又はそのフラグメントの融合は様々な記述されている (例えば、米国特許第5, 480, 981号; Zhengら、J. Immunol., 154: 5590-5600 (1995); Fisherら、N. Engl. J. Med., 334: 1697-1702 (1996); Van Zee, K. ら、J. Immunol., 156: 2221-2230 (1996); 1998年9月15日発行の米国特許第5, 808, 029号; Caponら、Nature, 337: 525-531 (1989); Harvillら、Immunotech., 1: 95-105 (1995); 1997年7月3日公開のWO97/23614号; 1997年12月11日出願のPCT/US97/23183号; Linsley, J. Exp. Med., 174: 561-569 (1991); 1995年8月10日公開のWO95/21258号参照)。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

大部分の固形腫瘍は直径1mmから2mmを超えて増殖するためには新生血管形成を必要とするので、有効な抗Ang-2治療は膨大な癌患者群に恩恵をもたらす。そのような治療は、網膜症、関節炎及び乾癬などの他の血管新生関連疾患においても、より広い適用を有すると考えられる。

【0013】

Ang-2を特異的に認識し、結合する新しい物質を特定することへの未開発の必要性が存在する。そのような物質は、Ang-2活性に関連した疾患状態における診断スクリーニング及び治療処置のために有用である。

【0014】

それ故、Ang-2活性を調節する、Ang-2の特異的結合物質を提供することが本発明の目的である。本発明のそのような物質は、ペプチド（peptid body）、すなわち、そのペプチド部分がAng-2に特異的に結合する、抗体のFcドメインなどの他の分子に融合したペプチドの形態をとる。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明は、1つの実施形態では、Ang-2に結合するペプチド（ここではポリペプチドとも称する）を対象とする。また、そのようなペプチドの変異体及び誘導体も本発明に包含される。

【0016】

もう1つの実施形態では、本発明のペプチド及びその変異体及び誘導体はビヒクルに結合している。

【0017】

もう1つの実施形態では、該ペプチドはFcドメインに融合していてもよく、それによってペプチドを提供しうる。任意に、該ペプチドは、例えば配列番号3から配列番号6、又は配列番号76から配列番号157、ならびにそれらの変異体及び誘導体の少なくとも1個のペプチドを含む。さらに、該ペプチドは、配列番号65から配列番号75、及び配列番号158に示されている式に従った少なくとも1個のペプチドを含みうる。

【0018】

さらにもう1つの実施形態では、本発明は、前記特異的結合物質、及びその変異体及び誘導体をコードする核酸分子を提供する。

【0019】

さらにもう1つの実施形態では、本発明は、該ペプチド、ならびにその変異体及び誘導体をコードする核酸分子を提供する。任意に、そのような核酸分子は配列番号33から配列番号53を含む。

【0020】

さらにもう1つの実施形態では、本発明は、本発明の特異的結合物質の有効量を、それを必要とする被験対象に投与することにより、腫瘍を低減する方法を提供する。本発明はまた、本発明の特異的結合物質の有効量を、それを必要とする被験対象に投与することを含む、被験対象において血管新生を阻止する方法を提供する。本発明はさらに、本発明の特異的結合物質の有効量を、それを必要とする被験対象に投与することを含む、被験対象において癌を治療する方法を提供する。

【0021】

本発明はまた、アミノ酸配列WD PWT（配列番号65）を含み、5-50アミノ酸の長さであって、Ang-2に結合することができるポリペプチド、ならびに生理的に許容されるその塩に関する。前記ポリペプチドはまた、アミノ酸配列：

WD PWT C（配列番号66）

及び生理的に許容されるその塩を含みうる。加えて、前記ポリペプチドは、アミノ酸配列：

C z² WD PWT（配列番号67）

10

20

30

40

50

[式中、 z^2 は酸性又は中性の極性アミノ酸残基である]、及び生理的に許容されるその塩を含みうる。前記ポリペプチドはさらに、アミノ酸配列：

C z^2 W D P W T C (配列番号 68)

[式中、 z^2 は酸性又は中性の極性アミノ酸残基である]、及び生理的に許容されるその塩

を含みうる。

【0022】

もう1つの実施形態では、本発明は、式：

$a^1 a^2 a^3 C a^5 W D P W T C a^{12} a^{13} a^{14}$ (配列番号 69)

[式中、

a^1 、 a^2 及び a^3 は、各々独立してアミノ酸残基であり；

a^5 は、アミノ酸残基であり；

a^{12} は、存在しないか又はアミノ酸残基であり；

a^{13} は、存在しないか又は中性疎水性、中性極性若しくは塩基性アミノ酸残基であり

；

a^{14} は、中性疎水性又は中性極性アミノ酸残基である]

のアミノ酸配列を含む、Ang-2 に結合することができるポリペプチド、及び生理的に許容されるその塩に関する。好ましい実施形態では：

a^1 は、V、I、P、W、G、S、Q、N、E、K、R 又は H であり；

a^2 は、V、P、M、G、S、Q、D、E、K、R 又は H であり；

a^3 は、A、V、P、M、F、T、G、D、E、K 又は H であり；

a^5 は、A、V、G、Q、N、D 又は E であり；

a^{12} は、S、Q、N、D、E、K 又は R であり；

a^{13} は、L、T 又は H であり；

a^{14} は、V、L、I、W 又は M である。

【0023】

より好ましい実施形態では、 a^1 は Q であり； a^2 は E であり； a^3 は E であり； a^5 は D 又は E であり； a^{12} は D 又は E であり； a^{13} は H であり；及び a^{14} は M である。

。

【0024】

ここでの小文字とその上付き数字 (a^1 及び b^1 など) の使用はアミノ酸の位置を特定することを意図しており、所与のアミノ酸についての1文字略語を示すことを意図しないことは明白である。1文字アミノ酸略語はここでは大文字で表わす。

【0025】

本発明はさらに、式：

$b^1 b^2 b^3 b^4 b^5 b^6 C b^8 W D P W T C b^{15} b^{16} B^{17} b^{18} b^{19} b^{20}$
(配列番号 70)

[式中、

b^1 は、存在しないか又はアミノ酸残基であり；

b^2 は、存在しないか又は中性疎水性、中性極性又は塩基性アミノ酸残基であり；

b^3 、 b^4 、 b^5 及び b^6 は、各々独立して存在しないか又はアミノ酸残基であり；

b^8 は、アミノ酸残基であり；

b^{15} は、存在しないか又はアミノ酸残基であり；

b^{16} は、存在しないか又は中性疎水性、中性極性若しくは塩基性アミノ酸残基であり

；

b^{17} は、存在しないか又は中性疎水性若しくは中性極性アミノ酸残基であり；

b^{18} 、 b^{19} 及び b^{20} は、各々独立して存在しないか又はアミノ酸残基である]

のアミノ酸配列を含む、Ang-2 に結合することができるポリペプチド、及び生理的に許容されるその塩に関する。好ましい実施形態では：

b^1 は、存在しないか又は A、V、L、P、W、F、T、G、S、Q、N、K、R 又は

Hであり；

b² は、存在しないか又はA、V、L、I、P、W、M、T、G、S、Y、N、K、R
又はHであり；

b³ は、存在しないか又はA、L、I、P、W、M、T、G、S、Q、N、E、R又は
Hであり；

b⁴ は、V、I、P、W、G、S、Q、N、E、K、R又はHであり；

b⁵ は、V、P、M、G、S、Q、D、E、K、R又はHであり；

b⁶ は、A、V、P、M、F、T、G、D、E、K又はHであり；

b⁸ は、A、V、G、Q、N、D又はEであり；

b¹⁵ は、S、Q、N、D、E、K又はRであり；

b¹⁶ は、L、T又はHであり；

b¹⁷ は、V、L、I、W又はMであり；

b¹⁸ は、存在しないか又はA、V、L、P、W、F、T、G、Y、Q、D、E又はR
であり；

b¹⁹ は、存在しないか又はV、L、I、P、T、G、S、Y、Q、N、D、E又はR
であり；及び、

b²⁰ は、存在しないか又はV、L、P、W、M、T、G、S、Y、Q、N、D、K又
はRである。

【0026】

より好ましい実施形態では、b¹ は存在しないか又はP又はTであり；b² は存在しな
いか又はI又はNであり；b³ は存在しないか又はR又はIであり；b⁴ はQであり；b⁵
はEであり；b⁶ はEであり；b⁸ はD又はEであり；b¹⁵ はD又はEであり；b¹⁶
はHであり；b¹⁷ はMであり；b¹⁸ は存在しないか又はW又はPであり；b¹⁹ は
存在しないか又はG又はEであり；及びb²⁰ は存在しないか、V又はKである。

【0027】

本発明が、好ましくは、配列番号4、及び配列番号76から配列番号118（両端を含
む）から成る群より選択される少なくとも1個のアミノ酸配列を含み、Ang-2に結合
することができるポリペプチド、ならびに生理的に許容されるその塩にかんすることも明
白である。それらのペプチド配列を下記に示す：

【0028】

10

20

30

【表 1】

ペプチド	配列番号	ペプチド配列
Con4-44	76	PIRQEECDWDPWTCEHMWEV
Con4-40	77	TNIQEECEWDPWTCDHMPGK
Con4-4	78	WYEQDACEWDPWTCEHMAEV
Con4-31	79	NRLQEVCEWDPWTCEHMENV
Con4-C5	80	AATQEECEWDPWTCEHMPRS
Con4-42	81	LRHQEGCEWDPWTCEHMFWD
Con4-35	82	VPRQKDCWDPWTCEHMYVG
Con4-43	83	SISHEECEWDPWTCEHMQVG
Con4-49	84	WAAQEECEWDPWTCEHMGRM
Con4-27	85	TWPQDKCEWDPWTCEHMGST
Con4-48	86	GHSQEECGWDPWTCEHMGTS
Con4-46	87	QHWQEECEWDPWTCDHMPSK
Con4-41	88	NVRQEKCEWDPWTCEHMPVR
Con4-36	89	KSGQVECNWDPWTCEHMPRN
Con4-34	90	VKTQEHCDWDPWTCEHMREW
Con4-28	91	AWGQEGCDWDPWTCEHMLPM
Con4-39	92	PVNQEDCEWDPWTCEHMPPM
Con4-25	93	RAPQEDCEWDPWTCAHMDIK
Con4-50	94	HGQNMECEWDPWTCEHMFY
Con4-38	95	PRLQEECVWDPWTCEHMPLR
Con4-29	96	RTTQEKCEWDPWTCEHMESQ
Con4-47	97	QTSQEDCVWDPWTCDHMOVSS
Con4-20	98	QVIGRPCEWDPWTCEHLEGL
Con4-45	99	WAQQEECAWDPWTCDHMOVGL
Con4-37	100	LPGQEDCEWDPWTCEHMOVRS
Con4-33	101	PMNQVECDWDPWTCEHMPRS
AC2-Con4	102	FGWSHGCEWDPWTCEHMGST
Con4-32	103	KSTQDDCDWDPWTCEHMOVGP
Con4-17	104	GPRISTCQWDPWTCEHMDQL
Con4-8	105	STIGDMCEWDPWTCAHMQVD
AC4-Con4	106	VLGGQGCEWDPWTCRLLQGW
Con4-1	107	VLGGQGCQWDPWTCSHLEDG

10

20

30

40

Con4-C1	108	TTIGSMCEWDPWTCAHMQGG
Con4-21	109	TKGKSVCQWDPWTCSHMQSG
Con4-C2	110	TTIGSMCQWDPWTCAHMQGG
Con4-18	111	WVNEVVCEWDPWTCNHWDTP
Con4-19	112	VVQVGMCQWDPWTCKHMLRQ
Con4-16	113	AVGSQTCEWDPWTCAHLVEV
Con4-11	114	QGMKMFCEWDPWTCAHIVYR
Con4-C4	115	TTIGSMCQWDPWTCEHMQGG
Con4-23	116	TSQRVGCEWDPWTCQHLYT
Con4-15	117	QWSWPPCEWDPWTCQTVWPS
Con4-9	118	GTSPSFCQWDPWTCSHMQG
TN8-Con4*	4	QEECEWDPWTCEHM

10

*一部のペプチド及び／又はペプチ体は接頭辞「TN」、「TN8」又は「TN12」をフラグメント含みうることであり、及びこの接頭辞は所与のペプチ体に関して存在してもよく又は存在しなくてもよいことは明白である。従って、例えば「TN8-Con4」及び「Con4」の語はここでは交換可能に使用される。

20

【0029】

もう1つの実施形態では、本発明は、式：

$$(X^1)_a - F^1 - (X^2)_b$$

[式中、

F^1 は、ビヒクルであり；

X^1 及び X^2 は、各々独立して：

－ $(L^1)_c - P^1$ であり；

－ $(L^1)_c - P^1 - (L^2)_d - P^2$ であり；

－ $(L^1)_c - P^1 - (L^2)_d - P^2 - (L^3)_e - P^3$ であり；及び、

－ $(L^1)_c - P^1 - (L^2)_d - P^2 - (L^3)_e - P^3 - (L^4)_f - P^4$ であり

30

；

[式中、 P^1 、 P^2 、 P^3 及び P^4 の1個又はそれ以上は、各々独立してここで述べるポリペプチドを含む]

から選択される]

を有する物質及びその多量体の組成物に関する。例えば、好ましい実施形態では、 P^1 、 P^2 、 P^3 及び P^4 は、各々独立して、配列番号3から配列番号6、及び／又は配列番号76から配列番号157のポリペプチドを含みうる。

【0030】

もう1つの実施形態では、前記組成物は、式：

$$X^1 - F^1$$

40

又は、

$$F^1 - X^2$$

及び生理的に許容されるその塩であり、式中、 X^1 、 F^1 及び X^2 はここで定義するとおりである。もう1つの実施形態では、前記組成物は、式：

$$F^1 - (L^1)_c - P^1$$

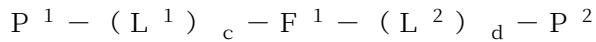
及びその生理的に許容されるその塩であり、式中、 L^1 、 F^1 及び P^1 はここで定義するとおりである。さらにもう1つの実施形態では、前記組成物は、式：

$$F^1 - (L^1)_c - P^1 - (L^2)_d - P^2$$

及び生理的に許容されるその塩であり、式中、 L^1 、 F^1 、 P^1 、 P^2 、及び c 及び d は

50

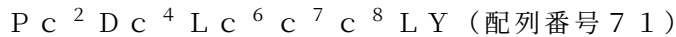
ここで定義するとおりである。さらにもう 1 つの実施形態では、前記組成物は、式：



及び生理的に許容されるその塩である。好ましい実施形態では、 F^1 は F_c ドメイン又はそのフラグメントである。

【0031】

本発明はさらに、式：



[式中、

c^2 は、中性疎水性アミノ酸残基であり；

c^4 は、A、D 又は E であり；

c^6 は、酸性アミノ酸残基であり；

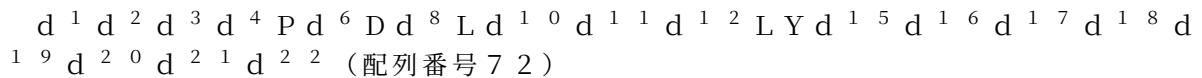
c^7 は、アミノ酸残基であり；及び

c^8 は、中性疎水性、中性極性又は塩基性アミノ酸残基である]

のアミノ酸配列を含む、Ang-2 に結合することができるポリペプチド、及び生理的に許容されるその塩に関する。好ましい実施形態では、 c^2 は L 又は M である。もう 1 つの好ましい実施形態では、 c^6 は D 又は E である。

【0032】

本発明はさらに、式：



[式中、

d^1 は、存在しないか又はアミノ酸残基であり；

d^2 は、存在しないか又は中性極性、酸性若しくは塩基性アミノ酸残基であり；

d^3 は、存在しないか又は中性疎水性若しくは中性極性アミノ酸残基であり；

d^4 は、存在しないか又はアミノ酸残基であり；

d^6 は、中性疎水性アミノ酸残基であり；

d^8 は、A、D 又は E であり；

d^{10} は、酸性アミノ酸残基であり；

d^{11} は、アミノ酸残基であり；

d^{12} は、中性疎水性、中性極性又は塩基性アミノ酸残基であり；

d^{15} は、存在しないか又は中性疎水性、酸性若しくは塩基性アミノ酸残基であり；

d^{16} は、存在しないか又は中性極性、酸性若しくは塩基性アミノ酸残基であり；

d^{17} は、存在しないか又は中性疎水性若しくは中性極性アミノ酸残基であり；

d^{18} は、存在しないか又は中性疎水性若しくは中性極性アミノ酸残基であり；

d^{19} は、存在しないか又は中性疎水性、中性極性若しくは塩基性アミノ酸残基であり

；

d^{20} は、存在しないか又はアミノ酸残基であり；

d^{21} は、存在しないか又は中性極性、酸性若しくは塩基性アミノ酸残基であり；

d^{22} は、存在しないか又は中性疎水性、中性極性若しくは塩基性アミノ酸残基である

]

のアミノ酸配列を含む、Ang-2 に結合することができるポリペプチド、及び生理的に許容されるその塩に関する。好ましい実施形態では：

d^1 は、T、S、Q、R 又は H であり；

d^2 は、T、Q、N 又は K であり；

d^3 は、F であり；

d^4 は、M、Q、E 又は K であり；

d^6 は、L 又は M であり；

d^8 は、D 又は E であり；

d^{10} は、E であり；

d^{11} は、Q 又は E であり；

10

20

30

40

50

$d^{1\ 2}$ は、T又はRであり；

$d^{1\ 5}$ は、Y，D，E又はKであり；

$d^{1\ 6}$ は、Qであり；

$d^{1\ 7}$ は、W又はFであり；

$d^{1\ 8}$ は、L，I，M又はTであり；

$d^{1\ 9}$ は、L，F又はYであり；

$d^{2\ 0}$ は、Q，D又はEであり；

$d^{2\ 1}$ は、存在しないか、Q又はHであり；

$d^{2\ 2}$ は、存在しないか、A，L，G，S又はRであり；

好ましい実施形態では、前記ポリペプチドは、配列番号6、及び配列番号119から配列番号142（両端を含む）から成る群より選択される少なくとも1個のアミノ酸配列を含み、Ang-2に結合することができる。配列番号6、及び配列番号119から配列番号142を下記に示す：

【0033】

【表 2】

ペプチド	配列番号	ペプチド配列
L1-1	119	QNYKPLDELDAATLYEHFIFHYT
L1-2	120	LNFTPLDELEQTLYEQWTLQQS
L1-3	121	TKFNPLDELEQTLYEQWTLQHQ
L1-4	122	VKFKPLDALEQTLYEHWMFQQA
L1-5	123	VKYKPLDELDEILYEQQTFQER
L1-7	124	TNFMPPMDDLEQRLYEQFILQQG
L1-9	125	SKFKPLDELEQTLYEQWTLQHA
L1-10	126	QKFQPLDELEQTLYEQFMLQQA
L1-11	127	QNFKPMDELEDTLYKQFLFQHS
L1-12	128	YKFTPLDDLEQTLYEQWTLQHV
L1-13	129	QEYEPLDELDETLYNQWMFHQR
L1-14	130	SNFMPLDELEQTLYEQFMLQHQ
L1-15	131	QKYQPLDELDKTLYDQFMLQQG
L1-16	132	QKFQPLDELEETLYKQWTLQQR
L1-17	133	VKYKPLDELDEWLYHQFTLHHQ
L1-18	134	QKFMPLDELDEILYEQFMFQQS
L1-19	135	QTFQPLDDLEEYLYEQWIRRYH
L1-20	136	EDYMPLDALDAQLYEQFILLHG
L1-21	137	HTFQPLDELEETLYYQWLYDQL
L1-22	138	YKFNPMDELEQTLYEEFLFQHA
AC6-L1	139	TNYKPLDELDAATLYEHWILQHS
L1-C1	140	QKFQPLDELEQTLYEQWTLQQR
L1-C2	141	TKFQPLDELDDQTLYEQWTLQQR
L1-C3	142	TNFQPLDELDDQTLYEQWTLQQR
L1	6	KFNPLDELEETLYEQFTFQQ

【0034】

本発明はまた、式：

$$RPe^3e^4e^5e^6e^7G \text{ (配列番号 73)}$$

〔式中、

 e^3 は、中性極性アミノ酸残基であり；

 e^4 は、酸性アミノ酸残基であり；

 e^5 は、中性極性又は酸性アミノ酸残基であり；

 e^6 は、中性疎水性アミノ酸残基であり；

 e^7 は、中性疎水性アミノ酸残基である〕

の amino 酸配列を含む、Ang-2 に結合することができるポリペプチド、及び生理的に許容されるその塩に関する。好ましい実施形態では、 e^3 は Y 又は C である。もう 1 つの

10

20

30

40

50

好ましい実施形態では、 e^4 は D 又は E である。さらにもう 1 つの好ましい実施形態では、 e^6 は I 又は M である。

【0035】

本発明はさらに、式：

$f^1 f^2 f^3 f^4 R P f^7 f^8 f^9 f^{10} f^{11} G f^{13} f^{14} f^{15} f^{16} f^{17} f^{18} f^{19} f^{20}$ (配列番号 74)

[式中、

f^1 は、中性疎水性又は中性極性アミノ酸残基であり；

f^2 は、中性疎水性又は中性極性アミノ酸残基であり；

f^3 は、中性極性又は酸性アミノ酸残基であり；

10

f^4 は、中性疎水性又は中性極性アミノ酸残基であり；

f^7 は、中性極性アミノ酸残基であり；

f^8 は、酸性アミノ酸残基であり；

f^9 は、中性極性又は酸性アミノ酸残基であり；

f^{10} は、中性疎水性アミノ酸残基であり；

f^{11} は、中性疎水性アミノ酸残基であり；

f^{13} は、中性疎水性又は中性極性アミノ酸残基であり；

f^{14} は、中性疎水性又は中性極性アミノ酸残基であり；

f^{15} は、中性極性アミノ酸残基であり；

f^{16} は、中性極性アミノ酸残基であり；

20

f^{17} は、中性極性又は酸性アミノ酸残基であり；

f^{18} は、中性疎水性又は塩基性アミノ酸残基であり；

f^{19} は、中性疎水性又は中性極性アミノ酸残基であり；及び

f^{20} は、中性疎水性又は中性極性アミノ酸残基である]

のアミノ酸配列を含む、Ang-2 に結合することができるポリペプチド、及び生理的に許容されるその塩に関する。好ましい実施形態では、

f^1 は、S、A 又は G であり；

f^2 は、G、Q 又は P であり；

f^3 は、Q、G 又は D であり；

f^4 は、L、M 又は Q であり；

30

f^7 は、C 又は Y であり；

f^8 は、E 又は D であり；

f^9 は、E、G 又は D であり；

f^{10} は、I 又は M であり；

f^{11} は、F 又は L であり；

f^{13} は、C 又は W であり；

f^{14} は、G 又は P であり；

f^{15} は、T 又は N であり；

f^{16} は、Q、Y 又は K であり；

f^{17} は、N、D 又は Q であり；

40

f^{18} は、L、V、W 又は R であり；

f^{19} は、A、Q、Y 又は I であり；及び、

f^{20} は、L、A、G 又は V である。

【0036】

より好ましい実施形態では、本発明は、配列番号 3、及び配列番号 143 から配列番号 148 (両端を含む) から成る群より選択される少なくとも 1 個のアミノ酸配列を含み、Ang-2 に結合することができるポリペプチド、及び生理的に許容されるその塩に関する。配列番号 3、及び配列番号 143 から配列番号 148 は下記の通りである。

【0037】

【表 3】

ペプチド	配列番号	配列
Con1-1	143	AGGMRPYDGMLGWPNYDVQA
Con1-2	144	QTWDDPCMHLGPVTWRRCI
Con1-3	145	APGQRPYDGMLGWPTYQRIV
Con1-4	146	SGQLRPC EEIFGCGTQNLAL
Con1-5	147	FGDKRPLECMFGGPIQLCPR
Con1-6	148	GQDLRPCEDMFGCGTKDWYG
Con1	3	KRPC EEIFGGCTYQ

10

【0038】

さらにもう1つの局面では、本発明は、式：

$C g^2 G g^4 g^5 D P F T g^{10} G C g^{13}$ (配列番号 75)

[式中、

g^2 は、酸性アミノ酸残基であり；

g^4 は、中性疎水性アミノ酸残基であり；

20

g^5 は、E、D又はQであり；

g^{10} は、中性疎水性又は中性極性アミノ酸残基であり；

g^{13} は、酸性残基である]

の amino 酸配列を含む、 $Ang-2$ に結合することができるポリペプチド、及び生理的に許容されるその塩に関する。好ましい実施形態では、 g^2 は E 又は D である。もう1つの好ましい実施形態では、 g^4 は V 又は M である。さらにもう1つの実施形態では、 g^{10} は F 又は Q である。さらにもう1つの実施形態では、 g^{13} は D 又は E である。

【0039】

本発明はさらに、式：

$h^1 h^2 h^3 h^4 C h^6 G h^8 h^9 D P F T h^{14} G C h^{17} h^{18} h^{19} h^{20}$ (配列番号 158)

30

[式中、

h^1 は、存在しないか又は中性疎水性、中性極性若しくは塩基性アミノ酸残基であり；

h^2 は、中性疎水性又は中性極性アミノ酸残基であり；

h^3 は、酸性アミノ酸残基であり；

h^4 は、中性疎水性又は中性極性アミノ酸残基であり；

h^6 は、酸性アミノ酸残基であり；

h^8 は、中性疎水性アミノ酸残基であり；

h^9 は、E、D又はQであり；

h^{14} は、中性疎水性又は中性極性アミノ酸残基であり；

40

h^{17} は、酸性アミノ酸残基であり；

h^{18} は、中性疎水性、中性極性又は塩基性アミノ酸残基であり；

h^{19} は、中性疎水性又は中性極性アミノ酸残基であり；及び

h^{20} は、存在しないか又はアミノ酸残基である]

の amino 酸配列を含む、 $Ang-2$ に結合することができるポリペプチド、及び生理的に許容されるその塩に関する。好ましい実施形態では、

h^1 は、存在しないか又は A、L、M、G、K 又は H であり；

h^2 は、L、F 又は Q であり；

h^3 は、D 又は E であり；

h^4 は、W 又は Y であり；

50

h^6 は、D又はEであり；
 h^8 は、V又はMであり；
 h^{14} は、F又はQであり；
 h^{17} は、D又はEであり；
 h^{18} は、M、Y、N又はKであり；
 h^{19} は、L又はQであり；及び、
 h^{20} は、M、T、G、S、D、K又はRである。

【0040】

より好ましい実施形態では、本発明は、配列番号5、及び配列番号149から配列番号157（両端を含む）から成る群より選択される少なくとも1個のアミノ酸配列を含み、
 Ang-2に結合することができるポリペプチド、及び生理的に許容されるその塩に関する。配列番号5、及び配列番号149から配列番号157を下記に示す。

【0041】

【表4】

ペプチド	配列番号	配列
12-9-1	149	GFEYCDGMEDPFTFGCDKQT
12-9-2	150	KLEYCDGMEDPFTQGCDNQS
12-9-3	151	LQEWCEGVEDPFTFGCEKQR
12-9-4	152	AQDYCEGMEDPFTFGCEMQK
12-9-5	153	LLDYCEGVQDPFTFGCENLD
12-9-6	154	HQEYCEGMEDPFTFGCEYQG
12-9-7	155	MLDYCEGMDDPFTFGCDKQM
12-9-C2	156	LQDYCEGVEDPFTFGCENQR
12-9-C1	157	LQDYCEGVEDPFTFGCEKQR
12-9	5	FDYCEGVEDPFTFGCDNH

極めて好ましい実施形態では、本発明は、式：

$$(X^1)_q - F^1 - (X^2)_r$$

[式中、

F^1 は、ビヒクルであり；

X^1 及び X^2 は、各々独立して：

— $(L^1)_s - P^1$ であり；

— $(L^1)_s - P^1 - (L^2)_t - P^2$ であり；

— $(L^1)_s - P^1 - (L^2)_t - P^2 - (L^3)_u - P^3$ であり；及び、

— $(L^1)_s - P^1 - (L^2)_t - P^2 - (L^3)_u - P^3 - (L^4)_v - P^4$ であり

；

[式中、 P^1 、 P^2 、 P^3 及び P^4 の1個又はそれ以上は、各々独立して、

(a) 該ポリペプチドが5—50アミノ酸の長さである、アミノ酸配列WD PWT（配列番号65）；

(b) アミノ酸配列WD PWT C（配列番号66）；

(c) 式中、 z^2 は酸性又は中性の極性アミノ酸残基である、アミノ酸配列C z^2 WD PWT（配列番号67）；

(d) 式中、 z^2 は酸性又は中性の極性アミノ酸残基である、アミノ酸配列C z^2 WD PWT C（配列番号68）；

(e) 式中、 c^2 は中性疎水性アミノ酸残基であり； c^4 はA、D又はEであり； c^6

10

20

30

40

50

は酸性アミノ酸残基であり； c^7 はアミノ酸残基であり；及び c^8 は中性疎水性、中性極性又は塩基性アミノ酸残基である、アミノ酸配列 $Pc^2Dc^4Lc^6c^7c^8LY$ （配列番号 71）；

（f）式中、 e^3 は中性極性アミノ酸残基であり； e^4 は酸性アミノ酸残基であり； e^5 は中性極性又は酸性アミノ酸残基であり； e^6 は中性疎水性アミノ酸残基であり；及び e^7 は中性疎水性アミノ酸残基である、アミノ酸配列 $RPe^3e^4e^5e^6e^7G$ （配列番号 73）；

（g）式中、 g^2 は酸性アミノ酸残基であり； g^4 は中性疎水性アミノ酸残基であり； g^5 は中性極性又は酸性アミノ酸残基であり； g^{10} は中性疎水性又は中性極性アミノ酸残基であり；及び g^{13} は酸性アミノ酸残基である、アミノ酸配列 $Cg^2Gg^4g^5DPFTg^{10}GCg^{13}$ （配列番号 75）；

（h）配列番号 1 のポリペプチド；

（i）配列番号 2 のポリペプチド；及び

（j）配列番号 7 のポリペプチド；

から成る群より選択されるポリペプチドを含み；

L^1 、 L^2 、 L^3 及び L^4 は、各々独立してリンカーである]

から選択され、及び

q 、 r 、 s 、 t 、 u 及び v は、 q 及び r の少なくとも 1 つが 1 であることを条件として、各々独立して 0 又は 1 である]

を有する物質及びその多量体の組成物、及び生理的に許容されるその塩に関する。

【0042】

本発明はさらに、ここで述べるような少なくとも 1 個のペプチド及びビヒクルを含み、 $Ang-2$ に結合することができる融合ポリペプチド、及び生理的に許容されるその塩に関する。前記融合ポリペプチドにおいて、そのビヒクルは、好ましくは Fc ドメイン、ポリエチレングリコール、脂質、コレステロール群、糖質及びオリゴ糖の少なくとも 1 つである。アルブミン等のような他の適切なビヒクルは当業者に認識され、本発明の範囲内に包含される。

【0043】

当業者は、様々な分子を特異的結合物質構造に挿入できることを認識する。そこで、所与の分子を、特異的結合物質の所望活性を保持しながら、例えば特異的結合物質のペプチドとビヒクル部分の間に、又はペプチド部分自体の中に挿入することができる。例えば、 Fc ドメイン又はそのフラグメント、ポリエチレングリコール又はデキストランなどの他の関連分子、脂肪酸、脂質、コレステロール群、低分子量糖質、ペプチド、細胞傷害性物質、化学療法剤、ここで述べるような検出可能成分（蛍光物質、放射性同位体などの放射性標識を含む）、オリゴ糖、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、干渉（又は他の）RNA、酵素、ホルモン等のような分子を容易に挿入することができる。このような挿入に適する他の分子は当業者によって認識され、本発明の範囲内に包含される。これは、例えば、任意に適切なリンカーによって連結された、2 個の連続アミノ酸の間に所望分子を挿入することを含む。例として、 $Con4(C)$ ペプチ体配列：

$M-Fc-GGGGGAQQEECEWDPWTCEHMLE$ （配列番号 23）

において、当業者は、 $Ang-2$ に結合するペプチドの能力を保持しながら、所望構造及び／又は機能を達成するために、例えば 2 個の隣接グルタミン（「QQ」）残基の間に所望分子を容易に挿入することができる。従って、この配列は次のように修飾されうる：

$M-Fc-GGGGGAQ-[分子]-QEECEWDPWTCEHMLE$

所望する場合は適切な分子を付加することができる。前記分子が、次のようなビヒクルとペプチドの間の、適切な側鎖上を含むその分子上の多くの位置に：

$M-Fc-[分子]-GGGGGAQQEECEWDPWTCEHMLE$

又は当業者が所望する他の何らかの位置に挿入できることは、さらに認識される。他の適切な実施形態は当業者には明白である。

【0044】

さらにもう1つの実施形態では、本発明は、ここで述べるような、本発明の特異的結合物質（ペプチド及び／又はペプチ体を含むが、これらに限定されない）をコードするポリヌクレオチドに関する。当業者は、アミノ酸配列が既知である場合、その対応するヌクレオチド配列は既知の手法を用いて容易に決定できることを認識する。例えば、Suzuki, D., An Introduction to Genetic Analysis, W. H. Freeman Pub. Co. (1986) 参照。本発明のペプチドをコードする例示ヌクレオチド配列を下記に示す。当業者は、2個以上のコドンが所与の1個のアミノ酸をコードすることがあり、それ故本発明は、本発明のペプチド及び／又はペプチ体をコードするあらゆるヌクレオチド配列に関することを認識する。

【0045】

【表5】

ペプチド	配列番号	ペプチド配列	例示的DNA配列
Con4-44	76	PIRQEECDWDPWTCEHMWEV	ccgatccgtcaggaagaatgcga ctgggacccgtggacctgcgaac acatgtgggaagtt (SEQ ID NO: 159)
Con4-40	77	TNIQEECEWDPWTCDHMPGK	accaacatccaggaagaatgcga atgggacccgtggacctgcgacc acatgccgggtaaa (SEQ ID NO: 160)
Con4-4	78	WYEQDACEWDPWTCEHMAEV	tggtacgaacaggacgcttgcca atgggacccgtggacctgcgaac acatggctgaagtt (SEQ ID NO: 161)
Con4-31	79	NRLQEVCEWDPWTCEHMENTV	aaccgtctgcaggaagttgcgaa tgggacccgtggacctgcgaaca catggaaaacgtt (SEQ ID NO: 162)
Con4-C5	80	AATQEECEWDPWTCEHMPRS	gctgctacccaggaagaatgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatgccgcgttcc (SEQ ID NO: 163)
Con4-42	81	LRHQEGCEWDPWTCEHMFWD	ctgcgtcaccaggaaggttgcca atgggacccgtggacctgcgaac acatgttcgactgg (SEQ ID NO: 164)

10

20

30

Con4-35	82	VPRQKDCEWDPWTCEHMYVG	gtccgcgtcagaaagactgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatgtacgttggt (SEQ ID NO: 165)
Con4-43	83	SISHEECEWDPWTCEHMQVG	tccatctcccacgaagaatgcgaa tgggacccgtggacctgcgaaca catgcaggttggt (SEQ ID NO: 360)
Con4-49	84	WAAQEECEWDPWTCEHMGRM	tgggctgctcaggaagaatgcga atgggatccgtggactgcgaaca catgggtcgtatg (SEQ ID NO: 166)
Con4-27	85	TWPQDKCEWDPWTCEHMGST	acttgccgcaggacaaatgcga atgggatccgtggactgcgaaca catgggttctact (SEQ ID NO: 167)
Con4-48	86	GHSQEECGWDPWTCEHMGTS	ggctactcccaggaagaatgcgg tgggacccgtggacctgcgaac acatgggtacgtcc (SEQ ID NO: 168)
Con4-46	87	QHWQEECEWDPWTCDHMPSK	cagcactggcaggaagaatgcga atgggacccgtggacctgcgacc acatgccgtccaaa (SEQ ID NO: 169)
Con4-41	88	NVRQEKCEWDPWTCEHMPVR	aacgttcgtcaggaaaaatgcgaa tgggacccgtggacctgcgaaca catgccggttcgt (SEQ ID NO: 170)
Con4-36	89	KSGQVECNWDPWTCEHMPRN	aaatccggtcaggttgatgcgaac tgggacccgtggacctgcgaaca catgccgcgtaac (SEQ ID NO: 171)
Con4-34	90	VKTQEHCDWDPWTCEHMREW	gttaaaaccaggaacactgcga ctgggacccgtggacctgcgaac acatgcgtgaatgg (SEQ ID NO: 172)
Con4-28	91	AWGQEGCDWDPWTCEHMLPM	gcttggggtcaggaaggttgca ctgggacccgtggacctgcgaac acatgctgccgatg (SEQ ID NO: 173)
Con4-39	92	PVNQEDCEWDPWTCEHMPPM	ccggttaaccaggaagactgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatgccgccgatg (SEQ ID NO: 174)

10

20

30

40

Con4-25	93	RAPQEDCEWDPWTCAHMDIK	cgtgctccgcaggaagactgcga atgggacccgtggacctgcgtc acatggacatcaaa (SEQ ID NO: 175)
Con4-50	94	HGQNMECEWDPWTCEHMFY	cacggtcagaacatggaatgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatgttccgttac (SEQ ID NO: 176)
Con4-38	95	PRLQEECVWDPWTCEHMPLR	ccgcgtctgcaggaagaatgcgtt tgggacccgtggacctgcgaaca catgccgtgcgt (SEQ ID NO: 177)
Con4-29	96	RTTQEKCEWDPWTCEHMESQ	cgtaccaccaggaataatgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatggaatcccag (SEQ ID NO: 178)
Con4-47	97	QTSQEDCVWDPWTCDHMOVSS	cagacctccaggaagactgcgtt tgggacccgtggacctgcgacca catggttctcc (SEQ ID NO: 179)
Con4-20	98	QVIGRPCEWDPWTCEHLEGL	caggttatcggctgcctgcgaa tgggacccgtggacctgcgaaca cctggaaggtctg (SEQ ID NO: 180)
Con4-45	99	WAQQEECAWDPWTCDHMOVGL	tgggctcagcaggaagaatgcgc ttgggacccgtggacctgcgacc acatggttggtctg (SEQ ID NO: 181)
Con4-37	100	LPGQEDCEWDPWTCEHMOVRS	ctgccgggtcaggaagactgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatggttcgtcc (SEQ ID NO: 182)
Con4-33	101	PMNQVECDWDPWTCEHMVRS	ccgatgaaccaggttgaatgcga ctgggacccgtggacctgcgaac acatgccgcgtcc (SEQ ID NO: 183)
AC2- Con4	102	FGWSHGCEWDPWTCEHMGST	ttcggttggtctcacggtgcgaat gggatccgtggactgcgaacac atgggttctacc (SEQ ID NO: 184)
Con4-32	103	KSTQDDCDWDPWTCEHMOVGP	aaatccaccaggacgactgcga ctgggacccgtggacctgcgaac acatggttggtccg (SEQ ID NO: 185)

10

20

30

40

Con4-17	104	GPRISTCQWDPWTCEHMDQL	ggtcgcgtatctccacctgccag tgggacctgtggacctgcgaaca catggaccagctg (SEQ ID NO: 186)
Con4-8	105	STIGDMCEWDPWTCAHMQVD	tccaccatcggtgacatgtgcgaa tgggacctgtggacctgcgctca catgcaggtgac (SEQ ID NO: 187)
AC4- Con4	106	VLGGQGCEWDPWTCRLLQGW	gttctgggtggtcagggtgcgaa tgggacctgtggacctgccgtctg ctgcagggttg (SEQ ID NO: 188)
Con4-1	107	VLGGQGCQWDPWTCSHLEDG	gttctgggtggtcagggtgccag tgggacctgtggacctgctccca cctggaagacggt (SEQ ID NO: 189)
Con4- C1	108	TTIGSMCEWDPWTCAHMQGG	accaccatcggttccatgtgcgaa tgggacctgtggacctgcgctca catgcagggtggt (SEQ ID NO: 190)
Con4-21	109	TKGKSVCQWDPWTCSHMQSG	accaaaggtaaaccggttgccag tgggacctgtggacctgctccca catgcagtccggt (SEQ ID NO: 191)
Con4- C2	110	TTIGSMCQWDPWTCAHMQGG	accaccatcggttccatgtgccag tgggacctgtggacctgcgctca catgcagggtggt (SEQ ID NO: 192)
Con4-18	111	WVNEVVCEWDPWTCNHWDTP	tgggttaacgaagtgtttgcgaat gggacctgtggacctgcaaccac tgggacaccccg (SEQ ID NO: 193)
Con4-19	112	VVQVGMCQWDPWTCKHMLRQ	gttggtcaggttggtatgtgccagt gggacctgtggacctgcaaacac atgcgtctgcag (SEQ ID NO: 194)

10

20

30

Con4-16	113	AVGSQTCEWDPWTCAHLVEV	gctgttggtcccagacctgcgaat gggacccgtggacctgcgctcac ctggttgaagtt (SEQ ID NO: 195)
Con4-11	114	QGMKMFCEWDPWTCAHIVYR	cagggtatgaaaatgttctgcgaat gggacccgtggacctgcgctcac atcggttaccgt (SEQ ID NO: 196)
Con4- C4	115	TTIGSMCQWDPWTCEHMQGG	accaccatcggtccatgtgccag tgggacccgtggacctgcgaaca catgcagggtgt (SEQ ID NO: 197)
Con4-23	116	TSQRVGCEWDPWTCQHLYT	acctcccagcgtgttggtgcgaat gggacccgtggacctgccagcac ctgacctacacc (SEQ ID NO: 198)
Con4-15	117	QWSWPPCEWDPWTCQTVWPS	cagtggctcctggccgccgtgcga atgggacccgtggacctgccaga ccgtttggccgtcc (SEQ ID NO: 199)
Con4-9	118	GTSPSFCQWDPWTCSHMOVQ	ggtacctccccgtccttctgccagt gggacccgtggacctgtccac atggttcagggt (SEQ ID NO: 200)
TN8- Con4	4	QEECEWDPWTCEHM	caggaagaatgcgaatgggaccc atggacttgcaacacatg (SEQ ID NO: 201)
L1-1	119	QNYKPLDELDATLYEHFIFHYT	cagaactacaaaccgtggacga actggacgctaccctgtacgaaca cttcatttccactacacc (SEQ ID NO: 202)
L1-2	120	LNFTPLDELEQTLYEQWTLQQS	ctgaacttcaccccgctggacgaa ctggaacagaccctgtacgaaca gtggaccctgcagcagtc (SEQ ID NO: 203)
L1-3	121	TKFNPLDELEQTLYEQWTLQHQ	accaaattcaaccgctggacga actggaacagaccctgtacgaac agtggaccctgcagcaccag (SEQ ID NO: 204)

10

20

30

40

L1-4	122	VKFKPLDALEQTLYEHWMFQQA	gttaaattcaaaccgctggacgct ctggaacagaccctgtacgaaca ctggatgtccagcagggt (SEQ ID NO: 205)
L1-5	123	VKYKPLDELDEILYEQQTFQER	gttaaatacaaaccgctggacgaa ctggacgaaatcctgtacgaacag cagacctccaggaacgt (SEQ ID NO: 206)
L1-7	124	TNFMPLDDELEQRLYEQFILQQG	accaacttcattgccgatggacgac ctggaacagcgtctgtacgaaca gttcactcctgcagcagggt (SEQ ID NO: 207)
L1-9	125	SKFKPLDELEQTLYEQWTLQHA	tccaaattcaaaccgctggacgaa ctggaacagaccctgtacgaaca gtggaccctgcagcacgct (SEQ ID NO: 208)
L1-10	126	QKFQPLDELEQTLYEQFMLQQA	cagaaattccagccgctggacga actggaacagaccctgtacgaac agttcatgctgcagcagggt (SEQ ID NO: 209)
L1-11	127	QNFKPMDELEDTLYKQFLFQHS	cagaacttcaaaccgatggacga attggaagacaccctgtacaaaca gttcctgtccagcactcc (SEQ ID NO: 210)
L1-12	128	YKFTPLDDLEQTLYEQWTLQHV	tacaaattcaccccgtggacgac ctggaacagaccctgtacgaaca gtggaccctgcagcacgtt (SEQ ID NO: 211)
L1-13	129	QEYEPLDELDETLYNQWMFHQR	caggaatacgaaccgctggacga actggacgaaaccctgtacaacc agtggatgtccaccagcgt (SEQ ID NO: 212)
L1-14	130	SNFMPLDELEQTLYEQFMLQHQ	tccaacttcattgccgatggacgaa ctggaacagaccctgtacgaaca gttcattgctgcagcaccag (SEQ ID NO: 213)
L1-15	131	QKYQPLDELDKTLYDQFMLQQG	cagaaataccagccgctggacga actggacaaaaccctgtacgatca gttcattgctgcagcagggt (SEQ ID NO: 214)

10

20

30

40

L1-16	132	QKFQPLDELEETLYKQWTLQQR	cagaaattccagccgctggacga actggaagaaaccctgtacaaac agtggaccctgcagcagcgt (SEQ ID NO: 215)
L1-17	133	VKYKPLDELDEWLYHQFTLHHQ	gttaaatacaaaccgctggacgaa ctggacgaatggctgtaccacca gttcaccctgcaccaccag (SEQ ID NO: 216)
L1-18	134	QKFMPLDELDEILYEQFMFQQS	cagaaattcatgccgctggacgaa ctggacgaaatcctgtacgaacag ttcatgttcagcagctccc (SEQ ID NO: 217)
L1-19	135	QTFQPLDDLEEYLYEQWIRRYH	cagacctccagccgctggacga cctggaagaataactgtacgaaca gtggatccgtcgttaccac (SEQ ID NO: 218)
L1-20	136	EDYMPLDALDAQLYEQFILLHG	gaagactacatgccgctggacgc tctggacgctcagctgtacgaaca gttcacctgtgcacggt (SEQ ID NO: 219)
L1-21	137	HTFQPLDELEETLYYQWLYDQL	cacacctccagccgctggacga actggaagaaaccctgtactacca gtggctgtacgaccagctg (SEQ ID NO: 220)
L1-22	138	YKFNPMDLELEQTLYEEFLFQHA	tacaaattcaaccgatggacgaa ctggaacagaccctgtacgaaga attcctgttcagcagcgt (SEQ ID NO: 221)
AC6-L1	139	TNYKPLDELDA TL YEHWILQHS	accaactacaaaccgctggacga actggacgctaccctgtacgaaca ctggatcctgcagcactcc (SEQ ID NO: 222)
L1-C1	140	QKFKPLDELEQTLYEQWTLQQR	cagaaattcaaacgctggacga actggaacagaccctgtacgaac agtggaccctgcagcagcgt (SEQ ID NO: 223)
L1-C2	141	TKFQPLDELDQTLYEQWTLQQR	accaaattccagccgctggacga actggaccagaccctgtacgaac agtggaccctgcagcagcgt (SEQ ID NO: 224)

10

20

30

40

L1-C3	142	TNFQPLDELDQTLYEQWTLQQR	accaacttcagccgctggacga actggaccagaccctgtacgaac agtggaccctgcagcagcgt (SEQ ID NO: 225)
L1	6	KFNPLDELEETLYEQFTFQQ	aaattcaaccgctggacgagctg gaagagactctgtacgaacagttt acttttcaacag (SEQ ID NO: 226)
Con1-1	143	AGGMRPYDGMLGWPNYDVQA	gctggtggtatgcgtccgtacgac ggtatgctgggtggccgaactac gacgttcaggct (SEQ ID NO: 227)
Con1-2	144	QWDDPCMHLGPVTWRRCI	cagacttgggacgatccgtgcattg cacattctgggtccggttacttggc gtcgttgcatc (SEQ ID NO: 228)
Con1-3	145	APGQRPYDGMLGWPTYQRIV	gctccgggtcagcgtccgtacga cggatgctgggtggccgaccta ccagcgtatcgtt (SEQ ID NO: 229)
Con1-4	146	SGQLRPC EEIFGCGTQNLAL	tccggtcagctgcgtccgtgcgaa gaaatcttcggtgcggtaccag aacctggctctg (SEQ ID NO: 230)
Con1-5	147	FGDKRPLECMFGGPIQLCPR	ttcgggtgacaaacgtccgtggaa tgcatgttcggtggtccgatccag ctgtgcccgcgt (SEQ ID NO: 231)
Con1-6	148	GQDLRPCEDMFGCGTKDWYG	ggtcaggacctgcgtccgtgcga agacatgttcggtggtggtaccaa agactggtacggt (SEQ ID NO: 232)
12-9-1	149	GFEYCDGMEDPFTFGCDKQT	ggtttcgaatactgcgacggtatg gaagaccggtcaccttcggtgc gacaaacagacc (SEQ ID NO: 233)
12-9-2	150	KLEYCDGMEDPFTQGCDNQS	aaactggaatactgcgacggtatg gaagaccggtcacccagggttg cgacaaccagtcc (SEQ ID NO: 234)
12-9-3	151	LQEWCEGVEDPFTFGCEKQR	ctgcagggaatggtgcgaaggtgtt

10

20

30

40

			gaagaccggttcaccttcggtgc gaaaaacagcgt (SEQ ID NO: 235)
12-9-4	152	AQDYCEGMEDPFTFGCEMQK	gctcaggactactgcgaaggtatg gaagaccggttcaccttcggtgc gaaatgcagaaa (SEQ ID NO: 236)
12-9-5	153	LLDYCEGVQDPFTFGCENLD	ctgctggactactgcgaaggtgtt caggaccggttcaccttcggtgc gaaaacctggac (SEQ ID NO: 237)
12-9-6	154	HQEYCEGMEDPFTFGCEYQG	caccaggaataactgcgaaggtat ggaagaccggttcaccttcggttg cgaataccagggt (SEQ ID NO: 238)
12-9-7	155	MLDYCEGMDDPFTFGCDKQM	atgctggactactgcgaaggtatg gacgaccggttcaccttcggtgc gacaaacagatg (SEQ ID NO: 239)
12-9-C2	156	LQDYCEGVEDPFTFGCENQR	ctgcaggactactgcgaaggtgtt gaagaccggttcaccttcggtgc gaaaaccagcgt (SEQ ID NO: 240)
12-9-C1	157	LQDYCEGVEDPFTFGCEKQR	ctgcaggactactgcgaaggtgtt gaagaccggttcaccttcggtgc gaaaaacagcgt (SEQ ID NO: 241)
12-9	5	FDYCEGVEDPFTFGCDNH	ttcgactactgcgaaggtgttgaa gaccggttcacttcggtgtgata accac (SEQ ID NO: 242)

10

20

30

【0046】

さらにもう1つの実施形態では、本発明は、本発明の少なくとも1個のポリヌクレオチドを含む発現ベクターに関する。もう1つの実施形態では、本発明は、前記発現ベクターを含む宿主細胞に関する。前記宿主細胞は、好ましくは原核細胞（大腸菌（E. coli）細胞など）又は真核細胞であることは認識される。

【0047】

本発明はまた、医薬適合性のその担体と混合して、ここで述べる組成物の有効量を含有する医薬組成物に関する。

【0048】

本発明はまた、ここで述べるポリペプチド又は組成物の治療上有効な量を投与することを含む、哺乳類において有害な血管新生を阻止する方法に関する。本発明はまた、ここで述べるポリペプチド又は組成物の治療上有効な量を投与することを含む、哺乳類において血管新生を調節する方法に関する。本発明はさらに、ここで述べるポリペプチド又は組成物の治療上有効な量を投与することを含む、哺乳類において有害な血管新生を特徴とする腫瘍増殖を阻止する方法に関する。加えて、本発明は、ここで述べるポリペプチド又は組成物の治療上有効な量及び化学療法剤を投与することを含む、哺乳類において癌を治療する方法に関する。好ましい実施形態では、前記化学療法剤は、5-FU、CPT-11及びタキソテル（Taxotere）の少なくとも1つである。しかしながら、他の適切な化学療法剤及び他の癌治療が使用できることは認識される。

40

50

【0049】

本発明はまた、ここで述べるポリペプチド又は組成物の治療上有効な量を投与することを含む、哺乳類において血管透過性又は血漿漏出の少なくとも1つを調節する方法に関する。本発明はさらに、ここで述べるポリペプチド又は組成物の治療上有効な量を投与することを含む、哺乳類において、眼血管新生疾患、肥満、血管芽細胞腫、血管腫、動脈硬化症、炎症性疾患、炎症性障害、アテローム性動脈硬化症、子宮内膜症、新生物性疾患、骨関連疾患、又は乾癬の少なくとも1つを治療する方法に関する。

【0050】

本発明の特異的結合物質が、調節不全の又は有害な血管新生に関連する多くの疾患を治療するために使用できることは認識される。そのような疾患は、網膜症（糖尿病性網膜症及び加齢性黄斑変性を含む）などの眼新生血管形成、乾癬、血管芽細胞腫、血管腫、動脈硬化症、リウマチ様又はリウマチ性炎症性疾患などの炎症性疾患、特に関節炎（慢性関節リウマチを含む）、又は慢性喘息、動脈又は移植後アテローム硬化症、子宮内膜症などの他の慢性炎症性疾患、及び新生物性疾患、例えばいわゆる固形腫瘍及び液状腫瘍（白血病など）を含むが、これらに限定されない。特異的結合物質の投与によって治療できるさらなる疾患は、当業者には明白である。そのような付加的疾患は、肥満、血管透過性、血漿漏出、及び骨粗しょう症を含む骨関連疾患を含むが、これらに限定されない。それ故、本発明はさらに、調節不全の又は有害な血管新生に関連するこれらの疾患を治療する方法に関する。

【0051】

本発明の他の実施形態は、ここで提供する開示から容易に明白である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0052】

章の見出しは、ここでは構成のためにのみ使用するものであり、いかなる意味においても記述する対象を限定するものと解釈されるべきではない。

【0053】

組換えDNA分子、タンパク質及び抗体の生産、ならびに組織培養及び細胞形質転換のためには、標準的な手法が使用しうる。酵素反応及び精製手法は、典型的には製造者の仕様書に従って、又はSambrookら（Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY [1989]）に述べられているような従来の手順を用いてこの技術分野に置いて一般的に実施されるように、又はここで述べるように実施する。特定の定義が与えられていない限り、ここで述べる分析化学、合成有機化学、及び医薬及び製薬化学に関して使用する術語、及び実験手順及び手法は、周知であり且つこの技術分野で一般的に使用されるものである。化学合成、化学分析、製薬調製、製剤及び送達、及び患者の処置のためには、標準的な手法が使用しうる。

【0054】

定義

この明細書を通じて使用する用語は、特定の場合に限って異なる記載がない限り、下記のように定義される。

【0055】

「Ang-2」の、米国特許第6,166,185号の図6に示されているポリペプチド（「Tie-2リガンド-2」）又はそのフラグメントならびに対立遺伝子変異体、スプライス変異体、誘導体、置換、欠失及び／又は挿入変異体、融合ペプチド及びポリペプチド、及び種間相同体を含む関連ポリペプチドを意味する。Ang-2ポリペプチドは、作製される方法に依存して、付加的な末端残基、例えばリーダー配列、標的配列、アミノ末端メチオニン、アミノ末端メチオニン及びリシン残基、及び／又はタグ又は融合タンパク質配列を含んでいてもよく又は含んでいなくてもよい。

【0056】

Ang-2又はAng-2特異的結合物質に関連して使用するとき「生物学的に活性な」の語は、Ang-2又はAng-2特異的結合物質の特徴を示す少なくとも1つの活性を有するペプチド又はポリペプチドを意味する。Ang-2の特異的結合物質は、Ang-2の少なくとも1つの生物活性に関するアゴニスト、アンタゴニスト、又は中和又は遮断活性を有する。

【0057】

「特異的結合物質」の語は、Ang-2に特異的に結合する分子、好ましくはタンパク質様分子、及びここで定義するようなその変異体及び誘導体を意味する。特異的結合物質は、Ang-2に選択的に結合するタンパク質、ペプチド、核酸、糖質、脂質又は低分子量化合物でありうる。好ましい実施形態では、本発明に従った特異的結合物質は、単独の又は既知の手法によって提供される他のアミノ酸配列との組み合わせでの、ペプチド又はペプチ体、ならびにそのフラグメント、変異体又は誘導体である。そのような手法は、酵素的開裂、化学的開裂、ペプチド合成又は組換え手法を含むが、これらに限定されない。本発明のAng-2特異的結合物質は、Ang-2の生物活性及び／又は他のAng-2に関連する活性を調節する、例えば阻害する又は促進するAng-2の部分に結合することができる。

10

【0058】

ここで使用する「変異体」の語は、アミノ酸残基が、該結合物質についての天然に生じる（又は少なくとも既知の）アミノ酸配列に挿入されている、アミノ酸配列から欠失している及び／又は置換されている、ペプチド及びポリペプチドを含む。本発明の変異体は下記で述べるような融合タンパク質を含む。

20

【0059】

「誘導体」は、挿入、欠失又は置換変異体とは異なる方法で化学修飾されている結合物質を含む。

【0060】

「Ang-2に特異的に結合する」とは、その親和性（例えばここで述べるようなアフィニティーELISA又はBIAコアによって測定される）又はその中和能力（例えばここで述べる中和ELISAアッセイ又は同様のアッセイによって測定される）が、他の何らかのアンギオポエチン又は他のペプチド又はポリペプチドに対する親和性又は中和能力よりも少なくとも10倍高いが、任意に50倍、100倍、250倍又は500倍又は、少なくとも1000倍高いように、成熟、完全長又は部分長ヒトAng-2ポリペプチド又はそのオーソログを認識し、それに結合する、本発明の特異的結合物質（ペプチ体、又はそのペプチド部分など）の能力を意味し、但し、そのペプチ体のペプチド部分は、そのようなアッセイにおける評価のためのヒトFc部分に最初に融合する。

30

【0061】

「エピトープ」の語は、特異的結合物質、例えばペプチ体によって、その結合物質の抗原結合領域の1又はそれ以上において、認識されうる又は結合されうる分子の部分意味する。エピトープは通常、例えばアミノ酸又は糖質側鎖などの、分子の化学的に活性な表面分属から成り、特異的三次元構造特性ならびに特異的電荷特性を有する。ここで使用するエピトープは、隣接又は非隣接のいずれでもよい。

40

【0062】

「阻害及び／又は中和エピトープ」の語は、ペプチ体などの特異的結合物質によって結合されたとき、インビボ、インビトロ又はインサイチューで、そのようなエピトープを含む分子、細胞又は生物の生物活性の喪失（又は少なくとも生物活性の低下）をもたらすエピトープである。本発明に関して、中和エピトープは、Ang-2の生物活性領域に位置するか又は生物活性領域に結合している。代替的に、「活性化エピトープ」の語は、抗体などの本発明の特異的結合物質によって結合されたとき、Ang-2の活性化又は少なくともAng-2の生物活性立体配座の維持をもたらすエピトープである。

【0063】

「ペプチ体フラグメント」の語は、完全な無傷ペプチ体未満のものを含むペプチド又は

50

ポリペプチドを意味する。

【0064】

核酸分子、ポリペプチド、宿主細胞等のような生物学的物質に関して使用するとき「天然に生じる」の語は、天然に認められ、人間によって修飾されていないものを意味する。

【0065】

Ang-2又はAng-2の特異的結合物質に関して使用するとき「単離された」の語は、その自然環境において認められる少なくとも1つの汚染ポリペプチド又は化合物を含まない、好ましくはその治療的又は診断的使用に干渉する他の汚染哺乳類ポリペプチドを実質的に含まない化合物を意味する。

【0066】

Ang-2ペプチ体又はそのフラグメント、又はAng-2の他の何らかのタンパク質様特異的結合物質に関して使用するとき「成熟」の語は、リーダー又はシグナル配列を持たないペプチド又はポリペプチドを意味する。本発明の結合物質が、例えば原核宿主細胞において発現されるとき、「成熟」ペプチド又はポリペプチドは、アミノ末端メチオニン、又は1個又はそれ以上のメチオニン及びリシン残基などの付加アミノ酸残基も含みうる（しかし、やはりリーダー配列を持たない）。このようにして生産されるペプチド又はポリペプチドは、これらの付加アミノ酸残基を除去して又は除去せずに使用することができる。

【0067】

Ang-2の特異的結合物質に関して使用するとき「有効量」又は「治療上有効な量」の語は、Ang-2の1つ又はそれ以上の生物活性のレベルの観察可能な変化を支持するために有用な又は必要な、特異的結合物質の量を意味する。その変化は、Ang-2活性のレベルの上昇又は低下のいずれかでありうる。好ましくは、その変化はAng-2活性の低下である。

【0068】

「ペプチ体」の語は、少なくとも1個のペプチドに結合した抗体Fcドメインを含む分子を意味する。ペプチ体の生産は、2000年5月4日公開のPCT特許公開広報WO 00/24782号に概説されている。

【0069】

ここで使用する「変異体」の語は、アミノ酸残基が、その分子についてのアミノ酸配列に挿入されている、アミノ酸配列から欠失している及び／又は置換されている、本発明のペプチ体のようなペプチド又はペプチドービヒクルの組合せなどの分子を含む。1個又はそれ以上のアミノ酸が挿入されている変異体は、下記で述べるような融合タンパク質を含む。

【0070】

「誘導体」は、挿入、欠失又は置換変異体とは異なる方法で化学修飾されている、ペプチ体のようなペプチド及び／又はペプチドービヒクルの組合せを含む。

【0071】

「フラグメント」の語は、該ペプチド及び／又はペプチドービヒクルの組合せの完全長アミノ酸配列未満を含むペプチド又はペプチドービヒクルの組合せを意味する。そのようなフラグメントは、例えば、アミノ末端のトランケーション、カルボキシ末端のトランケーション、及び／又は該ペプチド又はペプチドービヒクルの組合せのアミノ酸配列からの残基の内部欠失から生じうる。フラグメントは、代替的RNAスプライシングから又はインビボ又はインビトロでのプロテアーゼ活性から生じうる。そのようなフラグメントはまた、化学的ペプチド合成法によって、ペプチド、ペプチドービヒクルの組合せ、又はFc部分及び／又はペプチ体のペプチド部分をコードするポリヌクレオチドを修飾することによっても構築しうる。

【0072】

「Fc」の語は、本発明のビヒクルの1つの種類を意味し、単量体又は多量体の、全抗体のタンパク質分解性消化から生じる抗体の非抗原結合フラグメントの配列を含む。本発

10

20

30

40

50

明におけるFcのソースは、好ましくは全面的にヒトFcであり、免疫グロブリンのいずれかでありうるが、IgG1及びIgG2が好ましい。しかし、ここでは、部分的にヒトであるFc分子又はヒト以外の種から得られるFc分子も包含される。Fcは、共有結合（すなわちジスルフィド結合）及び非共有結合によって二量体又は多量体形態へと連結されうる単量体ポリペプチドで作られる。天然Fc分子の単量体サブユニットの間の分子間ジスルフィド結合の数は、クラス（例えばIgG、IgA、IgE）又はサブクラス（例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgA1、IgA2）に依存して1-4の範囲をとる。天然Fcの一例は、IgGのパパイン消化から生じるジスルフィド結合二量体である[Ellisonら(1982)、Nucleic Acids Res. 10:4071-9]ここで使用する「天然Fc」の語は、単量体、二量体及び多量体形態の総称である。

10

【0073】

「Fcドメイン」の語は、天然Fc及びFc変異体分子及び上記で定義した配列を包含する。Fc変異体及び天然Fcに関しては、「Fcドメイン」の語は、全抗体から消化されたか又は他の手段によって生産されたかに関わらず、単量体又は多量体形態の分子を含む。

【0074】

Fcドメイン又はFcドメインを含む分子に適用するとき「多量体」の語は、共有結合によって、非共有結合によって、又は共有結合と非共有結合の両方の相互作用によって結合された2つ又はそれ以上のポリペプチド鎖を有する分子を意味する。IgG分子は典型的には二量体を形成する：IgMは五量体；IgDは二量体；及びIgAは単量体、二量体、三量体又は四量体を典型的に形成する。多量体は、Fcの天然Igソースの配列及び生じる活性を利用することによって又はそのような天然Fcを誘導体化する（下記で定義する）ことによって形成しうる。

20

【0075】

Fcドメイン又はFcドメインを含む分子に適用するとき「二量体」の語は、共有結合によって又は非共有結合によって結合された2つのポリペプチド鎖を有する分子を意味する。

【0076】

「ビヒクル」の語は、治療タンパク質の分解を防ぐ及び／又は半減期を上昇させる、毒性を低下させる、免疫原性を低下させる、又は生物活性を上昇させる分子を意味する。例示的ビヒクルは、Fcドメインならびに線状重合体（例えばポリエチレングリコール（PEG）、ポリリシン、デキストラン等）；分枝重合体（例えば1981年9月15日発行のDenkenwalterらへの米国特許第4,289,872号；1993年7月20日発行のTamへの米国特許第5,229,490号；1993年10月28日公開のFrechetらによるWO93/21259号参照）；脂質；コレステロール群（ステロイドなど）；糖質又はオリゴ糖；又はサルベージ受容体に結合する何らかの天然又は合成タンパク質、ポリペプチド又はペプチドを含む。ビヒクルについては下記でさらに説明する。

30

【0077】

「誘導体化する」及び「誘導体」又は「誘導体化された」の語は、それぞれ、（1）化合物が環状部分、例えば化合物内のシステイニル残基間の架橋を有する；（2）化合物が架橋する又は架橋部位を有する、例えば化合物がシステイニル残基を有しており、それ故培養中又はインビボで架橋二量体を形成する；（3）1又はそれ以上のペプチジル結合が非ペプチジル結合によって置換される；（4）N末端が-NRR1、NRC(O)R1、-NRC(O)OR1、-NRS(O)2R1、-NHC(O)NHR、スクシニミド基、又は置換又は非置換ベンジルオキシカルボニル-NH-〔式中、R及びR1及び環置換基は下記で定義するとおりである〕によって置換される；（5）C末端が-C(O)R2又は-NR3R4〔R2、R3及びR4は下記で定義するとおりである〕によって置換される；及び（6）個々のアミノ酸部分が、選択側鎖又は末端残基と反応することができる物質での処理を通して修飾される、工程及び生じる化合物を含む。誘導体については下記

40

50

でさらに説明する。

【0078】

「ペプチド」の語は、約3ー約75アミノ酸の分子を意味し、約5ー50アミノ酸の分子が好ましく、8ー40アミノ酸分子がより好ましく、約10ー25アミノ酸の分子が最も好ましい。ペプチドは、天然に生じる又は人工の（すなわち非天然に生じる）アミノ酸配列でありうる。例示的ペプチドは、ペプチドライブラリー（例えばファージディスプレイライブラリー）において実施されるような、ここで述べる方法のいずれかによって生成されるか、化学合成によって生成されるか、タンパク質の消化によって誘導されるか、又は組換えDNA手法を用いて生成されうる。

【0079】

「薬理的に活性な」の語は、そのように記述される物質が、医学的パラメータ（例えば血圧、血球算定、コレステロールレベル）又は疾患状態（例えば癌、自己免疫疾患等）に影響を及ぼす活性を有すると判定されることを意味する。

【0080】

「アンタゴニストペプチド」又は「阻害因子ペプチド」の語は、対象とする関連タンパク質の生物活性を遮断する又は何らかの方法で生物活性に干渉する、若しくは対象とする関連タンパク質の既知のアンタゴニスト又は阻害因子と同等の生物活性を有するペプチドを意味する。従って、「Ang-2アンタゴニストペプチド」の語は、Ang-2拮抗作用特性を有すると特定できる又は推論できるペプチドを含む。

【0081】

さらに、本発明の化合物の生理的に許容される塩も本明細書に包含される。「生理的に許容される塩」とは、医薬適合性であることが知られている又は後ほど発見されるあらゆる塩を意味する。一部の特定例は、酢酸塩；トリフルオロ酢酸塩；塩酸塩及び臭化水素酸塩などのハロゲン化水素酸塩；硫酸塩；クエン酸塩；酒石酸塩；グリコール酸塩；及びシュウ酸塩、メシレート及びリン酸塩である。

【0082】

ペプチ体

本発明の1つの局面は、Ang-2ペプチ体の開発に関する。タンパク質リガンドとその受容体の相互作用はしばしば比較的大きな界面で起こる。しかし、ヒト成長ホルモンとその受容体に関して明らかにされたように、その界面の少数の鍵となる残基だけが結合エネルギーの大部分に寄与する。Clacksonら、Science 267:383-6 (1995)。タンパク質リガンドのバルクは単に、正しいトポロジーで結合エピソードを表示するか又は結合に無関係な機能を助ける。それ故、「ペプチド」長の（一般に2ー40アミノ酸）の分子は、所与の大きなタンパク質リガンドの受容体タンパク質に結合することができる。そのようなペプチドは、大型タンパク質リガンドの生物活性を模倣しうるか（「ペプチドアゴニスト」）、又は競合結合を通して、大型タンパク質リガンドの生物活性を阻害しうる（「ペプチドアンタゴニスト」）。

【0083】

ファージディスプレイテクノロジーはそのようなペプチドアゴニスト及びアンタゴニストを特定する上での強力な方法として出現した。例えば、Scottら、Science 249:386 (1990)；Devlinら、Science 249:404 (1990)；1993年6月29日発行の米国特許第5,223,409号；1998年3月31日発行の米国特許第5,498,530号；1995年7月11日発行の米国特許第5,432,018号；1994年8月16日発行の米国特許第5,338,665号；1999年7月13日発行の米国特許第5,922,545号；1996年12月19日公開のWO96/40987号；及び1998年4月16日公開のWO98/15833号（その各々が参照してここに組み込まれる）参照。ペプチドファージディスプレイライブラリーでは、線状ファージのコートタンパク質との融合によってランダムなペプチド配列を表示することができる。表示されたペプチドは、所望する場合は、受容体の抗体固定化細胞ガイドメインに対してアフィニティー溶出することができる。アフィニティー精

製と再増殖の連続的な実施によって保持されたファージを濃縮しうる。最良結合ペプチドを配列決定して、1又はそれ以上の構造的に関連するファミリーのペプチドの中で鍵となる残基を特定することができる。例えば、その中で2つの異なるファミリーが特定された、Cwirlら、Science 276:1696-9 (1997) 参照。そのペプチド配列はまた、どの残基がアラニンスキャニングによって又はDNAレベルでの突然変異誘発によって安全に置換しうるかを示唆すると考えられる。最良結合因子の配列をさらに至適化するために、突然変異誘発ライブラリーを作製して、スクリーニングしてもよい。Lowman, Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:401-24 (1997)。

【0084】

10

タンパク質-タンパク質相互作用の構造分析も、大型タンパク質リガンドの結合活性を模倣するペプチドを示唆するために使用しうる。そのような分析においては、結晶構造が大型タンパク質リガンドの決定的に重要な残基の同一性と相対的方向を示唆することができ、それらからペプチドを設計しうる。例えば、Takasakiら、Nature Biotech 15:1266-70 (1997) 参照。これらの分析方法はまた、受容体タンパク質とファージディスプレイによって選択されたペプチドの間の相互作用を検討するためにも使用でき、そのような検討は、結合親和性を高めるためのペプチドのさらなる修飾を示唆しうる。

【0085】

20

他の方法も、ペプチド研究においてファージディスプレイにひけをとらない。ペプチドライブラリーをlacリプレッサーのカルボキシル末端に融合して、大腸菌において発現させることができる。もう1つの大腸菌に基づく方法は、ペプチドグリカン関連リポタンパク質(PAL)との融合によって細胞の外膜上に表示させる。以下、これら及び関連する方法を集合的に「大腸菌ディスプレイ」と称する。もう1つの方法では、ランダムなRNAの翻訳をリボソーム放出の前で停止させて、それらの関連RNAがまだ結合しているポリペプチドのライブラリーを生じさせる。以下、これ及び関連する方法を集合的に「リボソームディスプレイ」と称する。他の方法は、RNAへのペプチドの化学結合を使用する。例えば、RobertsとSzostak, Proc Natl Acad Sci USA, 94:12297-303 (1997) 参照。以下、これ及び関連する方法を集合的に「RNAペプチドスクリーニング」と称する。ペプチドがポリエチレンロッド又は溶媒透過性樹脂などの安定な非生物学的物質上に固定されている、化学的に誘導されるペプチドライブラリーが開発された。もう1つの化学的に誘導されるペプチドライブラリーは、スライドガラス上に固定されたペプチドを走査するために写真平板法(photolithography)を使用する。以下、これら及び関連する方法を集合的に「化学的ペプチドスクリーニング」と称する。化学的ペプチドスクリーニングは、D-アミノ酸及び他の非天然類似体、ならびに非ペプチドエレメントの使用を可能にするという点で有利である。生物学的な方法と化学的方法の両方がWellsとLowman, Curr. Opin. Biotechnol., 3:355-62 (1992) に総説されている。

30

【0086】

40

概念的には、ファージディスプレイ及び上述した他の方法を用いてあらゆるタンパク質のペプチドミメティックを発見しうる。これらの方法は、エピトープマッピングのため、タンパク質-タンパク質相互作用における重要アミノ酸の特定のため、及び新しい治療物質の発見のための手がかり(lead)として使用されてきた。例えば、Corteseら、Curr. Opin. Biotechnol., 7:616-21 (1996) 参照。ペプチドライブラリーは現在、エピトープマッピングなどの免疫学的試験において最も頻繁に使用されている。Kreeger, The Scientist 10(13):19-20 (1996) 参照。

【0087】

ファージディスプレイライブラリーのスクリーニングによって特定されるペプチドは、治療薬としてよりはむしろ治療薬の開発における「手がかり」とみなされてきた。他のタ

50

ンパク質及びペプチドと同様に、それらは腎ろ過によって、細網内皮系における細胞クリアランス機序によって、又はタンパク質分解によって、インビボで速やかに除去され则认为られる〔Francis、前出〕。その結果、この技術分野では現在、化学的ライブラリースクリーニングを通してはそれほど容易に又はそれほど速やかに特定されなかったである薬剤標的の有効性を確認するため又は有機化合物の設計のためのたたき台として、ペプチドを使用する〔Lowman、前出；Kayら、前出〕。この技術分野は、そのようなペプチドが血管新生に対する治療薬をより容易に生み出すことができるプロセスから恩恵を受ける。

【0088】

ペプチ体の構造

本発明に従って調製される組成物では、ペプチドは、そのペプチドのN末端又はC末端を通してビヒクルに結合されうる。そこで、本発明のビヒクルペプチド分子は下記の5つの式及びその多量体によって表わしうる：

【0089】

【表6】

$(X_1)_a-F_1-(X_2)_b$	(式Ⅰ)
X_1-F_1	(式Ⅱ)
F_1-X_2	(式Ⅲ)
$F_1-(L_1)_c-P_1$	(式Ⅳ)
$F_1-(L_1)_c-P_1-(L_2)_d-P_2$	(式Ⅴ)

式中、

F^1 は、ビヒクル（好ましくはFcドメイン）であり；

X^1 及び X^2 は、各々独立して： $-(L^1)_c-P^1$ 、 $-(L^1)_c-P^1-(L^2)_d-P^2$ 、 $-(L^1)_c-P^1-(L^2)_d-P^2-(L^3)_e-P^3$ 、及び、 $-(L^1)_c-P^1-(L^2)_d-P^2-(L^3)_e-P^3-(L^4)_f-P^4$

〔式中、 P^1 、 P^2 、 P^3 及び P^4 は、各々独立してここで述べる薬理的に活性なペプチドの配列であり；

L^1 、 L^2 、 L^3 及び L^4 は、各々独立してリンカーである〕

から選択され；及び

「a」、「b」、「c」、「d」、「e」及び「f」は、「a」及び「b」の少なくとも1つが1であることを条件として、各々独立して0又は1である。

【0090】

ペプチド

本発明は、Ang-2に選択的に又は特異的に結合するペプチドを考慮する。いかなる数のそのようなペプチドも本発明に関連して使用しうる。ファージディスプレイは、特に、ランダムペプチドのライブラリーからのアフィニティー選択を使用していかなる遺伝子産物のいかなる部位についてのペプチドリガンドも特定できることが示されたように、本発明において使用するためのペプチドを生成する上で有用である。Dedmanら、J. Biol. Chem. 268:23025-30(1993)。

【0091】

本発明におけるペプチドは、この技術分野において開示されている方法のいずれかによって作製しうる。1文字アミノ酸略語を使用する。何らかの配列（及び特定の場合に異なる規定がない限り、本明細書全体を通じて）中の「X」は、20の天然に生じるアミノ酸残基のいずれか又は何らかの非天然に生じるアミノ酸（下記の「変異体」の章で述べる）が存在しうることを意味する。これらのペプチドのいずれかは、リンカーと共に又はリンカーなしで、縦列に（すなわち連続的に）連結されていてもよく、縦列連結の例は表に示

10

20

30

40

50

されている。リンカーは「L」として列挙されており、ここで述べるリンカーのいずれであってもよい。明瞭にするために縦列反復配列とリンカーはダッシュで分けて示している。システイニル残基を含むいずれのペプチドも、もう1つ別のCys含有ペプチドと架橋することができ、そのいずれか又は両方がビヒクルに連結していてもよい。2個以上のCys残基を有するペプチドは、ペプチド内ジスルフィドも形成しうる。これらのペプチドのいずれもがここで述べるように誘導体化しうる。カルボキシル末端がアミノ基でキャップされうる誘導体については、そのキャップアミノ酸は -NH_2 である。アミノ酸残基がアミノ酸残基以外の成分で置換される誘導体については、その置換基はSで表わされ、参照してここに組み込まれる、Bhatnagarら、J. Med. Chem. 39:3814-9 (1996)、及びCuthbertsonら、J. Med. Chem. 40:2876-82 (1997)に述べられている成分のいずれかを意味する。すべてのペプチドは、特に異なる記載がない限り、ペプチド結合を通して連結される。

10

【0092】

ビヒクル

1つの実施形態では、本発明は、そのペプチドのN末端、C末端又はアミノ酸残基の1個の側鎖を通して少なくとも1つのビヒクル(F_1 、 F_2)に結合する少なくとも1個のペプチドを提供する。多数のビヒクルも使用しうる；例えば各々の末端のFc、又は1つの末端のFcと他方の末端又は側鎖のPEG基。

【0093】

Fcドメインは1つの好ましいビヒクルである。Fcドメインは、ペプチドのN又はC末端に、又はN末端とC末端の両方で融合しうる。

20

【0094】

上述したように、Fc変異体は本発明の範囲内の適切なビヒクルである。天然Fcは、サルベージ受容体への結合が維持されることを条件として、本発明に従ったFc変異体を形成するために広汎に修飾しうる。例えばWO97/34631号及びWO96/32478号参照。そのようなFc変異体においては、本発明の融合分子には必要でない構造的特徴又は機能的活性を提供する天然Fcの1又はそれ以上の部位を除去しうる。これらの部位は、例えば残基を置換するか又は欠失させる、残基をその部位に挿入する、又はその部位を含む部分を切り取ることによって除去しうる。挿入又は置換残基は、ペプチドミメティック又はD-アミノ酸などの変化したアミノ酸であってもよい。Fc変異体は多くの理由から望ましいと考えられ、そのいくつかを下記で述べる。例示的Fc変異体は次のような分子及び配列を含む：

30

【0095】

1. ジスルフィド結合の形成に関与する部位が除去されている。そのような除去は、本発明の分子を生産するために使用する宿主細胞中に存在する、他のシステイン含有タンパク質との反応を回避しうる。このために、N末端のシステイン含有セグメントを切り取るか、又はシステイン残基を欠失させる又は他のアミノ酸（例えばアラニル、セリル）で置換しうる。システイン残基が除去されているときでも、一本鎖Fcドメインはなお、非共有結合的に結合保持される二量体Fcドメインを形成することができる。

【0096】

40

2. 天然Fcが、選択宿主細胞とより適合性になるように修飾されている。例えば、プロリンイミノペプチダーゼなどの大腸菌内の消化酵素によって認識されうる、典型的天然FcのN末端近くのPA配列を除去しうる。また、特にその分子が大腸菌などの細菌細胞において組換え発現されるときは、N末端メチオニル残基を付加してもよい。

【0097】

3. 選択宿主細胞において発現されたときのN末端の異質性を防ぐために天然FcのN末端の一部が除去されている。このために、N末端の最初の20アミノ酸残基のいずれか、特に1、2、3、4及び5番の位置のものを欠失させうる。

【0098】

4. 1又はそれ以上のグリコシル化部位が除去されている。典型的にグリコシル化され

50

る残基（例えばアスパラギン）は細胞溶解応答を付与しうる。そのような残基を欠失させるか又は非グリコシル化残基（例えばアラニン）で置換しうる。

【0099】

5. C1q結合部位などの、相補物との相互作用に関与する部位が除去されている。例えば、ヒトIgG1のEKK配列を欠失させるか又は置換しうる。相補物の集積は本発明の分子にとって有益ではないと考えられ、それ故そのようなFc変異体で回避しうる。

【0100】

6. サルベージ受容体以外のFc受容体への結合に影響を及ぼす部位が除去されている。天然Fcは、本発明の融合分子には必要でないある種の白血球との相互作用のための部位を有すると考えられ、そのため除去しうる。

10

【0101】

7. ADCC部位が除去されている。ADCC部位はこの技術分野において既知である。例えば、IgG1のADCC部位に関してはMol. Immunol. 29(5): 633-9 (1992) 参照。これらの部位もやはり、本発明の融合分子には必要でないため、除去しうる。

【0102】

8. 天然Fcが非ヒト抗体から誘導されるときは、天然Fcをヒト化しうる。典型的には、天然Fcをヒト化するために、非ヒト天然Fc中の選択残基を、ヒト天然Fcにおいて通常認められる残基で置換する。抗体のヒト化のための手法はこの技術分野において周知である。

20

【0103】

選択的ビヒクルは、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、抗体、抗体フラグメント、又はサルベージ受容体に結合することができる小分子（例えばペプチドミメティック化合物）である。例えば、Prestaらへの1998年4月14日発行の米国特許第5,739,277号に述べられているポリペプチドをビヒクルとして使用することができる。ペプチドはまた、FcRnサルベージ受容体への結合に関してファージディスプレイから選択することもできる。そのようなサルベージ受容体結合化合物も「ビヒクル」の意味に包含され、本発明の範囲内である。そのようなビヒクルは、高い半減期（例えばプロテアーゼによって認識される配列を避けることによって）及び低い免疫原性（例えば抗体ヒト化において発見されるような、非免疫原性配列を優先することによって）のために選択すべきである。

30

【0104】

上述したように、ポリマービヒクルもF₁及びF₂について使用しうる。ビヒクルとして有用な化学的成分を結合するための様々な手段が現在使用可能であり、例えば、その全体が参照してここに組み込まれる、「N末端化学修飾タンパク質組成物と方法（N-Terminally Chemically Modified Protein Compositions and Methods）」と題された特許協力条約（「PCT」）国際公開広報WO96/11953号参照。このPCT出願は、中でも特に、タンパク質のN末端への水溶性ポリマーの選択的結合を開示している。

【0105】

40

好ましいポリマービヒクルはポリエチレングリコール（PEG）である。PEG群はいかなる好都合な分子量でもよく、線状又は分枝のいずれでもよい。PEGの平均分子量は、好ましくは約2キロダルトン（「kDa」）から約100kDa、より好ましくは約5kDa-約50kDa、最も好ましくは約5kDa-約10kDaの範囲である。PEG群は一般に、PEG成分上の反応基（例えばアルデヒド、アミノ、チオール又はエステル基）を通して、本発明の化合物上の反応基（例えばアルデヒド、アミノ又はエステル基）へのアシル化又は還元的アルキル化によって本発明の化合物に結合する。

【0106】

合成ペプチドのPEG化のための有用な戦略は、溶液中でコンジュゲート結合を形成することを通して、各々他方に対して相互に反応性である特殊な官能性を担う、ペプチドと

50

P E G成分を結合することから成る。前記ペプチドは、この技術分野で知られているような従来の固相合成によって容易に作製できる。そのペプチドを特定部位で適切な官能基によって「前活性化」する。その前駆物質を精製し、P E G成分と反応させる前に十分に特性付ける。ペプチドとP E Gの連結は通常水相で起こり、逆相分析用H P L Cによって容易にモニターできる。P E G化したペプチドは分取H P L Cによって容易に精製でき、分析用H P L C、アミノ酸分析及びレーザー脱着質量分析によって特性付けることができる。

【0107】

多糖類ポリマーは、タンパク質修飾のために使用しうるもう1つの種類の水溶性ポリマーである。デキストランは、主としてα1-6結合によって連結された個々のサブユニットのグルコースから成る多糖類ポリマーである。デキストラン自体は多くの分子量範囲内で入手可能であり、約1 k D aー約70 k D aの分子量で容易に入手できる。デキストランは、それだけで又はもう1つ別のビヒクル（例えばF c）と組み合わせて、ビヒクルとして本発明において使用するのに適した水溶性ポリマーである。例えば、W O 9 6 / 1 1 9 5 3号及びW O 9 6 / 0 5 3 0 9号参照。治療用又は診断用免疫グロブリンに複合したデキストランの使用が報告されている；例えば、参照してここに組み込まれる、欧州特許出願公開第0315456号参照。デキストランを本発明に従ってビヒクルとして使用するときは、約1 k D aー約20 k D aのデキストランが好ましい。

【0108】

リンカー

いかなる「リンカー」基も任意である。存在するときは、主としてスペーサーとして働くので、その化学構造は決定的に重要ではない。リンカーは、好ましくはペプチド結合によって共に連結されたアミノ酸で構成される。そこで、好ましい実施形態では、リンカーはペプチド結合によって連結された1個から20個のアミノ酸で構成され、それらのアミノ酸は20の天然に生じるアミノ酸から選択される。当業者には十分に理解されるように、これらのアミノ酸の1個又はそれ以上がグリコシル化されていてもよい。より好ましい実施形態では、1個から20個のアミノ酸は、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミン及びリシンから選択される。さらに一層好ましくは、リンカーは、グリシン及びアラニンなどの立体障害されないアミノ酸が大部分を占めて構成される。それ故、好ましいリンカーは、ポリグリシン（特に（G l y）₅、（G l y）₈）、ポリ（G l y - A l a）及びポリアラニンである。G l yとA l aの組合せも、ここではK 1と称する、本文中の実施例において示すアミノ酸配列を有するリンカーと同様に好ましい。

【0109】

非ペプチドリンカーも可能である。例えば、-NH-（C H₂）_s-C（O）-〔式中、s = 2 - 20〕などのアルキルリンカーが使用できる。これらのアルキルリンカーは、低級アルキル（例えばC₁-C₆）低級アシル、ハロゲン（例えばC l、B r）、C N、N H₂、フェニル等などの非立体障害基によってさらに置換されうる。例示的な非ペプチドリンカーはP E Gリンカーであり、100-5000 k D a、好ましくは100-500 k D aの分子量を有する。ペプチドリンカーは、上述したのと同様にして誘導体を形成するように変化させうる。

【0110】

変異体及び誘導体

特異的結合物質の変異体及び誘導体は本発明の範囲内に包含される。挿入、欠失及び置換変異体の変異体に包含される。本発明の個々の特異的結合物質が1、2又は3種類すべての変異体を含みうることは明白である。挿入及び置換変異体は、天然アミノ酸、非通常アミノ酸（下記で述べるような）、又はその両方を含みうる。

【0111】

一例では、天然に生じる又は非通常アミノ酸のいずれかの、1個又はそれ以上のアミノ酸残基が、ペプチド又はペプチ体のアミノ酸配列を補足する挿入変異体が提供される。挿入は、タンパク質のいずれか一方又は両方の末端に位置するか、又はペプチ体アミノ酸配

10

20

30

40

50

列の内部領域内に位置しうる。いずれか一方又は両方の末端に付加残基を有する挿入変異体は、例えば、融合タンパク質及びアミノ酸タグ又は標識を含むタンパク質を包含しうる。挿入変異体は、1個又はそれ以上のアミノ酸残基がペプチド又はペプチ体アミノ酸配列に付加されているペプチド及びペプチ体、又はそのフラグメントを含む。

【0112】

本発明の変異体産物はまた、リーダー又はシグナル配列が除去されており、生じるタンパク質が付加アミノ末端残基を有し、そのアミノ酸が天然又は非天然でありうる、成熟ペプチド及びペプチ体を包含する。 -1 のアミノ酸位置に付加メチオニル残基を有する特異的結合物質（ペプチ体など）（ Met^{-1} -ペプチ体）が、 -2 及び -1 の位置に付加メチオニン及びリシン残基を有する特異的結合物質（ Met^{-2} - Lys^{-1} -）と同様に考慮される。付加 Met 、 Met-Lys 、 Lys 残基（又は一般に1個又はそれ以上の塩基性残基）を有する変異体は、細菌宿主細胞における組換えタンパク質生産の増強のために特に有用である。

10

【0113】

本発明はまた、特定発現系の使用から生じる付加アミノ酸残基を有する特異的結合物質変異体を包含する。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）融合産物の一部として所望ポリペプチドを発現する市販のベクターを使用することにより、所望ポリペプチドからGST成分を開裂した後、 -1 アミノ酸位置に付加グリシン残基を有する所望ポリペプチドが提供される。ポリ-ヒスチンタグが、一般にアミノ酸配列のカルボキシ及び／又はアミノ末端でアミノ酸配列に組み込まれているものを含む、他のベクター系における発現から生じる変異体も考慮される。

20

【0114】

挿入変異体はまた、ペプチド又はペプチ体のアミノ及び／又はカルボキシ末端がもう1つ別のポリペプチド、そのフラグメント又は一般に何らかの特定タンパク質配列の一部であるとは認識されないアミノ酸に融合している融合タンパク質も包含する。そのような融合タンパク質の例は、免疫原性ポリペプチド、免疫グロブリン定常領域などの長い循環半減期を有するタンパク質、マーカータンパク質、所望ペプチド又はペプチ体の精製を容易にするタンパク質又はポリペプチド、及び多量体タンパク質の形成を促進するポリペプチド配列（二量体の形成／安定性において有用なロイシンジッパーモチーフなど）である。

【0115】

この種の挿入変異体は一般に、N又はC末端で第二ポリペプチドの全部又は一部に連結された天然分子の全部又は実質的な部分を有する。例えば、融合タンパク質は、典型的には異種宿主におけるタンパク質の組換え発現を可能にする他の種からのリーダー配列を使用する。もう1つの有用な融合タンパク質は、その融合タンパク質の精製を容易にするための、抗体エпитープなどの免疫学的に活性なドメインの付加を含む。融合の接合点又はその近くに開裂部位を含むことは、精製後の外来性ポリペプチドの除去を容易にする。他の有用な融合は、酵素からの活性部位などの機能的ドメイン、グリコシル化ドメイン、細胞ターゲティングシグナル又は膜貫通領域の連結を含む。

30

【0116】

本発明において使用しうる様々な市販の融合タンパク質発現系が存在する。特に有用な系は、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）系（Pharmacia）、マルトース結合タンパク質系（NEB, Beverly, MA）、FLAG系（IBI, New Haven, CT）、及び6xHis系（Qiagen, Chatsworth, CA）を含むが、これらに限定されない。これらの系は、そのペプチド又はペプチ体の活性に有意の影響を及ぼさないと考えられる、少数の付加アミノ酸だけを担う組換えペプチド及び／又はペプチ体を生産することができる。例えば、FLAG系と6xHis系は、そのいずれもが、抗原性が低いことが知られており、ポリペプチドのその天然立体配座への折りたたみに有害な作用を及ぼさない短い配列だけを付加する。有用と考えられるもう1つのN末端融合は、タンパク質又はペプチドのN末端領域における Met-Lys ジペプチドの融合である。そのような融合は、タンパク質の発現又は活性の有益な上昇をもた

40

50

らしうる。

【0117】

他の融合系は、所望ペプチド又はペプチ体から融合パートナーを切り出すことが望ましいポリペプチドハイブリッドを生産する。1つの実施形態では、融合パートナーは、プロテアーゼについての特異的認識配列を含むペプチド配列によって組換えペプチ体に連結される。適切な配列の例は、Tobacco Etch Virusプロテアーゼ (Life Technologies, Gaithersburg, MD) 又は第Xa因子 (New England Biolabs, Beverly, MA) によって認識されるものである。

【0118】

本発明はまた、トランケート型組織因子 (tTF) と組み合わせて、本発明のペプチ体又はペプチドの全部又は一部を含む融合ポリペプチドを提供する。tTFは、米国特許第5, 877, 289号; 同第6, 004, 555号; 同第6, 132, 729号; 同第6, 132, 730号; 同第6, 156, 321号; 及び欧州特許第EP0988056号に述べられているように、腫瘍血管凝固物質として働くヒト凝固誘導タンパク質のトランケート型形態から成る。抗Ang-2ペプチ体又はペプチド、又はそのフラグメントへのtTFの融合は、標的細胞への抗Ang-2の送達を促進する。

【0119】

もう1つの局面では、本発明は、ペプチド又はペプチ体内の1個又はそれ以上のアミノ酸残基が除去されている欠失変異体を提供する。欠失は、ペプチ体の一方又は両方の末端において、又はペプチ体アミノ酸配列内の1個又はそれ以上の残基の除去から、実施することができる。欠失変異体は必然的にペプチド又はペプチ体のすべてのフラグメントを含む。

【0120】

さらにもう1つの局面では、本発明は、本発明のペプチド及びペプチ体の置換変異体を提供する。置換変異体は、1個又はそれ以上のアミノ酸残基が除去されて、天然又は非天然に生じる、1個又はそれ以上の代替アミノ酸で置換されているペプチド及びペプチ体を含む。置換変異体は、その2個の分子がある程度のパーセンテージの同一アミノ酸を有するという点で、もとのペプチド又はペプチ体に「類似」するペプチド又はペプチ体を生じる。置換変異体は、ペプチド又はペプチ体内に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30個のアミノ酸の置換を含み、置換の数は該ペプチド又はペプチ体のアミノ酸の10%又はそれ以上まででありうる。1つの局面では、置換は本来保存的であるが、本発明は非保存的である置換も包含し、また非通常アミノ酸も含む。

【0121】

関連ペプチド及びペプチ体の同一性及び類似性は既知の方法によって容易に算定できる。そのような方法は、Computational Molecular Biology, Lesk, A. M. 編集、Oxford University Press, New York (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W. 編集、Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M. とGriffin, H. G. 編集、Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. とDevereux, J. 編集、M. Stockton Press, New York (1991); 及びCarilloら、SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988) に述べられているものを含むが、これらに限定されない。

【0122】

2個のペプチド又はペプチ体、又はポリペプチドとペプチドの関連性又はパーセント同

10

20

30

40

50

一性を決定するための好ましい方法は、検討する配列の間で最大の対合を与えるように設計する。同一性を決定するための方法は、公的に使用可能なコンピュータプログラムの中に述べられている。2つの配列間の同一性を決定するための好ましいコンピュータプログラム法は、GAP (Devereuxら、Nuc l. Acid. Res. , 12:387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI、BLASTP、BLASTN、及びFASTA (Altschulら、J. Mol. Biol. , 215:403-410 (1990))を含む、GCGプログラムパッケージを含むが、これらに限定されない。BLASTXプログラムは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) 及び他のソース (BLAST Manual, Altschulら、NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschulら、前出 (1990)) より公的に入手可能である。周知のSmith Watermanアルゴリズムも同一性を決定するために使用しうる。

【0123】

2個のアミノ酸配列を整列化するための一部の整列スキームは、2つの配列の短い領域だけの対合を生じることがあり、この小さな整列領域は、その2つの完全長配列の間に有意の関係がない場合でも、非常に高い配列同一性を有しうる。従って、一部の実施形態では、選択した整列方法 (GAPプログラム) は、比較する標的ポリペプチドの完全長の少なくとも10%に及ぶ整列化、すなわち少なくとも400アミノ酸の配列を比較する場合は少なくとも40個の隣接アミノ酸、少なくとも300-約400アミノ酸の配列を比較する場合は30個の隣接アミノ酸、200-約300アミノ酸の配列を比較する場合は少なくとも20個の隣接アミノ酸、約100-200アミノ酸の配列を比較する場合は少なくとも10個の隣接アミノ酸を生じる。

【0124】

例えば、コンピュータアルゴリズムGAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI) を使用して、パーセント配列同一性を決定しようとする2個のポリペプチドを、それらのそれぞれのアミノ酸が最適対合するように (アルゴリズムによって決定される「対合スパン」) 整列する。一部の実施形態では、ギャップ開始ペナルティー (典型的には3X平均対角線として算定される; 「平均対角線」は、使用する比較マトリックスの対角線の平均値である; 「対角線」は、個々の比較マトリックスによって各々完全なアミノ酸対合に割り当てられるスコア又は数値である) 及びギャップ伸長ペナルティー (通常ギャップ開始ペナルティーの1/10である)、ならびにPAM250又はBLOSUM62などの比較マトリックスをこのアルゴリズムと共に使用する。一部の実施形態では、標準比較マトリックス (PAM250比較マトリックスについてはDayhoffら、Atlas of Protein Sequence and Structure, 5(3) (1978); BLOSUM62比較マトリックスについてはHenikoffら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915-10919 (1992) 参照) もこのアルゴリズムによって使用される。

【0125】

一部の実施形態では、ポリペプチド配列比較のためのパラメータは次のものを含む:

アルゴリズム: Needlemanら、J. Mol. Biol. , 48:443-453 (1970);

比較マトリックス: Henikoffら、前出 (1992) からのBLOSUM62;

ギャップペナルティー: 12

ギャップ長ペナルティー: 4

類似性の閾値: 0

GAPプログラムは上記のパラメータに関して有用でありうる。一部の実施形態では、上記のパラメータは、GAPアルゴリズムを使用したポリペプチド比較のためのデフォルトパラメータ (末端ギャップについてのペナルティーなし) である。

【0126】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチド分子配列（アミノ酸配列に対して）比較についてのパラメータは次のものを含む：

アルゴリズム：Needlemanら、前出（1970）；

比較マトリックス：対合＝＋10、不適正対合＝0

ギャップペナルティー：50

ギャップ長ペナルティー：3

GAPプログラムは上記のパラメータに関しても有用でありうる。上記のパラメータは、ポリヌクレオチド分子比較のためのデフォルトパラメータである。

【0127】

Program Manual, Wisconsin Package, バージョン9、1997年9月に述べられているものを含む、他の例示的なアルゴリズム、ギャップ開始ペナルティー、ギャップ伸長ペナルティー、比較マトリックス、類似性の閾値等も使用しうる。行うべき個々の選択は当業者には明白であり、DNA対DNA、タンパク質対タンパク質、タンパク質対DNAなどの、実施する特定の比較、及びそれに加えて、比較を所与の配列の対の間で行うか（この場合は一般にGAP又はBest Fitが好ましい）又は1個の配列と配列の大きなデータベースの間で行うか（この場合はFASTA又はBLASTAが好ましい）に依存する。

【0128】

ここで使用するとき、20の通常アミノ酸及びそれらの略語は慣例的用法に従う。参照してここに組み込まれる、Immunology—A Synthesis（第2版、E. S. GolubとD. R. Gren編集、Sinauer Associates, Sunderland, Mass.（1991））参照。

【0129】

アミノ酸はL型又はD型立体化学のいずれかを有しており（Glyを除く、GlyはLでもDでもない）、本発明のポリペプチド及び組成物は立体化学の組合せを含みうる。しかし、L立体化学が好ましい。本発明はまた、アミノ酸のアミノ末端からカルボキシ末端への配列が逆転している逆分子（reverse molecule）を提供する。例えば、正常配列 $X_1-X_2-X_3$ を有する分子の逆は、 $X_3-X_2-X_1$ である。本発明はまた、上記のように、アミノ酸のアミノ末端からカルボキシ末端への配列が逆転しており、且つ通常「L」鏡像異性体である残基が「D」立体異性体に変化しているレトロ逆分子を提供する。

【0130】

20の通常アミノ酸、 α —、 α —二置換アミノ酸、N—アルキルアミノ酸、乳酸などの非天然アミノ酸、及び他の非通常アミノ酸の立体異性体（例えばD—アミノ酸）も、本発明のポリペプチドのための適切な成分でありうる。非通常アミノ酸の例は、限定を伴わずに次のものを含む：アミノアジピン酸、 β —アラニン、 β —アミノプロピオン酸、アミノ酪酸、ピペリジン酸、アミノカプロン酸、アミノヘプタン酸、アミノイソ酪酸、アミノピメリン酸、ジアミノイソ酪酸、デスモシン、ジアミノピメリン酸、ジアミノプロピオン酸、N—エチルグリシン、N—エチルアスパラギン、ヒドロキシリシン、アロヒドロキシリシン、ヒドロキシプロリン、イソデスモシン、アロイソロイシン、N—メチルグリシン、サルコシン、N—メチルイソロイシン、N—メチルバリン、ノルバリン、ノルロイシン、オルニチン、4—ヒドロキシプロリン、 γ —カルボキシグルタミン酸、 ϵ —N，N，N—トリメチルリシン、 ϵ —N—アセチルリシン、O—ホスホセリン、N—アセチルセリン、N—ホルミルメチオニン、3—メチルヒスチジン、5—ヒドロキシリシン、 σ —N—メチルアルギニン、及び他の類似アミノ酸（例えば4—ヒドロキシプロリン）。

【0131】

同様に、特に異なる規定がない限り、一本鎖ポリヌクレオチド配列の左側の末端は5'末端である；二本鎖ポリヌクレオチド配列の左側方向を5'側方向と称する。発生期RNA転写産物の5'から3'への付加の方向を転写方向と称する；RNAと同じ配列を有し

10

20

30

40

50

、RNA転写産物の5'側から5'末端までにある、DNA鎖上の配列領域を「上流配列」と称する；RNAと同じ配列を有し、RNA転写産物の3'側から3'末端までにある、DNA鎖上の配列領域を「下流配列」と称する。

【0132】

アミノ酸残基がそれらの共通の側鎖特性に基づくクラスに分類できることは認識される：

【0133】

1. 中性疎水性：アラニン (Ala; A)、バリン (Val; V)、ロイシン (Leu; L)、イソロイシン (Ile; I)、プロリン (Pro; P)、トリプトファン (Trp; W)、フェニルアラニン (Phe; F) 及びメチオニン (Met; M)。

10

【0134】

2. 中性極性：グリシン (Gly; G)、セリン (Ser; S)、トレオニン (Thr; T)、チロシン (Tyr; Y)、システイン (Cys; C)、グルタミン (Glu; Q)、アスパラギン (Asn; N) 及びノルロイシン。

【0135】

3. 酸性：アスパラギン酸 (Asp; D)、グルタミン酸 (Glu; E)。

【0136】

4. 塩基性：リシン (Lys; K)、アルギニン (Arg; R)、ヒスチジン (His; H)。

【0137】

Lewin, B., Genes V, Oxford University Press (1994), p. 11 参照。

20

【0138】

保存的アミノ酸置換は、典型的には生物系における合成によってではなく化学的ペプチド合成によって組み込まれる、非通常アミノ酸残基を包含しうる。これらは、限定を伴わずに、ペプチドミメティック及び他の逆又は逆転形態のアミノ酸成分を含む。非保存的置換は、これらのクラスの1つの成員がもう1つ別のクラスの成員に交換されることを含む。

【0139】

そのような変更を行う場合、一部の実施形態によれば、アミノ酸の疎水親水指数を考慮しうる。各々アミノ酸は、そのヒドロパシー（疎水親水性）及び電荷特性に基づいて疎水親水指数を割り当てられている。それらは：イソロイシン (+4.5)；バリン (+4.2)；ロイシン (+3.8)；フェニルアラニン (+2.8)；システイン／シスチン (+2.5)；メチオニン (+1.9)；アラニン (+1.8)；グリシン (-0.4)；トレオニン (-0.7)；セリン (-0.8)；トリプトファン (-0.9)；チロシン (-1.3)；プロリン (-1.6)；ヒスチジン (-3.2)；グルタミン酸 (-3.5)；グルタミン (-3.5)；アスパラギン酸 (-3.5)；アスパラギン (-3.5)；リシン (-3.9)；及びアルギニン (-4.5) である。

30

【0140】

タンパク質に相互作用性生物学的機能を付与する上でのアミノ酸疎水親水指数の重要性はこの技術分野において理解されている。Kyteら、J. Mol. Biol., 157: 105-132 (1982)。一部のアミノ酸は、類似した疎水親水指数又はスコアを有する他のアミノ酸に置換されうること、そしてそれでもなお同様の生物活性を保持しうるということが知られている。疎水親水指数に基づいて変更を行う場合、一部の実施形態では、その疎水親水指数が±2以内であるアミノ酸の置換が含まれる。一部の実施形態では、±1以内であるものが含まれ、また一部の実施形態では、±0.5以内であるものが含まれる。

40

【0141】

また、類似アミノ酸の置換は、特に、本発明の場合のように、それによって創造される生物学的に機能性のペプチド又はペプチドが免疫学的実施形態における使用を意図される

50

場合は、疎水性に基づいて有効に実施しうることも、この技術分野において理解されている。一部の実施形態では、その隣接アミノ酸の親水性に支配される、タンパク質の最大局所平均親水性は、その免疫原性と抗原性、すなわちタンパク質の生物学的特性と相関する。

【0142】

次のような親水性値がこれらのアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン（+3.0）；リシン（+3.0）；アスパラギン酸（+3.0±1）；グルタミン酸（+3.0±1）；セリン（+0.3）；アスパラギン（+0.2）；グルタミン（+0.2）；グリシン（0）；トレオニン（-0.4）；プロリン（-0.5±1）；アラニン（-0.5）；ヒスチジン（-0.5）；システイン（-1.0）；メチオニン（-1.3）；バリン（-1.5）；ロイシン（-1.8）；イソロイシン（-1.8）；チロシン（-2.3）；フェニルアラニン（-2.5）；及びトリプトファン（-3.4）。類似親水性値に基づいて変更を行う場合、一部の実施形態では、その親水性値が±2以内であるアミノ酸の置換が含まれ、一部の実施形態では、±1以内であるものが含まれ、また一部の実施形態では、±0.5以内であるものが含まれる。また、親水性値に基づいて一次アミノ酸配列からエピトープを特定しうる。これらの領域は「エピトープコア領域」とも称される。

【0143】

例示的アミノ酸置換を下記の表2に示す。

【0144】

【表7】

アミノ酸置換

もとの残基	例示的置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln, Glu, Asp	Gln
Asp	Glu, Gln, Asp	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn, Glu, Asp	Asn
Glu	Asp, Gln, Asn	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ヲロイシ	Leu
Leu	ヲロイシ, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1, 4ジアミノ酪酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ヲロイシ	Leu

【0145】

当業者は、周知の手法を使用してここで述べるようなポリペプチドの適切な変異体を決定的ことができる。一部の実施形態では、当業者は、活性にとって重要ではないと考えられる領域を標的することにより、活性を破壊することなく変更しうる分子の適切な領域を特定しうる。一部の実施形態では、類似ペプチド又はポリペプチド間で保存される分子

の残基及び部分を特定することができる。一部の実施形態では、生物活性にとって又は構造にとって重要と考えられる領域でさえも、生物活性を破壊することなく又はポリペプチド構造に有害な影響を及ぼすことなく、保存的アミノ酸置換に供することができる。

【0146】

加えて、当業者は、活性又は構造にとって重要である類似ポリペプチド内の残基を特定する構造－機能試験を検討することができる。そのような比較に鑑みて、類似タンパク質内の活性又は構造にとって重要なアミノ酸残基に対応する、タンパク質内のアミノ酸残基の重要性を予測することができる。当業者は、そのような予測上の重要アミノ酸残基に関して化学的に類似するアミノ酸置換を選択しうる。

【0147】

当業者はまた、類似ポリペプチドにおける構造に関連付けて三次元構造及びアミノ酸配列を分析することができる。そのような情報に鑑みて、当業者は、その三次元構造に関する抗体のアミノ酸残基の整列を予測しうる。一部の実施形態では、当業者は、タンパク質の表面上に存在すると予測されるアミノ酸残基に根本的な変化を加えないことを選択しうる。そのような残基は他の分子との重要な相互作用に関与すると考えられるからである。さらに、当業者は、各々の所望アミノ酸残基における1個のアミノ酸置換を含む試験変異体を生成しうる。次のその変異体を、当業者に既知の活性検定を使用してスクリーニングすることができる。そのような変異体は、適切な変異体についての情報を収集するために使用できる。例えば、特定アミノ酸残基への変更が活性の破壊、望ましくない活性低下、又は不適切な活性をもたらすことを発見した場合は、そのような変更を有する変異体を回避しうる。言い換えると、そのような常用実験から収集した情報に基づいて、当業者は、単独で又は他の突然変異と組み合わせて、さらなる置換を避けるべきアミノ酸を容易に決定することができる。

【0148】

多くの学術公表文献が二次構造の予測に当てられている。Moult J., Curr. Op. in Biotech., 7(4):422-427 (1996)、Chouら、Biochemistry, 13(2):222-245 (1974); Chouら、Biochemistry, 113(2):211-222 (1974); Chouら、Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47:45-148 (1978) Chouら、Ann. Rev. Biochem., 47:251-276及びChouら、Biophys. J., 26:367-384 (1979) 参照。さらに、二次構造の予測を助けるためにコンピュータプログラムが現在使用可能である。二次構造を予測する1つの方法は、ホモロジーモデリングに基づく。例えば、30%以上の配列同一性又は40%以上の類似性を有する2個のポリペプチド又はタンパク質は、しばしば類似した構造トポロジーを有する。タンパク質構造データベース(PDB)の最近の成長は、ポリペプチド又はタンパク質の構造内の潜在的な折りたたみの数を含む、二次構造の高い予測能力を提供した。Holmら、Nucl. Acid. Res., 27(1):244-247 (1999) 参照。所与のポリペプチド又はタンパク質内には限られた数の折りたたみが存在すること及びひとたび重要な数の構造が解明されれば、構造予測は劇的により正確になると示唆されている(Brennerら、Curr. Op. Struct. Biol., 7(3):369-376 (1997))。

【0149】

二次構造を予測するさらなる方法は、「スレッディング法」(Jones, D., Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3):377-87 (1997); Sipplら、Structure, 4(1):15-19 (1996))、「プロフィール分析」(Bowieら、Science, 253:164-170 (1991); Gribskovら、Meth. Enzym., 183:146-159 (1990); Gribskovら、Proc. Nat. Acad. Sci., 84(13):4355-4358 (1987))、及び「進化的連鎖(evolutionary linkage)」(Holm, 前出(1999)、及びBrenner, 前出(1997))を含む。

【0150】

一部の実施形態では、ペプチ体変異体は、N-結合グリコシル化部位などの1又はそれ以上のグリコシル化部位が該ペプチ体に付加されたグリコシル化変異体を含む。N-結合グリコシル化部位は、配列：Asn-X-Ser又はAsn-X-Thr〔式中、Xで表わされるアミノ酸残基はプロリン以外のいかなるアミノ酸残基でもよい〕によって特徴付けられる。この配列を創造するためのアミノ酸残基の置換又は付加は、N-結合糖鎖の付加のための潜在的な新しい部位を提供する。代替的に、この配列を排除する置換は既存のN-結合糖鎖を除去する。また、1又はそれ以上のN-結合グリコシル化部位（典型的には天然に生じるもの）を排除し、1又はそれ以上の新しいN-結合部位を創造するN-結合糖鎖の再配列も提供される。

10

【0151】

本発明はまた、アミノ酸残基の挿入、欠失又は置換以外の又はそれらに加えて、修飾を担うペプチ体を含む「誘導體」を提供する。好ましくは、その修飾は本来共有結合であり、例えば、重合体、脂質、他の有機及び無機成分との化学結合を含む。本発明の誘導體は、ペプチ体の循環半減期を上昇させるように作製しうるか、又は所望細胞、組織又は器官を標的するペプチ体の能力を改善するように設計しうる。

【0152】

例示的な誘導體は、次の修飾の1又はそれ以上が為されている成分を含む：

・ペプチジル $[-C(O)NR-]$ 結合の1つ又はそれ以上が、 $-CH_2-$ カルバメート結合 $[-CH_2-OC(O)NR-]$ ；ホスホネート結合； $-CH_2-$ スルホンアミド $[-CH_2-S(O)_2NR-]$ 結合；尿素 $[-NHC(O)NH-]$ 結合； $-CH_2-$ 第二級アミン結合；又はアルキル化ペプチジル結合 $[-C(O)NR^6-]$ 〔式中、 R^6 は低級アルキルである〕〕などの非ペプチジル結合によって置換されている。

20

【0153】

・N末端が、 $-NRR^1$ 基； $-NRC(O)R$ 基； $-NRC(O)OR$ 基； $-NRS(O)_2R$ 基； $-NHC(O)NHR$ 基〔式中、 R 及び R^1 は、 R と R^1 の両方同時に水素ではないことを条件として、水素又は低級アルキルである〕；ベンジルオキシカルボニル $-NH-(CBZ-NH-)$ 基；フェニル環上に低級アルキル、低級アルコキシ、クロロ及びブromoから成る群より選択される1個から3個の置換基を有するベンジルオキシカルボニル $-NH-$ 基に誘導體化されているペプチド；及び

30

・遊離C末端が $-C(O)R^2$ 〔式中、 R^2 は、低級アルコキシ及び $-NR^3R^4$ 〔式中、 R^3 及び R^4 は水素及び低級アルキルから成る群より独立して選択される〕から成る群より選択される〕に誘導體化されているペプチド。「低級」とは、1個から6個の炭素原子を有する基を意味する。

【0154】

・さらに、個々のアミノ酸の修飾は、該ペプチドの標的アミノ酸残基を、選択した側鎖又は末端残基と反応することができる有機誘導體化試薬と反応させることによって、本発明のポリペプチド又は組成物に導入しうる。下記はその例示である：

リシニル及びアミノ末端残基は、コハク酸又は他のカルボン酸無水物と反応する。これらの物質による誘導體化はリシニル残基の電荷を逆転させる作用を持つ。 α -アミノ含有残基を誘導體化するための他の適切な試薬は、メチルピコリンイミデートなどのイミドエステル；ピリドキサルリン酸；ピリドキサル；クロロホウ水素化物；トリニトロベンゼンスルホン酸；O-メチルイソ尿素；2, 4-ペンタンジオン；及びグリオキシレートとのトランスアミナーゼ触媒反応を含む。

40

【0155】

アルギニル残基は、1個又はいくつかの慣用試薬、中でも特にフェニルグリオキサール、2, 3-ブタンジオン、1, 2-シクロヘキサジオン及びニンヒドリンとの反応によって修飾しうる。アルギニン残基の誘導體化は、グアニジン官能基の高い pK_a の故に、アルカリ性条件下で反応を実施することを必要とする。さらに、これらの試薬はリシンの基ならびにアルギニングアニジノ基と反応しうる。

50

【0156】

チロシン残基の特異的修飾はそれ自体広汎に検討されており、芳香族ジアゾニウム化合物又はテトラニトロメタンとの反応によってチロシル残基にスペクトル標識を導入することに特に関心が寄せられている。最も一般的には、N-アセチルイミジゾール及びテトラニトロメタンを使用して、それぞれO-アセチルチロシル種及び3-ニトロ誘導体を形成しうる。

【0157】

カルボニル側鎖（アスパルチル又はグルタミル）は、1-シクロヘキシル-3-（2-モルホリニル-（4-エチル）カルボジイミド又は1-エチル-3-（4-アゾニア-4, 4-ジメチルペンチル）カルボジイミドなどのカルボジイミド（ $R'-N=C=N-R'$ ）との反応によって代替的に修飾しうる。さらに、アスパルチル及びグルタミル残基は、アンモニウムイオンとの反応によってアスパラギニル及びグルタミニル残基に変換しうる。

【0158】

グルタミニル及びアスパラギニル残基は、しばしば対応するグルタミル及びアスパルチル残基に脱アミド化される。選択的に、これらの残基を弱酸性条件下で脱アミド化しうる。これらの残基のいずれの形態も本発明の範囲内に含まれる。

【0159】

二官能性物質による誘導体化は、ペプチド又はそれらの機能性誘導体を水不溶性支持マトリックス又は他の高分子担体に架橋するために有用である。一般的に使用される架橋剤は、例えば1, 1-ビス（ジアゾアセチル）-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシニミドエステル、例えば4-アジドサリチル酸とのエステル、3, 3'-ジチオビス（スクシニミジルプロピオネート）などのジスクシニミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、及びビス-N-マレイミド-1, 8-オクタンなどの二官能性マレイミドを含む。メチル-3-〔（p-アジドフェニル）ジチオ〕プロピオイミデートなどの誘導体化剤は、光の存在下で架橋を形成することができる光活性化中間体を生じる。代替的に、臭化シアン活性化糖質などの反応性水不溶性マトリックス及び米国特許第3, 969, 287号；同第3, 691, 016号；同第4, 195, 128号；同第4, 247, 642号；同第4, 229, 537号；及び同第4, 330, 440号に述べられている反応性基質がタンパク質の固定化のために使用しうる。

【0160】

他の可能な修飾は、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、Cys中の硫黄原子の酸化、リシン、アルギニン及びヒスチジン側鎖の α -アミノ基のメチル化（Creighton, T. E., *Proteins: Structure and Molecule Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, p. 79-86 (1983)）、N末端アミンのアセチル化及び、一部の場合は、C末端カルボキシル基のアミド化を含む。

【0161】

そのような誘導体化した成分は、好ましくは、該化合物の抗血管新生作用、溶解度、吸収、生物学的半減期等を含む1つ又はそれ以上の特徴を改善する。代替的に、誘導体化成分は、誘導体化されない化合物と同じか又は基本的に同じ特徴及び／又は特性を有する化合物を生じうる。それらの成分は、選択的に、該化合物の望ましくない副作用等を排除しうる又は減じうる。

【0162】

本発明の化合物はDNAレベルでも変化させうる。該化合物のいずれかの部分のDNA配列を、選択する宿主細胞とより適合性のコドンに変更しうる。好ましい宿主細胞である大腸菌については、最適化コドンはこの技術分野において既知である。選択宿主細胞におけるDNAのプロセッシングの助けとなる、制限部位を排除する又は沈黙化制限部位を含むようにコドンを置換することができる。前記の配列変化のいずれかを含むようにビヒクル

、リンカー及びペプチドDNA配列を修飾しうる。従って、ここで論じるすべての修飾、置換、誘導体化等は、ペプチド、ペプチド二量体及び多量体、リンカー及びビヒクルを含む、本発明のすべての局面に等しく適用される。

【0163】

さらに、当業者は、活性又は構造にとって重要である類似ポリペプチド内の残基を特定する構造－機能試験を検討することができる。そのような比較に鑑みて、類似タンパク質内の活性又は構造にとって重要なアミノ酸残基に対応する、タンパク質内のアミノ酸残基の重要性を予測することができる。当業者は、そのような予測上の重要アミノ酸残基に関して化学的に類似するアミノ酸置換を選択しうる。

【0164】

当業者はまた、類似ポリペプチドにおける構造に関連付けて三次元構造及びアミノ酸配列を分析することができる。そのような情報に鑑みて、当業者は、その三次元構造に関する抗体のアミノ酸残基の整列を予測しうる。当業者は、タンパク質の表面上に存在すると予測されるアミノ酸残基に根本的な変化を加えないことを選択しうる。そのような残基は他の分子との重要な相互作用に関与すると考えられるからである。さらに、当業者は、各々の所望アミノ酸残基における1個のアミノ酸置換を含む試験変異体を生成しうる。次のその変異体を、当業者に既知の活性検定を使用してスクリーニングすることができる。そのようなデータは、適切な変異体についての情報を収集するために使用できる。例えば、特定アミノ酸残基への変更が活性の破壊、望ましくない活性低下、又は不適切な活性をもたらすことが発見された場合は、そのような変更を有する変異体は回避される。言い換えると、そのような常用実験から収集した情報に基づいて、当業者は、単独で又は他の突然変異と組み合わせて、さらなる置換を避けるべきアミノ酸を容易に決定することができる。

【0165】

多くの学術公表文献が二次構造の予測に当てられている。Moult J., Curr. Op. in Biotech., 7(4):422-427(1996)、Chouら、Biochemistry, 13(2):222-245(1974); Chouら、Biochemistry, 113(2):211-222(1974); Chouら、Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47:45-148(1978) Chouら、Ann. Rev. Biochem., 47:251-276及びChouら、Biophys. J., 26:367-384(1979) 参照。さらに、二次構造の予測を助けるためにコンピュータプログラムが現在使用可能である。二次構造を予測する1つの方法は、ホモロジーモデリングに基づく。例えば、30%を超える配列同一性又は40%を超える類似性を有する2個のポリペプチド又はタンパク質は、しばしば類似した構造トポロジーを有する。タンパク質構造データベース(PDB)の最近の成長は、ポリペプチド又はタンパク質の構造内の潜在的な折りたたみの数を含む、二次構造の高い予測能力を提供した。Holmら、Nucl. Acid. Res., 27(1):244-247(1999) 参照。所与のポリペプチド又はタンパク質内には限られた数の折りたたみが存在すること及びひとたび重要な数の構造が解明されれば、構造予測は劇的により正確になると示唆されている(Brennerら、Curr. Op. Struct. Biol., 7(3):369-376(1997))。

【0166】

二次構造を予測するさらなる方法は、「スレッディング法」(Jones, D., Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3):377-87(1997); Sipplら、Structure, 4(1):15-19(1996))、「プロフィール分析」(Bowieら、Science, 253:164-170(1991); Gribskovら、Meth. Enzym., 183:146-159(1990); Gribskovら、Proc. Nat. Acad. Sci., 84(13):4355-4358(1987))、及び「進化的連鎖(evolutionary linkage)」(Home, 前出及びBrenner, 前出)を含む。

【0167】

本発明はさらに、誘導体特異的結合物質、例えば、米国特許第4,640,835号；同第4,496,689号；同第4,301,144号；同第4,670,417号；同第4,791,192号；及び同第4,179,337号に述べられているような、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレングリコール又はポリプロピレングリコールなどの1個又はそれ以上の水溶性ポリマー結合物を含むように共有結合修飾されたペプチ体を包含する。この技術分野で既知のさらなる他の有用なポリマーは、モノメトキシポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース又は他の糖質ベースのポリマー、ポリー（N-ビニルピロリドン）-ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えばグリセロール）及びポリビニルアルコール、ならびにこれらのポリマーの混合物を含む。特に好ましいのは、ポリエチレングリコール（PEG）サブユニットで共有結合修飾されたペプチ体である。水溶性ポリマーは、特定位置で、例えばペプチ体のアミノ末端で結合しうるか、又はポリペプチドの1つ又はそれ以上の側鎖にランダムに結合しうる。特異的結合物質、例えばペプチ体、及び特にヒト化抗体についての治療能力を改善するためのPEGの使用は、2000年10月17日発行のGonzalesらへの米国特許第6,133,426号に述べられている。

10

【0168】

本発明はまた、該化合物のペプチド及び／又はビヒクル部分を誘導体化することを考慮する。そのような誘導体は、化合物の溶解度、吸収、生物学的半減期等を改善しうる。それらの成分は、代替的に、該化合物の望ましくない副作用等を排除しうる又は減じうる。例示的な誘導体は次のような化合物を含む：

20

【0169】

1. 該化合物又はその何らかの部分の部分が環状である。例えば、ペプチド部分を、ジスルフィド結合の形成によって環化できる、2個又はそれ以上のCys残基を含むように（例えばリンカー内に）修飾しうる。

【0170】

2. 該化合物が架橋している又は分子間で架橋できるようになっている。例えば、ペプチド部分を、1個のCys残基を含み、それによって同様の分子と分子間ジスルフィド結合を形成することができるように修飾しうる。該化合物はまた、そのC末端を通して架橋していてもよい。

30

【0171】

3. 1又はそれ以上のペプチジル $[-C(O)NR-]$ 結合が非ペプチジル結合によって置換されている。例示的な非ペプチジル結合は、 $-CH_2-$ カルバメート $[-CH_2-OC(O)NR-]$ 、ホスホネート、 $-CH_2-$ スルホンアミド $[-CH_2-S(O)_2NR-]$ 、尿素 $[-NHC(O)NH-]$ 、 $-CH_2-$ 第二級アミン、及びアルキル化ペプチド $[-C(O)NR_6-]$ 〔式中、 R_6 は低級アルキルである〕〕である。

【0172】

4. N末端が誘導体化されている。典型的には、N末端はアシル化されるか又は置換アミンに変更されうる。例示的なN末端誘導体基は、 $-NRR_1$ （ $-NH_2$ 以外）、 $-NRC(O)R_1$ 、 $-NRC(O)OR_1$ 、 $-NRS(O)_2R_1$ 、 $-NHC(O)NHR_1$ 、スクシニミド、又はベンジルオキシカルボニル $-NH-(CBZ-NH-)$ 、〔式中R及び R_1 は、各々独立して水素又は低級アルキルであり、フェニル環は、 C_1-C_4 アルキル、 C_1-C_4 アルコキシ、クロロ及びブロモから成る群より選択される1個から3個の置換基である〕を含む。

40

【0173】

5. 遊離C末端が誘導体化されている。典型的には、C末端はエステル化されるか又はアミド化される。例えば、この技術分野で記述されている方法を使用して、C末端で本発明の化合物に $(NH-CH_2-CH_2-NH_2)_2$ を付加しうる。同様に、この技術分野で記述されている方法を使用して、C末端で本発明の化合物に $-NH_2$ を付加しうる。例

50

示的なC末端誘導体基は、例えば、 $-C(O)R_2$ [式中、 R_2 は、低級アルコキシ又は $-NR_3R_4$ [式中、 R_3 及び R_4 は、独立して水素又は C_1-C_8 アルキル（好ましくは C_1-C_4 アルキル）である]である]を含む。

【0174】

6. ジスルフィド結合がもう1つ別の、好ましくはより安定な、架橋成分（例えばアルキレン）で置換されている。例えばBhatnagar（前出）；Albertsら、Thirteenth Am. Pep. Symp., 357-9（1993）参照。

【0175】

7. 1個又はそれ以上の個々のアミノ酸残基が修飾されている。様々な誘導体化剤が、下記で詳述するように、選択側鎖又は末端残基と特異的に反応することが知られている。

【0176】

リシニル残基及びアミノ末端残基は、リシニル残基の電荷を逆転させる、コハク酸又は他のカルボン酸無水物と反応しうる。 α -アミノ含有残基を誘導体化するための他の適切な試薬は、メチルピコリンイミデートなどのイミドエステル；ピリドキサルリン酸；ピリドキサル；クロロホウ水素化物；トリニトロベンゼンスルホン酸；O-メチルイソ尿素；2, 4-ペンタンジオン；及びグリオキシレートとのトランスアミナーゼ触媒反応を含む。

【0177】

アルギニル残基は、フェニルグリオキサール、2, 3-ブタンジオン、1, 2-シクロヘキサンジオン及びニンヒドリンを含む、1個又はいくつかの慣用試薬の組合せとの反応によって修飾しうる。アルギニル残基の誘導体化は、グアニジン官能基の高い pK_a の故に、アルカリ性条件下で反応を実施することを必要とする。さらに、これらの試薬はリシンの基ならびにアルギニン ϵ -アミノ基と反応しうる。

【0178】

チロシン残基の特異的修飾は広汎に検討されており、芳香族ジアゾニウム化合物又はテトラニトロメタンとの反応によってチロシル残基にスペクトル標識を導入することに特に関心が寄せられている。最も一般的には、N-アセチルイミジゾール及びテトラニトロメタンを使用して、それぞれO-アセチルチロシル種及び3-ニトロ誘導体を形成する。

【0179】

カルボニル側鎖（アスパルチル又はグルタミル）は、1-シクロヘキシル-3-（2-モルホリニル-（4-エチル）カルボジイミド又は1-エチル-3-（4-アゾニア-4, 4-ジメチルペンチル）カルボジイミドなどのカルボジイミド（ $R'-N=C=N-R'$ ）との反応によって選択的に修飾しうる。さらに、アスパルチル及びグルタミル残基は、アンモニウムイオンとの反応によってアスパラギニル及びグルタミニル残基に変換しうる。

【0180】

グルタミニル及びアスパラギニル残基は、対応するグルタミル及びアスパルチル残基に脱アミド化されうる。代替的に、これらの残基は弱酸性条件下で脱アミド化される。これらの残基のいずれの形態も本発明の範囲内に含まれる。

【0181】

システイニル残基は、アミノ酸残基又はジスルフィド結合を除去するため又は逆に、架橋を安定化するための他の成分によって置換することができる。例えばBhatnagar（前出）参照。

【0182】

二官能性物質による誘導体化は、ペプチド又はそれらの機能性誘導体を水不溶性支持マトリックス又は他の高分子ビヒクルに架橋するために有用である。一般的に使用される架橋剤は、例えば1, 1-ビス（ジアゾアセチル）-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシニミドエステル、例えば4-アジドサリチル酸とのエステル、3, 3'-ジチオビス（スクシニミジルプロピオネート）などのジスクシニミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、及びビス-N-マレイミド-1, 8-オクタン

10

20

30

40

50

などの二官能性マレイミドを含む。メチル-3-[(p-アジドフェニル)ジチオ]プロピオイミデートなどの誘導体化剤は、光の存在下で架橋を形成することができる光活性化中間体を生じる。代替的に、臭化シアン活性化糖質などの反応性水不溶性マトリックス及び米国特許第3,969,287号；同第3,691,016号；同第4,195,128号；同第4,247,642号；同第4,229,537号；及び同第4,330,440号に述べられている反応性基質がタンパク質の固定化のために使用しうる。

【0183】

糖質（オリゴ糖）基は、タンパク質内のグリコシル化部位であることが知られている部位に好都合に結合しうる。一般に、配列 $Asn-X-Ser/Thr$ [式中、Xはプロリン以外のあらゆるアミノ酸残基でありうる]の部分であるとき、O-結合オリゴ糖はセリン（Ser）又はトレオニン（Thr）残基に結合し、N-結合オリゴ糖はアスパラギン（Asn）残基に結合する。Xは、好ましくはプロリン以外の19の天然に生じるアミノ酸の1つである。N結合及びO結合オリゴ糖の構造及び各々の種類で認められる糖残基は異なる。両方で一般的に認められる糖の1つの種類はN-アセチルノイラミン酸（シアル酸と称される）である。シアル酸は通常N結合及びO結合オリゴ糖の両方の末端残基であり、その負電荷により、グリコシル化化合物に酸性特性を付与しうる。そのような部位は本発明の化合物のリンカー内に組み込むことができ、好ましくはポリペプチド化合物の組換え生産の間に（例えばCHO、BHK、COSなどの哺乳類細胞において）細胞によってグリコシル化される。しかし、そのような部位は、この技術分野で既知の合成又は半合成手順によってさらにグリコシル化しうる。

【0184】

他の可能な修飾は、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、Cys中の硫黄原子の酸化、リシン、アルギニン及びヒスチジン側鎖の α -アミノ基のメチル化 [Creighton, T. E., *Proteins: Structure and Molecule Properties*, (W. H. Freeman & Co., San Francisco), p. 79-86 (1983)]を含む。

【0185】

本発明の化合物はDNAレベルでも変化させうる。該化合物のいずれかの部分のDNA配列を、選択する宿主細胞とより適合性のコドンに変更しうる。好ましい宿主細胞である大腸菌については、最適化コドンはこの技術分野において既知である。選択宿主細胞におけるDNAのプロセシングの助けとなる、制限部位を排除する又は沈黙化制限部位を含むようにコドンを置換することができる。ビヒクル、リンカー及びペプチド配列は、前記の配列変化のいずれかを含むように修飾しうる。

【0186】

親和性成熟

本発明の1つの実施形態は、「親和性成熟した」ペプチド及びペプチド体を含む。この手順は、ファージディスプレイ又は他の選択テクノロジーを使用して本発明のペプチド及びペプチド体の親和性又は生物活性を高めることを考慮する。コンセンサス配列（関連ペプチドの収集のために生成される）に基づいて、「コア」アミノ酸（コンセンサス配列から決定される）が一定に保持されている又はその発生頻度に偏りがある、指定二次ファージディスプレイライブラリーを作製することができる。代替的に、個々のペプチド配列は、偏りのある指定ファージディスプレイライブラリーを作製するために使用できる。そのようなライブラリーのパニングは、Ang-2への高い結合又は高い生物活性を有するペプチド（ペプチド体に変換することができる）を生じることができる。

【0187】

非ペプチド類似体／タンパク質ミメティック

さらに、安定な構造又は低い生分解を提供するペプチドの非ペプチド類似体も考慮される。ペプチド模倣性類似体は、選択した阻害性ペプチドに基づいて1個又はそれ以上の残基を非ペプチド成分で置換することによって作製できる。好ましくは、その非ペプチド成

分は、ペプチドがその天然の立体配座を保持する、又はAng-2を認識し、結合する能力を保持する好ましい、例えば生物活性な立体配座を安定化することを可能にする。1つの局面では、生じる類似体／ミメティックはAng-2に対する高い結合親和性を示す。ペプチドから非ペプチドミメティック類似体を作製するための方法の一例が、Nachmanら、Regul. Pept. 57: 359-370 (1995) に述べられている。所望する場合は、本発明のペプチドを、例えばグリコシル化、アミド化、カルボキシル化又はリン酸化によって、又は本発明のペプチドの酸付加塩、アミド、エステル、特にC末端エステル及びN-アシル誘導体の生成によって修飾することができる。ペプチ体も、他の成分との共有結合又は非共有結合複合体を形成することによってペプチド誘導体を生成するように修飾することができる。共有結合複合体は、ペプチ体を含むアミノ酸の側鎖上の官能基、若しくはN又はC末端に化学的成分を結合することによって作製できる。

10

【0188】

特に、該ペプチドは、放射能標識、蛍光標識、酵素（例えば比色定量又は蛍光分析反応を触媒する）、基質、固体マトリックス又は担体（例えばビオチン又はアビジン）を含むが、これらに限定されないレポーター基に複合できることが予想される。本発明は、従って、ペプチ体分子を含み、好ましくは放射能標識、蛍光標識、酵素、基質、固体マトリックス及び担体からなる群より選択されるレポーター基をさらに含む分子を提供する。そのような標識は当業者に周知であり、例えばビオチン標識が特に考慮される。そのような標識の使用は当業者に周知であり、例えば米国特許第3,817,837号；同第3,850,752号；同第3,996,345号；及び同第4,277,437号に述べられている。有用となる他の標識は、放射能標識、蛍光標識及び化学発光標識を含むが、これらに限定されない。そのような標識の使用に関する特許は、例えば米国特許第3,817,837号；同第3,850,752号；同第3,939,350号；及び同第3,996,345号を含む。本発明のペプチドのいずれも、これらの標識の1個、2個又はそれ以上を含むうる。

20

【0189】

ペプチドを作製する方法

本発明のペプチドは、この技術分野で既知の様々な手法を使用して作製することができる。例えば、そのようなペプチドは、従来の手法に従って溶液中又は支持体上で合成することができる。様々な自動合成器が市販されており、既知のプロトコールに従って使用できる。例えば、各々参照してここに組み込まれる、StewartとYoung（前出）；Tamら、J. Am. Chem. Soc., 105: 6442 (1983)；Merrifield, Science 232: 341-347 (1986)；BaranyとMerrifield, The Peptides, Gross and Meienhofer編集、Academic Press, New York, 1-284；Baranyら、Int. J. Pep. Protein Res., 30: 705-739 (1987)；及び米国特許第5,424,398号参照。

30

【0190】

固相ペプチド合成法は、0.1-1.0mMアミン/gポリマーを含むコポリ（スチレンジビニルベンゼン）を使用する。ペプチド合成のためのこれらの方法は、 α -アミノ基のブチルオキシカルボニル（t-BOC）又は9-フルオレニルメチルオキシカルボニル（Fmoc）保護を用いる。どちらの方法も、ペプチドのC末端から出発して各々の段階で1個のアミノ酸を付加する段階的合成を含む（Coliganら、Curr. Prot. Immunol., Wiley Interscience, 1991, Unit 9参照）。化学合成の完了時に、合成ペプチドを脱保護してt-BOC又はFmocアミノ酸保護基を除去し、低温での酸による処理によって（例えば0℃で約15分間から約1時間、液体HF-10%アニソール）ポリマーから開裂することができる。試薬を蒸発させた後、ペプチドを1%酢酸溶液でポリマーから抽出し、次にそれを凍結乾燥して粗物質を生成する。これを通常、5%酢酸を溶媒として使用するSephadex G-15でのゲルろ過などの手法によって精製することができる。カラムの適切な分画を凍結乾燥するこ

40

50

とにより、均質なペプチド又はペプチド誘導体を生成し、次にそれを、アミノ酸分析、薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、紫外吸収分光法、モル旋光度、溶解度などの標準的手法によって特性付け、固相エドマン分解法によって定量することができる。

【0191】

ファージディスプレイライブラリーからペプチドを選択することなどの他の方法も使用可能である。ライブラリーは、ここで述べるようなアミノ酸のセットから作製することができる。ファージディスプレイは、本発明に従った有用なペプチドを特定する上で特に有用でありうる。簡単に述べると、4個から約80個のアミノ酸残基からインサートを表示するファージライブラリーを作製する（例えばm1 13, fd又はλファージを使用して）。それらのインサートは、例えば完全な変性又はバイアスアレイでありうる。次に、所望抗原に結合するファージ担持インサートを選択することができる。所望抗原に結合するファージを再選択する数回のサイクルを通してこの過程を反復することができる。反復ラウンドは、特定配列を担うファージの濃縮を導く。発現されたペプチドの配列を特定するためにDNA配列分析を実施することができる。所望抗原に結合する配列の最小線状部分を決定することができる。最小線状部分の一部又は全部プラスその上流又は下流の1個又はそれ以上の付加変性残基を含むインサートを含むバイアスライブラリーを使用してこの手順を反復することができる。これらの手法は、Ang-2に対してここで既に特定した物質よりも高い結合親和性を有する本発明のペプチドを特定しうる。

【0192】

ペプチドを作製する方法に関わりなく、各々のそのようなペプチド及びペプチ体をコードする核酸分子は、標準的な組換えDNA手法を用いて生成することができる。そのようなDNA分子のヌクレオチド配列は、核酸コードの縮退を明らかにするためならびに特定宿主細胞におけるコドンの優先性を明らかにするために、それらがコードするアミノ酸配列を変化させることなく適宜に操作することができる。

【0193】

組換えDNA手法は、本発明の完全長ペプチ体及び他の大きなタンパク質様特異的結合物質、又はそれらのフラグメントを生産するための好都合な方法である。ペプチ体又はフラグメントをコードするDNA分子を発現ベクターに挿入し、次に今度はそれを抗体又はフラグメントの生産のために宿主細胞に挿入することができる。

【0194】

一般に、ペプチド又はペプチ体をコードするDNA分子は、ここで実施例において述べる手順を用いて入手することができる。プローブ及び典型的なハイブリダイゼーション条件は、Ausubelら（Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols Press [1984]）の中で述べられているようなものである。ハイブリダイゼーション後、プローブしたプロットを、プローブの大きさ、クローンに対するプローブの予想されるホモロジー、スクリーニングするライブラリーの種類、及びスクリーニングするクローンの数などの因子に依存して、適切なストリンジェンシーで洗浄することができる。高ストリンジェンシースクリーニングの例は、50℃から65℃の温度で0.1×SSC及び0.1%SDSである。

【0195】

酵母ツーハイブリッドスクリーニング法も、Ang-2に結合する本発明のペプチドを特定するために使用しうる。そこで、抗原又はそのフラグメントを使用して、Ang-2結合物質、例えば本発明のペプチ体を特定し、選択するために、ファージディスプレイライブラリーを含むペプチドライブラリーをスクリーニングすることができる。

【0196】

代替的に、本発明のペプチドを含有し、発現するために様々な発現ベクター／宿主系を使用しうる。これらの系は、組換えバクテリオファージ、プラスミド又はコスミドDNA発現ベクターで形質転換した細菌などの微生物；酵母発現ベクターで形質転換した酵母；

ウイルス発現ベクター（例えばバキュロウイルス）で形質転換した昆虫細胞系；ウイルス発現ベクター（例えばカリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）で形質転換した又は細菌発現ベクター（例えばTi又はpBR322プラスミド）で形質転換した植物細胞系；又は動物細胞系を含むが、これらに限定されない。組換えタンパク質生産において有用である哺乳類細胞は、ベロ細胞、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞系、COS細胞（COS-7など）、W138、BHK、HepG2、3T3、RIN、MDCK、A549、PC12、K562及び293細胞を含むが、これらに限定されない。該ペプチドの組換え発現のための例示的プロトコールを下記で述べる。

【0197】

「発現ベクター」の語は、DNA（RNA）配列からのポリペプチドを発現するためのプラスミド、ファージ、ウイルス又はベクターを意味する。発現ベクターは、（1）遺伝子発現において調節的役割を有する遺伝子エレメント（単数又は複数）、例えばプロモーター又はエンハンサー、（2）mRNAに転写され、タンパク質に翻訳される結合物質をコードする構造又は配列、及び（3）適切な転写開始及び終結配列、の構築物を含む転写ユニットを含む。酵母又は真核生物発現系における使用を意図した構造ユニットは、好ましくは、宿主細胞による翻訳されたタンパク質の細胞外分泌を可能にするリーダー配列を含む。代替的に、組換えタンパク質がリーダー又は輸送配列なしで発現される場合、そのタンパク質はアミノ末端メチオニル残基を含む。この残基はその後、最終ペプチド産物を提供するために発現された組換えタンパク質から開裂してもよく又は開裂しなくてもよい。

【0198】

例えば、該ペプチドは、市販の発現系、例えばPichia Expression System（Invitrogen, San Diego, CA）を使用して、製造者の指示に従って酵母において組換え発現しうる。この系はまた、分泌を指令するプレプロ-α配列に基づくが、インサートの転写は、メタノールによる誘導時にアルコールオキシダーゼ（AOX1）プロモーターによって推進される。

【0199】

分泌されたペプチドは、例えば細菌及び哺乳類細胞上清からペプチドを精製するために使用される方法によって、酵母増殖培地から精製される。

【0200】

代替的に、該ペプチドをコードするcDNAをバキュロウイルス発現ベクターpVL1393（PharMingen, San Diego, CA）にクローニングしうる。このベクターを製造者の指示（PharMingen）に従って使用して、SF9無タンパク質培地中でSpodoptera frugiperda細胞に感染させて、組換えタンパク質を生産することができる。この組換えタンパク質を、ヘパリン-Sepharoseカラム（Pharmacia）を用いて培地から精製して、濃縮することができる。

【0201】

代替的に、該ペプチドを昆虫系において発現しうる。タンパク質発現のための昆虫系は当業者に周知である。1つのそのような系では、Autographa californica核多角体病ウイルス（AcNPV）をベクターとして使用して、Spodoptera frugiperda細胞又はTrichoplusia幼虫において外来遺伝子を発現することができる。そのペプチドコード配列を、ポリヘドリン遺伝子などのウイルスの非必須領域にクローニングし、ポリヘドリンプロモーターの制御下に置くことができる。ペプチドの挿入の成功により、ポリヘドリン遺伝子は不活性となり、コートタンパク質のコートを欠く組換えウイルスが生産される。その組換えウイルスを使用して、ペプチドが発現されるS. frugiperda細胞又はTrichoplusia幼虫に感染させることができる。Smithら、J. Virol. 46:584（1983）；Engelhardtら、Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 91:3224-7（1994）。

【0202】

もう1つの例では、該ペプチドをコードするDNA配列をPCRによって増幅して、適切なベクター、例えばpGEX-3X (Pharmacia) にクローニングすることができる。pGEXベクターは、そのベクターによってコードされるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) と、ベクターのクローニング部位に挿入されるDNAフラグメントによってコードされるタンパク質を含む融合タンパク質を産生するように設計する。PCRのためのプライマーは、例えば適切な開裂部位を含むように作製することができる。融合成分が、発現を促進するためだけに使用される場合又は対象ペプチドへの結合物として望ましくない場合は、その組換え融合タンパク質を融合タンパク質のGST部分から開裂しうる。pGEX-3X/特異的結合物質ペプチド構築物を大腸菌XL-1 Blue細胞 (Stratagene, La Jolla, CA) に形質転換し、個々の形質転換体を単離して増殖させる。個々の形質転換体からのプラスミドDNAを精製し、所望の特異的結合物質をコードする核酸インサートが適切な方向で存在することを確認するために自動シーケンサーを使用して部分的に配列決定することができる。

10

【0203】

本発明の一部のペプチド組成物は、ペプチ体が腫瘍壊死因子 (TNF) などの何らかの抗腫瘍ペプチドに複合しているものである。特に好ましい方法では、TNF特異的結合物質ペプチドのキメラを、TNF (Novagen, Madison, WI) コード配列にフレーム内融合したペプチドコード配列との組換え融合体として生成する。ペプチド-TNF cDNAをpET-11bベクター (Novagen) にクローニングし、pET 11bの製造者の指示に従ってBL21大腸菌におけるTNF-ペプチドの発現を誘導することができる。可溶性TNF-ペプチドを、硫酸アンモニウム製剤、Phenyl-Sepharose 6 Fast Flowでの疎水性相互作用クロマトグラフィー、DEAE-Sepharose Fast Flowでのイオン交換クロマトグラフィー及びSephacryl-S-300 HRでのゲルろ過クロマトグラフィーによって細菌溶解産物から精製することができる。

20

【0204】

細菌中の不溶性封入体として生産しうる融合タンパク質は次のようにして精製できる。宿主細胞を遠心分離によって破壊し；0.15M NaCl、10mM Tris、pH 8、1mM EDTA中で洗って；室温で15分間、0.1mg/ml リゾチーム (Sigma, St. Louis, MO) で処理することができる。その溶解産物を音波破碎によって清澄化し、12,000×gで10分間遠心分離して細胞デブリをペレット化することができる。その融合タンパク質含有ペレットを50mM Tris、pH 8及び10mM EDTA中に再懸濁し、50%グリセロール上の層にして、6000×gで30分間遠心分離することができる。そのペレットを、Mg++及びCa++を含まない標準リン酸緩衝塩類溶液に再懸濁することができる。その融合タンパク質を、再懸濁したペレットを変性SDS-PAGE (Sambrookら、前出) 中で分画することによってさらに精製することができる。ゲルを0.4M KClに浸してタンパク質を視覚化し、それを切り出して、SDSを含まないゲル泳動緩衝液中で電気溶出することができる。GST/融合タンパク質が細菌中で可溶性タンパク質として生産される場合は、GST Purification Module (Pharmacia) を用いて精製することができる。

30

40

【0205】

その融合タンパク質を消化に供して、本発明のペプチドからGSTを開裂することができる。0.5ml PBS中のその消化反応物 (20mgから40mg融合タンパク質、20-30単位のヒトトロニン (4000U/mg、Sigma)) を室温で16時間から48時間インキュベートし、変性SDS-PAGEゲルに充填して反応産物を分画することができる。ゲルを0.4M KClに浸してタンパク質のバンドを視覚化することができる。該ペプチドの予想分子量に対応するタンパク質バンドの同一性は、自動シーケンサー (Applied Biosystems 473A型、Foster City

50

、C A)を用いたアミノ酸配列分析によって確認することができる。代替的に、ペプチドのH P L C及び／又は質量分析を実施することによって同一性を確認することができる。

【0206】

選択的に、該ペプチドをコードするD N A配列は、所望プロモーター及び、任意に、リーダー配列を含むプラスミドにクローニングすることができる[B e t t e rら、S c i e n c e 240:1041-43(1988)]。この構築物の配列を自動配列決定によって確認することができる。次にそのプラスミドを、細菌のC a C l₂インキュベーション及び熱ショック処理を用いる標準手順(S a m b r o o kら、前出)を使用して、大腸菌株M C 1061に形質転換することができる。形質転換した細菌をカルベニシリン補足L B培地で増殖させ、適切な培地中での増殖によって発現タンパク質の生産を誘導することができる。存在する場合は、リーダー配列はペプチドの分泌を生じさせることができ、分泌の間に開裂されうる。

10

【0207】

分泌された組換えタンパク質は、下記の述べる方法によって細菌培地から精製することができる。

【0208】

組換えタンパク質の発現のための哺乳類宿主系は当業者に周知である。宿主細胞株は、発現されたタンパク質をプロセッシングする、又はタンパク質活性を提供する上で有用である一定の翻訳後修飾を生じさせる個々の能力によって選択できる。タンパク質のそのような修飾は、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化及びアシル化を含むが、これらに限定されない。C H O、H e L a、M D C K、293、W I 38等のような種々の宿主細胞は、そのような翻訳後活性について特異的細胞機構及び特徴的機序を有しており、導入される外来タンパク質の正しい修飾とプロセッシングを保証するように選択することができる。

20

【0209】

形質転換細胞を長期的な高収率のタンパク質生産のために使用することは好ましく、そのためには安定な発現が望ましい。ひとたびそのような細胞が、所望発現カセットと共に選択マーカーを含むベクターで形質転換されれば、それらの細胞を濃縮培地中で1-2日間増殖させ、その後培地を選択培地に切り換えることができる。選択マーカーは選択に対する耐性を与えるように設計され、その存在は、導入した配列を成功裏に発現する細胞の増殖と回収を可能にする。安定に形質転換された細胞の耐性集塊を、細胞に適切な組織培養手法を使用して増殖させることができる。

30

【0210】

いくつかの選択系が組換えタンパク質生産のために形質転換された細胞を回収するために使用できる。そのような選択系は、それぞれt k⁻、h g p r t⁻又はa p r t⁻細胞における、H S Vチミジンキナーゼ、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子を含むが、これらに限定されない。また、代謝拮抗物質耐性は、メトトレキサートに対する耐性を与えるD H F R；ミコフェノール酸に対する耐性を与えるg p t；アミノグリコシドG 418に対する耐性を与え、且つクロルスルフロンに対する耐性を与えるn e o；及びヒグロマイシンに対する耐性を与えるh y g r oについての選択の根拠として使用できる。有用と考えられるさらなる選択可能遺伝子は、細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用することを可能にするt r p B、又は細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用することを可能にするh i s Dを含む。形質転換体の特定のための視覚的指標を与えるマーカーは、アントシアニン、β-グルクロニダーゼとその基質であるG U S、及びルシフェラーゼとその基質であるルシフェリンを含む。

40

【0211】

特異的結合物質の精製及びリフォールディング

一部の場合、本発明のペプチド及び／又はペプチ体のような特異的結合物質は、生物活性であるために、「リフォールディング」されて、適切な三次構造へと酸化され、ジスル

50

フィド結合を生成することを必要とすることがある。リフォールディングはこの技術分野で周知のいくつかの手順を用いて実施されうる。そのような方法は、例えば、可溶化したポリペプチド物質をカオトロピック試薬の存在下で通常7を超えるpHに暴露することを含む。カオトロピック試薬の選択は封入体の可溶化のために用いられる選択と同様であるが、カオトロピック試薬は、典型的にはより低い濃度で使用する。例示的なカオトロピック試薬はグアニジンである。ほとんどの場合、リフォールディング／酸化溶液は同時に、システイン架橋の形成のためにジスルフィドシャフリングが起こることを可能にする特定酸化還元電位を生じさせる特定比率で、還元剤プラスその酸化形態を含む。一部の一般的に使用される酸化還元対は、システイン／シスタミン、グルタチオン／ジチオビスGSH、塩化第二銅、ジチオトレイトールDTT／ジチアンDTT、及び2-メルカプトエタノール(bME)／ジチオ-bMEを含む。多くの場合、リフォールディングの効率を高めるためにコソルベントを使用しうる。一般的に使用されるコソルベントは、グリセロール、様々な分子量のポリエチレングリコール及びアルギニンを含む。

10

【0212】

本発明のペプチド及びペプチ体を精製することは望ましいと考えられる。タンパク質精製手法は当業者に周知である。これらの手法は、1つの水準では、タンパク質様及び非タンパク質様画分の粗分別を含む。ペプチド及び／又はペプチ体を他のタンパク質から分離した後、部分的又は完全な精製（又は均一性への精製）を達成するためのクロマトグラフィー及び電気泳動手法を用いて対象ペプチド又はポリペプチドをさらに精製することができる。本発明のペプチ体及びペプチドの作製に特に適する分析手法は、イオン交換クロマトグラフィー、排除クロマトグラフィー；ポリアクリルアミドゲル電気泳動；等電点電気泳動である。ペプチドを精製する特に効率的な方法は、高速タンパク質液体クロマトグラフィー又はHPLCである。

20

【0213】

本発明の一部の局面は、本発明のペプチ体又はペプチドの精製に関し、特定実施形態では、本発明のペプチ体又はペプチドの実施的な精製に関する。ここで使用する「精製ペプチ体又はペプチド」の語は、ペプチ体又はペプチドがその天然で得られる状態に比べてある程度まで精製されている、他の成分から単離可能な組成物を表わすことが意図されている。精製ペプチド又はペプチ体はまた、それ故、それが天然に生じうる環境から分離しているペプチ体又はペプチドを意味する。

30

【0214】

一般に、「精製された」とは、様々な他の成分を除去するための分別に供されており、その組成物が実質的にその発現される生物活性を保持しているペプチド又はペプチ体組成物を意味する。「実質的に精製された」の語を使用する場合、この名称は、ペプチ体又はペプチドが、組成物中のタンパク質の約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%又はそれ以上を構成するような、組成物の主要成分を形成するペプチド又はペプチ体組成物を意味する。

【0215】

ペプチド又はペプチ体の精製の度合を定量するための様々な方法は、本発明の開示に照らして当業者に既知である。これらは、例えば、活性分画の特異的結合活性を測定すること、又はSDS/PAGE分析によって分画中のペプチド又はペプチ体の量を評価することを含む。ペプチド又はペプチ体分画の純度を評価するための好ましい方法は、その分画の結合活性を算定し、それを初期抽出物の結合活性と比較して、その後、ここでは「一倍数の精製度」として評価する、精製の度合を算定することである。結合活性の量を表わすために使用する実際の単位は、言うまでもなく、精製を追跡するために選択される個々のアッセイ手法、及びそのペプチ体又はペプチドが検出可能な結合活性を示すかどうかにかかわらず。

40

【0216】

精製における使用に適する様々な手法が当業者に周知である。これらは、例えば、硫酸アンモニウム、PEG、抗体（免疫沈降法）等による沈降反応、又は熱変性とそれに続く

50

遠心分離；アフィニティークロマトグラフィー（例えばプロテインA-Sepharose）、イオン交換、ゲルろ過、逆相、ヒドロキシルアパタイト及びアフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー段階；等電点電気泳動；ゲル電気泳動；及びそれらやその他の手法の組合せを含む。この技術分野において一般的に知られるように、様々な精製段階を実施する順序は変更しうる、又は一部の段階を省いて、それでもなお実質的に精製された特異的結合物質の作製のために適切な方法をもたらしうると考えられる。

【0217】

本発明のペプチド又はペプチ体が常にその最も精製された状態で提供されるという一般的な必要性はない。実際に、実質的に特異性のより低い結合物質は一部の実施形態で有用性を有しうると想定される。部分的精製は、より少ない精製段階を組み合わせる使用することによって、又は同じ一般的精製スキームの異なる形態を利用することによって達成しうる。例えば、HPLC装置を用いて実施される陽イオン交換カラムクロマトグラフィーは、一般的に低圧クロマトグラフィーシステムを用いる同じ手法よりも高い「一倍数」精製を生じることが認識されている。より低い度合の相対的生成を示す方法は、ペプチド又はペプチ体の全体的回収において、又はペプチド又はペプチ体の結合活性を維持する上で利点を有すると考えられる。

【0218】

ペプチド又はポリペプチドの泳動は、SDS/PAGEの種々の条件によって、時として有意に、変化しうることが知られている [Capaldiら、Biochem. Biophys. Res. Comm., 76:425 (1977)]。それ故、異なる電気泳動条件下では、精製又は部分精製特異的結合物質発現産物の見かけ分子量が変化しうるとは認識される。

【0219】

結合アッセイ

免疫学的結合アッセイは、典型的には、分析物標的抗原に特異的に結合し、しばしばそれを固定する捕獲試薬を利用する。捕獲試薬は分析物に特異的に結合する成分である。本発明の1つの実施形態では、捕獲試薬は、Ang-2に特異的に結合するペプチド又はペプチ体又はそのフラグメントである。これらの免疫学的結合アッセイはこの技術分野において周知である [Asai編集、Methods in Cell Biology, 第37巻, Antibodies in Cell Biology, Academic Press, Inc., New York (1993)]。

【0220】

免疫学的結合アッセイは、しばしば捕獲試薬と抗原によって形成される結合複合体の存在をシグナル表示する標識試薬を利用する。標識試薬は結合複合体を含む分子の1つでありうる；すなわち、標識特異的結合物質又は標識抗特異的結合物質抗体でありうる。代替的に、標識試薬は、結合複合体に結合する第三の分子、一般的にはもう1つ別の抗体でありうる。標識試薬は、例えば、標識を担う抗特異的結合物質抗体でありうる。結合複合体に特異的な第二抗体は、標識を有していなくてもよいが、第二抗体がその成員である抗体の種に特異的な第四分子によって結合されねばならない。例えば、第二抗体を、その後酵素標識ストレプトアビジンなどの第四分子によって結合されうる、ビオチンなどの検出可能な成分で修飾することができる。プロテインA又はプロテインGなどの、免疫グロブリン定常領域に特異的に結合することができる他のタンパク質も、標識試薬として使用しうる。これらの結合タンパク質は、連鎖球菌属細菌の細胞壁の通常成分であり、様々な種からの免疫グロブリン定常領域に強い非免疫原性反応を示す。Akerstrom, J. Immunol., 135:2589-2542 (1985); Chaubert, Mod. Pathol., 10:585-591 (1997)。

【0221】

アッセイ全体を通じて、試薬の各々の組合せ後に、インキュベーション及び／又は洗浄段階が必要な場合がある。インキュベーション段階は、約5秒間から数時間、好ましくは約5分間から約24時間まで変化しうる。しかし、インキュベーション時間は、アッセイ

様式、分析物、溶液の容量、濃度等に依存する。通常、アッセイは外界温度で実施するが、一連の温度範囲で実施することができる。

【0222】

A. 非競合結合測定法：

免疫学的結合測定法は非競合型でありうる。これらのアッセイは、直接測定される捕獲分析物の量を含む。例えば、1つの好ましい「サンドイッチ」アッセイでは、捕獲試薬（抗体又はペプチ体）を直接固体基質に結合してそれに固定することができる。これらの固定化捕獲試薬は、その後、被験試料中に存在する抗原を捕獲する（抗原に結合する）。そのようにして固定されたタンパク質は、次に、標識を有する第二抗体などの標識試薬に結合する。もう1つの好ましい「サンドイッチ」アッセイでは、第二抗体は標識を持たないが、その第二抗体が由来する種の抗体に特異的な標識抗体によって結合されうる。第二抗体はまた、ストレプトアビジンなどの第三の標識分子が特異的に結合する、ビオチンなどの検出可能成分で修飾することができる。参照してここに組み込まれる、HarlowとLane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Ch 14, Cold Spring Harbor Laboratory, NY (1988) 参照。

10

【0223】

B. 競合結合測定法：

免疫学的結合測定法は競合型でありうる。試料中に存在する分析物の量を、置き換えられた、又は試料中に存在する分析物によって捕獲試薬（抗体又はペプチ体）から競合排除された、添加分析物の量を測定することによって間接的に測定する。1つの好ましい競合結合測定法では、通常は標識された、既知量の分析物を試料に加え、次に試料を捕獲試薬と接触させる。抗体に結合した標識分析物の量は、試料中に存在する分析物の濃度に逆比例する（HarlowとLane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Ch 14, p. 579-583、前出）。

20

【0224】

もう1つの好ましい競合結合測定法では、捕獲試薬を固体基質に固定する。捕獲試薬に結合するタンパク質の量は、タンパク質／抗体複合体中に存在するタンパク質の量を測定することによって、又は代替的に、残存する非複合タンパク質の量を測定することによって決定しうる。タンパク質の量は、標識タンパク質を提供することによって検出しうる。HarlowとLane（前出）。

30

【0225】

さらにもう1つの好ましい競合結合測定法では、ハプテンの阻害を利用する。ここでは、既知の分析物を固体基質に固定する。既知量の抗体を試料に加え、固定された分析物に試料を接触させる。固定分析物に結合する抗体の量は、試料中に存在する分析物の量に逆比例する。固定抗体の量は、抗体の固定された分画又は溶液中に残存する分画のいずれかを検出することによって検出しうる。検出は、抗体が標識されている場合は直接的であり、又は上述したようにその後抗体に特異的に結合する標識成分を添加することによって間接的でありうる。

【0226】

40

C. 競合結合測定法の利用：

競合結合測定法は、当業者が、本発明のペプチ体によって認識されるタンパク質又は酵素複合体が所望タンパク質であって、交差反応分子ではないかどうかを判定すること、又は前記ペプチ体が該抗原に特異的であって、非関連抗原に結合しないかどうかを判定することを可能にする、交差反応性の判定のために使用できる。この種のアッセイでは、抗原を固相支持体に固定することができ、未知のタンパク質混合物をアッセイに加えて、それを固定タンパク質へのペプチ体の結合と競合させる。競合分子は、該抗原に関連のない1又はそれ以上の抗原にも結合する。前記タンパク質混合物の交差反応性を判定するために、固定抗原へのペプチ体の結合と競合する該タンパク質の能力を、固相支持体に固定した同じタンパク質による結合と比較する。

50

【0227】

D. 他の結合アッセイ：

本発明はまた、試料中のAng-2の存在を検出する又は定量するためのウェスタンブロット法を提供する。その手法は一般に、試料タンパク質を分子量に基づいてゲル電気泳動によって分離し、そのタンパク質を、ニトロセルロースフィルター、ナイロンフィルター又は誘導体化ナイロンフィルターなどの適切な保持体に移す。Ang-2に特異的に結合するペプチ体又はそのフラグメントと共に試料をインキュベートし、生じた複合体を検出する。これらのペプチ体は直接標識しうるか、又は代替的に、その後該ペプチ体に特異的に結合する標識抗体を使用して検出しうる。

【0228】

診断アッセイ

本発明のペプチド及びペプチ体又はそのフラグメントなどの誘導体結合物質は、Ang-2又はサブユニットの発現を特徴とする状態又は疾患の診断のため、又はAng-2の誘導物質、そのフラグメント、Ang-2活性のアゴニスト又は阻害因子で治療される患者を監視するためのアッセイにおいて有用である。Ang-2についての診断アッセイは、ヒト体液、若しくは細胞又は組織の抽出物においてAng-2を検出するためにペプチ体と標識を利用する方法を含む。本発明のペプチ体は、修飾を加えて又は修飾なしで使用する事ができる。好ましい診断アッセイでは、ペプチ体を、例えば標識又はレポーター分子を結合することによって標識する。様々な標識及びレポーター分子が既知であり、その内の一部については既に本明細書に記載されている。特に、本発明はヒト疾患の診断のために有用である。

【0229】

それぞれのタンパク質に特異的なペプチ体を使用してAng-2タンパク質を測定するための様々なプロトコールがこの技術分野において知られている。その例は、酵素結合免疫ソルベント検定法(ELISA)、放射線免疫検定法(RIA)及び蛍光活性化細胞選別(FACS)を含む。Ang-2上の2つの非干渉エピトープに反応性のモノクローナル抗体を使用する二部位のモノクローナルベースの免疫測定法が好ましいが、競合結合測定法も使用できる。これらのアッセイは、例えばMaddoxら、J. Exp. Med., 158:1211(1983)に述べられている。

【0230】

診断の根拠を提供するために、通常、ヒトAng-2発現の正常値又は標準値を確立する。この決定は、正常被験対象、好ましくはヒトからの体液又は細胞抽出物を、この技術分野で周知の複合体形成に適した条件下で、Ang-2に対するペプチ体と組み合わせることによって実施できる。標準的な複合体形成の量は、既知量のAng-2タンパク質へのペプチ体の結合を対照及び疾患試料の両方と比較することによって数量化できる。その後、正常試料から得た標準値を、潜在的に疾患に罹患している被験対象からの試料から得た値と比較することができる。標準値と被験対照値の間の偏差は、疾患状態におけるAng-2の役割を示唆する。

【0231】

診断適用のために、一部の実施形態では、本発明のペプチ体又はペプチドを、典型的には検出可能成分で標識する。その検出可能成分は、直接又は間接的に検出可能なシグナルを生じることができるいかなるものでもよい。例えば、検出可能成分は、³H、¹⁴C、³²P、³⁵S又は¹²⁵I、などの放射性同位体、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン又はルシフェリンなどの蛍光又は化学発光化合物、若しくはアルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ又はホースラディッシュペルオキシダーゼなどの酵素でありうる。Bayerら、Meth. Enz., 184:138-163(1990)。

【0232】

疾患

本発明は、ヒト疾患及び標的状態の治療のために有用な、Ang-2に結合するペプチド、ペプチ体、若しくはそのフラグメント、変異体又は誘導体などの結合物質を提供する

10

20

30

40

50

。Ang-2の結合活性又は他の細胞活性を調節する物質は、それらの治療効果を増強する又は潜在的副作用を低下させる他の治療物質と組み合わせて使用しうる。

【0233】

1つの局面では、本発明は、細胞における有害な又は異常なレベルのAng-2活性を特徴とする疾患及び状態を治療するために有用な試薬及び方法を提供する。これらの疾患は、癌、及び過形成、乾癬、接触皮膚炎、免疫学的疾患及び不妊症などの過増殖状態を含む。

【0234】

本発明はまた、Ang-2活性を阻害する又は低下させる、ペプチ体などの特異的結合物質の有効量を動物に投与することを含む、ヒトを含む動物において癌を治療する方法を提供する。本発明はさらに、生物系における細胞増殖、侵襲及び転移の過程を含む、癌細胞増殖を阻止する方法を対象とする。それらの方法は、癌細胞増殖の阻害因子としての本発明の化合物の使用を含む。好ましくは、前記方法を、哺乳類などの生存動物において癌細胞増殖、侵襲、転移又は腫瘍発生を阻止する又は低下させるために使用する。本発明の方法はまた、アッセイ系における使用、例えば癌細胞増殖及びその特徴を検定するならびに癌細胞増殖に影響を及ぼす化合物を特定するアッセイ系での使用のために容易に適合しうる。

【0235】

本発明の方法によって治療できる癌は、好ましくは哺乳類において発生する。哺乳類は、例えばヒト及び他の霊長類、ならびにイヌ及びネコなどのペット又はコンパニオン動物、ラット、マウス及びウサギなどの実験動物、及びウマ、ブタ、ヒツジ及びウシなどの家畜を含む。

【0236】

腫瘍又は新生物は、細胞の増殖が制御不能且つ進行性である組織細胞の増殖を含む。そのような増殖の一部は良性であるが、その他は悪性と称され、生物の死亡を導きうる。悪性新生物又は癌は、攻撃的細胞増殖を示すことに加えて、周辺組織を侵襲し、転移しうるという点で良性増殖とは区別される。さらに、悪性新生物は、分化のより大きな喪失（より大きな脱分化）、及び相互及びそれらの周辺組織と比べて機構のより大きな喪失を示すことを特徴とする。この特徴は「退形成」とも称される。

【0237】

本発明によって治療しうる新生物はまた、固形腫瘍、すなわち癌腫及び肉腫を含む。癌腫は、周辺組織を浸潤（侵襲）し、転移を生じさせる上皮細胞に由来する悪性新生物を含む。腺癌は、腺組織に由来する、又は認識しうる腺構造を形成する癌腫である。もう1つの広いカテゴリー又は癌は、細胞が胚性結合組織のような原線維又は均質物質中に包埋されている腫瘍である、肉腫を含む。本発明はまた、白血病、リンパ腫、及び典型的には腫瘍塊を示さないが血管又はリンパ細網系に分布する他の癌を含む、骨髄系又はリンパ系の癌の治療を可能にする。

【0238】

本発明に従った治療を受け入れやすい癌又は腫瘍細胞の種類は、例えば、ACTH産生腫瘍、急性リンパ性白血病、急性非リンパ性白血病、副腎皮質の癌、膀胱癌、脳癌、乳癌、子宮頸癌、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、結腸直腸癌、皮膚T細胞リンパ腫、子宮内膜癌、食道癌、ユーイング肉腫、胆嚢癌、ヘアリーセル白血病、頭部及び頸部癌、ホジキンリンパ腫、カボジ肉腫、腎臓癌、肝臓癌、肺癌（小細胞及び非小細胞）、悪性腹腔内液滲出、悪性胸水、黒色腫、中皮腫、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、非ホジキンリンパ腫、骨肉腫、卵巣癌、卵巣（生殖細胞）癌、睪癌、陰茎癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、皮膚癌、軟組織肉腫、扁平上皮癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、栄養膜腫瘍、子宮癌、腔癌、外陰部の癌、及びウィルムス腫瘍を含む。

【0239】

本発明を、特にある種の実験的に定義されている癌の治療を参照しながらここで説明する。これらの例示的治療では、標準的技術水準のインビトロ及びインビボモデルを使用し

10

20

30

40

50

た。これらの方法は、インビボ治療プログラムにおいて有効であると期待できる物質を特定するために使用できる。しかし、本発明の方法はこれらの腫瘍型の治療に限定されず、あらゆる器官系に由来するあらゆる固形腫瘍に及ぶことは明白である。その侵襲又は転移がAng-2の発現又は活性に関連する癌は、特に本発明によって阻止されやすい、またさらには後退へと誘導されやすい。

【0240】

本発明はまた、ペプチ体などの本発明の化合物を、従来の何らかの化学療法剤のようなもう1つの別の抗癌化学療法剤と組み合わせて含むことによって実施できる。そのような他の薬剤と特異的結合物質の組合せは化学療法プロトコルを増強しうる。熟達した医師には、数多くの化学療法プロトコルが本発明の方法に組み込むことができるものとして思い浮かぶ。アルキル化剤、代謝拮抗物質、ホルモン及びアンタゴニスト、放射性同位体、ならびに天然産物を含む、あらゆる化学療法剤が使用できる。例えば、本発明の化合物は、ドキソルビシン及び他のアントラサイクリン類似体などの抗生物質、シクロホスファミドなどのナイトロジェンマスタード、5-フルオロウラシル、シスプラチン、ヒドロキシ尿素、タキソール及びその天然及び合成誘導体などのピリミジン類似体等と共に投与することができる。もう1つの例として、腫瘍がゴナドトロピン依存性及びゴナドトロピン非依存性細胞を含む、乳房の腺癌などの混合腫瘍の場合は、本発明の化合物をロイプロリド又はゴセレリン（LH-RHの合成ペプチド類似体）と共に投与することができる。他の抗腫瘍プロトコルは、ここでは「補助抗腫瘍治療様式」とも称する、もう1つ別の治療様式、例えば手術、放射線等を伴うテトラサイクリン系化合物の使用を含む。そこで、本発明の方法は、副作用を低減し、効果を増強するという恩恵を有するそのような従来のプログラムと共に使用できる。

【0241】

本発明は、それ故、固形腫瘍及び白血病を含む極めて多様な癌の治療のために有用な組成物及び方法を提供する。治療しうる癌の種類は、次のものを含むが、これらに限定されない：乳房、前立腺及び結腸の腺癌；すべての形態の肺の気管支原性癌；骨髄腫；黒色腫；肝癌、神経芽細胞腫；乳頭腫；アブドーマ；分離腫；鰓腫；悪性カルチノイド症候群；カルチノイド心疾患；癌腫（例えばウォーカー癌、基底細胞癌、基底有棘細胞癌、ブラウナーピアース癌、腺管癌、エールリッヒ腫瘍、クレブス2、メルケル細胞腫、粘液性癌腫、非小細胞肺癌、燕麦細胞癌、乳頭状癌、硬性癌、細気管支癌、気管支原性癌、扁平上皮癌及び移行上皮癌）；組織球性疾患；白血病；悪性組織球増殖症；ホジキン病；免疫増殖性小細胞肺癌；非ホジキンリンパ腫；プラズマ細胞腫；細網内皮症；黒色腫；軟骨芽細胞腫；軟骨腫；軟骨肉腫；線維腫；線維肉腫；巨細胞腫；組織球腫；脂肪腫；脂肪肉腫；中皮腫；粘液腫；粘液肉腫；骨腫；骨肉腫；脊索腫；頭蓋咽頭腫；未分化胚細胞腫；過誤腫；間葉腫；中腎腫；筋肉腫；エナメル上皮腫；セメント質腫；歯牙腫；奇形腫；胸腺腫；t r o p h o b l a s t i c t u m o r。さらに、次の種類の癌も治療しうる：腺腫；胆管腫；コレステリン腫；c y c l i n d r o m a；嚢胞腺癌；嚢胞腺腫；顆粒膜細胞腫；半陰陽性卵巢腫瘍；肝癌；肝腺腫；睪島細胞腫；乳頭腫；セルトリ細胞腫；卵胞膜細胞腫；平滑筋腫；平滑筋肉腫；筋原細胞腫；筋腫；筋肉腫；横紋筋腫；横紋筋肉腫；脳室上衣細胞腫；神経節細胞腫；神経膠腫；髓芽細胞腫；髓膜腫；神経鞘腫；神経芽細胞腫；神経上皮腫；神経線維腫；神経腫；傍神経節腫；非クロム親和性傍神経節腫；血管腫硬化；血管腫症；グロムス血管腫；血管内皮腫；血管腫；血管周囲細胞腫；血管肉腫；リンパ管腫；リンパ管筋腫；リンパ管肉腫；松果体腫；癌肉腫；軟骨肉腫；葉状嚢肉腫；線維肉腫；血管肉腫；平滑筋肉腫；白血肉腫；脂肪肉腫；リンパ管肉腫；筋肉腫；粘液肉腫；卵巣癌；横紋筋肉腫；肉腫；新生物；神経線維腫症；及び子宮頸部形成異常。

【0242】

本発明のもう1つの局面は、乾癬及び接触皮膚炎を含む皮膚の過剰増殖状態又は他の過増殖性疾患を予防する及び／又は治療するために本発明の物質及び方法を使用することである。乾癬及び接触皮膚炎の患者はこれらの病巣において高いAng-2活性を有することが明らかにされた〔Ogoshiら、J. Inv. Dermatol., 110:81

10

20

30

40

50

8-23 (1998)」。好ましくは、Ang-2に特異的な特異的結合物質を、これらの臨床症状を発現するヒトを治療するために他の薬剤と組み合わせて使用する。特異的結合物質は、ここで述べる投与経路及び当業者に周知の他の経路を通して、様々な担体のいずれかを用いて送達することができる。

【0243】

本発明の他の局面は、血管新生が関与する様々な網膜症（糖尿病性網膜症及び加齢性黄斑変性を含む）、ならびに子宮内膜症、子宮類線維腫などの雌性生殖路の障害／疾患、及び雌性生殖周期中の血管増殖機能不全（子宮内膜微小血管増殖を含む）に関連する他のそのような疾患を治療することを含む。

【0244】

本発明のさらにもう1つの局面は、脳動静脈奇形（AVM）、胃腸粘膜損傷及び修復、発作から生じる虚血を含む、消化性潰瘍疾患の病歴を有する患者における胃十二指腸粘膜の潰瘍、肝疾患における広い範囲の肺血管障害及び非肝門脈圧亢進を有する患者における根脈圧亢進症を含む、血管増殖異常を治療することに関する。

【0245】

本発明のもう1つの局面は、本発明によって提供される組成物及び方法を利用した癌の予防である。そのような試薬は、Ang-2に対するペプチ体などの特異的結合物質を含む。

【0246】

医薬組成物

ペプチ体などのAng-2特異的結合物質の医薬組成物は本発明の範囲内である。抗体を含む医薬組成物は、例えば2001年1月9日発行の、Lamらへの米国特許第6,171,586号に詳述されている。そのような組成物は、抗体、又はここで述べるようなそのフラグメント、変異体、誘導体又は融合物などの特異的結合物質の治療上又は予防上有効な量を、医薬適合性の物質と混合して含有する。好ましい実施形態では、医薬組成物は、医薬適合性の物質と混合して、Ang-2の少なくとも1つの生物活性を部分的に又は完全に変化させるアンタゴニスト特異的結合物質を含む。典型的には、その特異的結合物質は、動物への投与のために十分に精製されている。

【0247】

該医薬組成物は、例えば、組成物のpH、浸透圧、粘度、清澄性、色、等張性、において、無菌性、安定性、溶解又は放出速度、吸収又は浸透を変化させる、維持する又は保存するための製剤物質を含みうる。適切な製剤物質は、アミノ酸（グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリシンなど）；抗菌剤；抗酸化剤（アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム又は亜硫酸水素ナトリウムなど）；緩衝剤（ホウ酸塩、重炭酸塩、Tris-HCl、クエン酸塩、リン酸塩、他の有機酸など）；充填剤（マンニトール又はグリシンなど）、キレート化剤〔エチレンジアミン四酢酸（EDTA）など〕；錯化剤（カフェイン、ポリビニルピロリドン、β-シクロデキストリン又はヒドロキシプロピルβ-シクロデキストリンなど）；増量剤；単糖類；二糖類及び他の糖質（グルコース、マンノース又はデキストリンなど）；タンパク質（血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリンなど）；着色料；着香料及び希釈剤；乳化剤；親水性ポリマー（ポリビニルピロリドンなど）；低分子量ポリペプチド；塩形成性対イオン（ナトリウムなど）；防腐剤（塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸又は過酸化水素など）；溶媒（グリセリン、プロピレングリコール又はポリエチレングリコールなど）；糖アルコール（マンニトール又はソルビトールなど）；沈殿防止剤；界面活性剤又は湿潤剤（プルロニック、PEG、ソルビタンエステル、ポリソルベート20、ポリソルベート80などのポリソルベート、トリトン、トロメタミン、レシチン、コレステロール、チロキサパールなど）；安定性増強剤（スクロース又はソルビトール）；等張性増強剤（アルカリ金属ハロゲン化物など）（好ましくは塩化ナトリウム又は塩化カリウム、マンニトール、ソルビトール）；送達ビヒクル；希釈剤；賦形剤及び／又は製薬補助剤を含むが、これらに限定され

10

20

30

40

50

ない。(Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版、A. R. Gennaro編集、Mack Publishing Company, 1990)。

【0248】

最適化医薬組成物は、例えば意図する投与経路、送達形式及び所望用量に依存して、当業者によって決定される。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、前出参照。そのような組成物は、特異的結合物質の物理的状态、安定性、インビボでの放出速度、及びインビボでのクリアランスの速度に影響を及ぼしうる。

【0249】

医薬組成物中の主要ビヒクル又は担体は、水性又は非水性のいずれでもよい。例えば、適切なビヒクル又は担体は、おそらく非経口投与用組成物に共通する他の物質を補足した、注射用蒸留水、生理食塩水又は人工脳脊髄液でありうる。中性緩衝塩類溶液又は血清アルブミンと混合した塩類溶液はさらなる例示的ビヒクルである。他の例示的医薬組成物は、ソルビトール又はその適切な代用物をさらに含みうる、約pH7.0-8.5のTris緩衝液、又は約pH4.0-5.5の酢酸緩衝液を含む。本発明の1つの実施形態では、結合剤組成物は、凍結乾燥ケーキ又は水溶液の形態で、所望の純度を有する選択組成物を任意の製剤物質 (Remington's Pharmaceutical Sciences、前出) と混合することにより保存用に調製しうる。さらに、結合物質生成物は、スクロースなどの適切な賦形剤を用いて凍結乾燥物として製剤しうる。

【0250】

医薬組成物は非経口的送達のために選択することができる。選択的に、該組成物は、吸入用、又は経口、耳、眼、直腸又は膣経路などの経腸的送達用を選択しうる。そのような医薬適合性の組成物の調製は当分野の技術範囲内である。

【0251】

製剤成分は、投与部位に許容される濃度で存在する。例えば、緩衝剤は、組成物を生理的pH又はわずかに低いpH、典型的には約5-約8の範囲内のpHに維持するために使用される。

【0252】

非経口投与を考慮するとき、本発明において使用するための治療組成物は、医薬適合性のビヒクル中に所望の特異的結合物質を含む、発熱物質不含の非経口的に許容される水溶液の形態でありうる。非経口注射用の特に適切なビヒクルは、結合物質が、適切に保存された無菌等張溶液として製剤される無菌蒸留水である。さらにもう1つの製剤は、蓄積注射によって送達されうる生成物の制御された放出又は持続放出を提供する、注射用ミクロスフェア、生体受食性粒子、ポリマー化合物 (ポリ乳酸、ポリグリコール酸)、ビーズ又はリポソームなどの物質と所望分子の製剤を含む。ヒアルロン酸も使用でき、これは循環中に保持される期間を延長する効果を有しうる。所望分子の導入のための他の適切な手段は、移植可能な薬剤送達装置を含む。

【0253】

もう1つの局面では、非経口投与に適する医薬組成物は、水溶液中、好ましくはハanks液、リンガー液又は生理緩衝食塩水などの生理的に適合性の緩衝液中で製剤されうる。水性注射懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール又はデキストランなどの、懸濁液の粘度を上昇させる物質を含みうる。さらに、活性化化合物の懸濁液は適切な油性注射懸濁液中で調製しうる。適切な親油性溶媒又はビヒクルは、ゴマ油などの脂肪油、又はオレイン酸エチル、トリグリセリドなどの合成脂肪酸エステル、又はリポソームを含む。非脂質ポリカチオンアミノポリマーも送達のために使用しうる。任意に、懸濁液はまた、化合物の溶解度を上昇させ、高度濃縮溶液の調製を可能にする適切な安定剤又は作用物質を含みうる。

【0254】

もう1つの実施形態では、医薬組成物を吸入用に製剤しうる。例えば、結合物質は吸入

10

20

30

40

50

用の乾燥粉末として製剤しうる。ポリペプチド又は核酸分子吸入溶液はまた、エーロゾル送達のために推進薬と共に製剤しうる。さらにもう1つの実施形態では、溶液を噴霧化しうる。肺投与はさらにPCT特許願第PCT/US94/001875号に記述されており、この特許願は化学修飾したタンパク質の肺送達を述べている。

【0255】

一部の製剤は経口的に投与しうると想定される。本発明の1つの実施形態では、このようにして投与される結合物質分子は、錠剤及びカプセルなどの固形投与形態の調合において慣例的に使用される担体と共に又は担体なしで製剤することができる。例えば、カプセルは、生体利用効率が最大化され、前全身性（pre-systemic）分解が最小化されるときに胃腸管の一定部位で製剤の活性部分を放出するように設計しうる。結合物質分子の吸収を促進するために付加的な物質を含むことができる。希釈剤、着香剤、低融点ろう、植物油、潤滑剤、沈殿防止剤、錠剤崩壊剤及び結合剤も使用しうる。

10

【0256】

経口投与用の医薬組成物はまた、経口投与に適した用量でこの技術分野において周知の医薬適合性の担体を用いて製剤できる。そのような担体は、患者による摂取のために、医薬組成物を錠剤、丸剤、糖衣丸、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液等に製剤することを可能にする。

【0257】

経口使用のための医薬製剤は、活性化合物を固体賦形剤と一緒にし、生じた顆粒の混合物を加工して（任意に、摩砕した後）、錠剤又は糖衣丸コアを得ることを通して入手できる。所望に応じて、適切な補助剤を加えることができる。適切な賦形剤は、ラクトース、スクロース、マンニトール及びソルビトールを含む、糖類などの糖質又はタンパク質充填剤；トウモロコシ、コムギ、イネ、ジャガイモ又は他の植物からのデンプン；メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース又はカルボキシメチルセルロースナトリウムなどのセルロース；アラビアゴム及びトラガカントを含むゴム；及びゼラチン及びコーゲンなどのタンパク質を含む。所望する場合は、架橋ポリビニルピロリドン、寒天及びアルギン酸又はアルギン酸ナトリウムのようなその塩などの、崩壊剤又は可溶化剤を加えてもよい。

20

【0258】

糖衣丸コアは、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポルゲル、ポリエチレングリコール及び／又は二酸化チタンを同時に含むうる濃縮糖溶液、ラッカー溶液、及び適切な有機溶媒又は溶媒混合物などの適切な被覆物と共に使用しうる。製品の特定のため又は活性化合物の量、すなわち用量を特徴付けるために、染料又は顔料を錠剤又は糖衣丸被覆物に加えてもよい。

30

【0259】

経口的に使用できる医薬製剤はまた、ゼラチンで作られるプッシュフィットカプセル、ならびにゼラチンとグリセロール又はソルビトールなどの被覆物で作られる密封軟カプセルを含む。プッシュフィットカプセルは、ラクトース又はデンプンなどの充填剤又は結合剤、タルク又はステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤、及び任意に安定剤と混合した有効成分を含むうる。軟カプセルでは、活性化合物を、安定剤と共に又は安定剤なしで、脂肪油、液体、又は液状ポリエチレングリコールなどの適切な液体に溶解しうるか又は懸濁しうる。

40

【0260】

もう1つの医薬組成物は、錠剤の製造に適する非毒性賦形剤と混合して有効量の結合剤を含むうる。錠剤を無菌水又は適切なビヒクルに溶解することにより、溶液を単位用量形態で調製することができる。適切な賦形剤は、炭酸カルシウム、炭酸又は重炭酸ナトリウム、ラクトース又はリン酸カルシウムなどの不活性希釈剤；若しくはデンプン、ゼラチン又はアカシアなどの結合剤；若しくはステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸又はタルクなどの潤滑剤を含むが、これらに限定されない。

【0261】

50

さらなる医薬組成物は、持続又は制御送達製剤中に結合物質分子を含有する製剤を含めて、当業者には明らかである。リポソーム担体、生体受食性マイクロ粒子又は多孔性ビーズ及び蓄積注射などの様々な他の持続又は制御送達手段を製剤するための手法も、当業者に既知である。例えば、医薬組成物の送達のための多孔性ポリマーマイクロ粒子の制御放出を述べている、PCT/US93/00829号参照。持続放出製剤のさらなる例は、成形製品、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態の半透性ポリマーマトリックスを含む。持続放出マトリックスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリアクチド（米国特許第3,773,919号、EP58,481号）、L-グルタミン酸とγ-エチル-L-グルタメートのコポリマー [Sidmanら、Biopolymers, 22:547-556 (1983)]、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート) [Langerら、J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277 (1981)] 及び [Langerら、Chem. Tech., 12:98-105 (1982)]、エチレンビニルアセテート (Langerら、前出) 又はポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸 (EP133,988号) を含む。持続放出性組成物はまた、この技術分野で既知のいくつかの方法のいずれかによって調製できる、リポソームを含む。例えば、Eppsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 82:3688-3692 (1985); EP36,676号; EP88,046号; EP143,949号参照。

10

【0262】

インビボ投与のために使用される医薬組成物は、典型的には無菌でなければならない。これは無菌ろ過膜を通してろ過することによって達成しうる。組成物を凍結乾燥する場合は、この方法を用いる滅菌は、凍結乾燥及び再形成の前又は後に実施しうる。非経口投与用の組成物は、凍結乾燥形態又は溶液として保存しうる。さらに、非経口組成物は一般に、無菌アクセス口を有する容器、例えば皮下注射針を刺し通すことができる栓のついた静脈内溶液バッグ又はバイアル内に納められる。

20

【0263】

ひとたび医薬組成物が製剤されれば、溶液、懸濁液、ゲル、乳剤、固体、若しくは脱水又は凍結乾燥粉末として無菌バイアル中で保存しうる。そのような製剤は、即時使用形態又は投与前に再形成を必要とする形態（例えば凍結乾燥）で保存しうる。

【0264】

特定実施形態では、本発明は、単回用量投与単位を生成するためのキットを対象とする。そのキットは各々、乾燥タンパク質を含む第一容器及び水性製剤を含む第二容器の両方を含む。単一及び多区画予備充填注射器（例えば液体注射器及びlyosyringe）を含むキットも本発明の範囲内に含まれる。

30

【0265】

治療的に使用される医薬組成物の有効量は、例えば治療背景及び目的に依存する。当業者は、治療のための適切な用量レベルが、それ故、一部には、送達される分子、そのために結合物質分子が使用される適応症、投与経路、及び患者のサイズ（体重、体表面積又は器官の大きさ）及び状態（年齢及び一般的健康状態）に依存して変化することを認識する。従って、臨床医は、至適治療効果を得るために用量を調節し、投与経路を修正しうる。典型的な用量は、上述した因子に依存して、約0.1mg/kgから約100mg/kg又はそれ以上の範囲をとりうる。他の実施形態では、用量は、約0.1mg/kgから約100mg/kg; 又は1mg/kgから約100mg/kg; 又は約5mg/kgから約100mg/kgの範囲をとりうる。

40

【0266】

いかなる化合物についても、治療上有効な用量は、最初に細胞培養アッセイにおいて若しくはマウス、ラット、ウサギ、イヌ、ブタ又はサルなどの動物モデルにおいて評価することができる。動物モデルはまた、適切な濃度範囲及び投与経路を決定するためにも使用しうる。次にそのような情報を使用して、ヒトにおける投与のために有用な用量及び経路を決定することができる。

50

【0267】

正確な用量は、治療を必要とする被験対象に関連する因子に照らして決定される。用量及び投与は、活性化化合物の十分なレベルを提供するように又は所望効果を維持するように調整する。考慮しうる因子は、疾患状態の重症度、被験対象の全般的健康状態、被験対象の年齢、体重及び性別、投与の時間及び頻度、薬剤の組合せ、反応感受性、及び治療に対する応答を含む。長時間作用性医薬組成物は、個々の製剤の半減期及びクリアランス速度に依存して3日から4日ごと、週に1回又は2週間に1回投与しうる。

【0268】

投与頻度は、使用する製剤中の結合物質分子の薬物動態パラメータに依存する。典型的には、所望効果を達成する用量に達するまで組成物を投与する。該組成物は、それ故、単回用量として、又は所与の期間にわたる多回用量として（同じか又は異なる濃度／用量で）、又は持続注入として投与しうる。適切な用量のさらなる改善は常套的に行われる。適切な用量－反応データの使用を通して適切な用量を確認しうる。

10

【0269】

医薬組成物の投与経路は既知の方法に従う、例えば経口的、静脈内、腹腔内、大脳内（実質内）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内、病巣内経路による注射を通して、髄内、クモ膜下腔内、心室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻内、経腸的、局所、舌下、尿道、膣又は直腸的手段によって、持続放出システムによって又は移植装置によって投与される。所望する場合は、該組成物は、ボーラス注射によって又は注入によって持続的に、又は移植装置によって投与しうる。

20

【0270】

代替的に又は付加的に、該組成物は、膜、海綿又は所望分子が吸収されている又は被包されている別の適切な材料の移植を通して局所的に投与しうる。移植装置を使用する場合は、装置を適切な組織又は器官に移植し、拡散、持続放出型（*timed-release*）ボーラス又は持続投与によって所望分子を送達しうる。

【0271】

一部の場合は、半ビボ的に医薬組成物を使用することが望ましいと考えられる。そのような場合は、患者から切除した細胞、組織又は器官を医薬組成物に暴露し、その後それらの細胞、組織及び／又は器官を患者の体内に移植する。

【0272】

別の場合には、ペプチ体などの本発明の結合物質を、ここで述べるような方法を使用して該ポリペプチドを発現し、分泌するように遺伝子操作したある種の細胞を移植することによって送達することができる。そのような細胞は、動物又はヒト細胞でありえ、また自己由来、異種又は組織移植片に関して異種でありうる。任意に、前記細胞は不朽化しうる。免疫学的応答の可能性を低下させるため、周辺組織の浸潤を回避するように細胞を被包しうる。被包材料は、典型的には、タンパク質産物の放出は許容するが、患者の免疫系又は周辺組織からの他の有害因子による細胞の破壊を防ぐ、生体適合性の半透性ポリマーエングロージャー又は膜である。

30

【0273】

併用療法

ペプチ体などの本発明の特異的結合物質は、*Ang-2* 発現に関連する疾患の治療において他の治療薬と組み合わせて使用することができる。これらの他の治療薬は、例えば放射線治療、化学療法、及び*Herceptin*（商標）、*Rituxan*（商標）、*Gleevec*（商標）等のような標的療法を含む。ここで特定して列挙しない付加的な併用療法も本発明の範囲内である。

40

【0274】

化学療法は、例えば、メクロルエタミン、シクロホスファミド、イフォスファミド、メルファラン及びクロラムブシルなどのナイトロジェンマスタード、カルムスチン（*BCNU*）、ロムスチン（*CCNU*）及びセムスチン（メチルー*CCNU*）などのニトロソ尿素、トリエチレンメラミン（*TEM*）、トリエチレン、チオホスホルアミド（チオテパ）、

50

ヘキサメチルメラミン（HMM、アルトレタミン）などのエチレンイミン／メチルメラミン、ブスルファンなどのスルホン酸アルキル、ダカルバジン（DTIC）などのトリアジンを含むアルキル化剤；メトトレキサート及びトリメトトレキサートなどの葉酸類似体、5-フルオロウラシル、フルオロデオキシウリジン、ゲンシタビン、シトシンアラビノシド（AraC、シタラビン）、5-アザシチジン、2, 2'-ジフルオロデオキシシチジン、などのピリミジン類似体、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、アザチオプリンなどのプリン類似体、2'-デオキシコフォルマイシン（ペントスタチン）、エリスロヒドロキシニルアデニン（EHNA）、リン酸フルダラビン及び2-クロロデオキシアデノシン（クラドリビン、2-CdA）を含む代謝拮抗物質；パクリタキセルなどの抗有糸分裂薬、ビンブラスチン（VLB）、ビンクリスチン及びビンオレルビンを含むビンカルカロイド、タキソテール、エストラムスチン及びリン酸エストラムスチンを含む天然産物；エトポシド及びテニポシドなどのポドフィロトキシン（*podophyllotoxin*）；アクチノマイシンD、ダウノマイシン（ルビドマイシン）、ドキシソルピシン、ミトキサントロン、イダルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシン（ミトラマイシン）、ミトマイシンC及びアクチノマイシンなどの抗生物質；L-アスパラギナーゼなどの酵素；インターフェロン- α 、IL-2、G-CSF及びGM-CSFなどの生物学的応答変性剤；シスプラチン及びカルボプラチンなどの白金配位錯体、ミトキサントロンなどのアントラセンジオン、ヒドロキシ尿素などの置換尿素、N-メチルヒドラジン（MIH）及びプロカルバジンを含むメチルヒドラジン誘導体、ミトタン（*o*, *p*'-DDD）及びアミノグルテチミドなどの副腎皮質抑制剤を含むその多量体ポリペプチド複合体の薬剤；プレドニゾン及び等価物、デキサメタゾン及びアミノグルテチミドなどのアドレノコルチコイド拮抗物質を含むホルモン及び拮抗物質；カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、酢酸メドロキシプロゲステロン及び酢酸メゲストロールなどのプロゲステン；ジエチルスチルベストロール及びエチニルエストラジオール等価物などのエストロゲン；タモキシフェンなどの抗エストロゲン；プロピオン酸テストステロン及びフルオキシメステロン／等価物を含むアンドロゲン；フルタミド、性腺刺激ホルモン放出ホルモン類似体及びロイプロリドなどの抗アンドロゲン；及びフルタミドなどの非ステロイド系抗アンドロゲンを含む、抗腫瘍性薬剤を使用することができる。

【0275】

成長因子との併用療法は、サイトカイン、リンホカイン、成長因子、又はM-CSF、GM-CSF、TNF、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IFN、TNF α 、TNF β 、TNF γ 、G-CSF、Meg-CSF、GM-CSF、トロンボポエチン、幹細胞因子及びエリトロポエチンなどの他の造血因子を含みうる。組成物が含みうるその他の成長因子は、既知のアンギオポエチン、例えばAng-1、-2、-4、-Y及び／又はヒトAng様ポリペプチド、及び／又は血管内皮細胞増殖因子（VEGF）である。成長因子は、アンギオゲニン、骨誘導因子-1、骨誘導因子-2、骨誘導因子-3、骨誘導因子-4、骨誘導因子-5、骨誘導因子-6、骨誘導因子-7、骨誘導因子-8、骨誘導因子-9、骨誘導因子-10、骨誘導因子-11、骨誘導因子-12、骨誘導因子-13、骨誘導因子-14、骨誘導因子-15、骨誘導因子受容体IA、骨誘導因子受容体IB、脳由来神経栄養因子、毛様体神経栄養因子、サイトカイン誘導好中球走化性因子1、サイトカイン誘導好中球走化性因子2、内皮細胞増殖因子、エンドセリン1、上皮増殖因子、上皮由来好中球活性化因子、線維芽細胞増殖因子4、線維芽細胞増殖因子5、線維芽細胞増殖因子6、線維芽細胞増殖因子7、線維芽細胞増殖因子8、線維芽細胞増殖因子8b、線維芽細胞増殖因子8c、線維芽細胞増殖因子9、線維芽細胞増殖因子10、酸性線維芽細胞増殖因子、塩基性線維芽細胞増殖因子、グリア細胞系由来神経栄養因子受容体-1、グリア細胞系由来神経栄養因子受容体-2、成長関連タンパク質、成長関連タンパク質-1、成長関連タンパク質-2、成長関連タンパク質-3、ヘパリン結合性上皮増殖因子、肝細胞増殖因子、肝細胞増殖因子受容体、インスリン様増殖因子I、インスリン様増殖

因子受容体、インスリン様増殖因子 I I、インスリン様増殖因子結合性タンパク質、角化細胞増殖因子、白血病阻害因子、白血病阻害因子受容体-1、神経成長因子、神経成長因子受容体、ニューロトロフィン-3、ニューロトロフィン-4、胎盤増殖因子、胎盤増殖因子2、血小板由来内皮細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、血小板由来増殖因子A鎖、血小板由来増殖因子A A、血小板由来増殖因子A B、血小板由来増殖因子B鎖、血小板由来増殖因子B B、血小板由来増殖因子受容体-1、血小板由来増殖因子受容体-2、プレB細胞増殖刺激因子、幹細胞因子、幹細胞因子受容体、トランスフォーミング増殖因子-1、トランスフォーミング増殖因子-2、トランスフォーミング増殖因子-1、トランスフォーミング増殖因子-1. 2、トランスフォーミング増殖因子-2、トランスフォーミング増殖因子-3、トランスフォーミング増殖因子-5、潜伏性 (l a t e n t) トランスフォーミング増殖因子-1、トランスフォーミング増殖因子-1 結合性タンパク質 I、トランスフォーミング増殖因子-1 結合性タンパク質 I I、トランスフォーミング増殖因子-1 結合性タンパク質 I I I、腫瘍壊死因子受容体 I 型、腫瘍壊死因子 I I 型、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子、血管内皮細胞増殖因子及びキメラタンパク質、及びそれらの生物学的又は免疫学的に活性なフラグメントを含む。

10

【0276】

免疫療法

免疫療法は一般に、免疫エフェクター細胞及び癌細胞を標的して破壊する分子の使用に基づく。免疫エフェクターは、例えば標的細胞の表面上のある種のマーカーを認識する本発明のペプチ体でありうる。前記ペプチ体は、単独で治療のエフェクターとしての役割を果たすか、若しくは実際に細胞の死滅を生じさせる他の細胞を集積しうる。ペプチ体はまた、薬剤又は毒素（化学療法剤、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素等）に複合することができ、それ故単に標的物質としても役立つ。

20

【0277】

本発明によれば、A n g - 2 の突然変異形態は、本発明のペプチ体又はペプチ体複合体の免疫療法による標的となりうる。本発明のペプチ体組成物を、A n g - 2 標的治療と組み合わせた併用療法アプローチにおいて使用しうるものが特に想定される。

【0278】

受動免疫療法はいくつかの癌に対して特に有効であることが証明されている。例えば、W O 9 8 / 3 9 0 2 7 号参照。

30

【0279】

下記の実施例は例示のみを意図するものであり、いかなる意味においても本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

【実施例1】

【0280】

病的及び正常組織における A n g - 2 発現

インサイチュアハイブリダイゼーションを用いて正常及び病的組織における A n g - 2 発現を検査した。ヒト (G e n b a n k アクセス番号: A F 0 0 4 3 2 7、ヌクレオチド 1 2 7 4 - 1 7 2 6) 及びマウス (G e n b a n k アクセス番号: A F 0 0 4 3 2 6、ヌクレオチド 1 1 3 5 - 1 5 8 8) A n g - 2 配列のフラグメントを、ヒト又はマウス胎児肺 c D N A からの逆転写酵素-PCRによって増幅し、p G E M - T プラスミドにクローニングして、塩基配列決定によって確認した。³³P 標識アンチセンス R N A プローブを、³³P-U T P 及び R N A ポリメラーゼを使用して線状化プラスミド鋳型から転写した。ホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋した組織の塊を 5 μ m の切片にし、充填したスライドガラス上で収集した。インサイチュアハイブリダイゼーションの前に、組織を 0. 2 M H C l で透過性を上げ、次にプロテイナーゼ K で消化して、トリエタノールアミン及び酢酸無水物でアセチル化した。切片を 5 5 ° C で一晩放射能標識プローブとハイブリダイズし、その後 R N アーゼ消化及び約 0. 1 X S S C 中 5 5 ° C での高ストリンジェンシー洗浄に供した。スライドガラスを K o d a k N T B 2 乳剤に浸し、4 ° C で 2 週間から 3 週間露光して、現像し、対比染色した。組織の形態とハイブリダイゼーションシグナ

40

50

ルを同時評価できるように切片を暗領域と標準照明で検査した。

【0281】

その結果は、健常な出生後のヒトでは、Ang-2の発現は卵巣、胎盤及び子宮などの血管形成性血管系を含むいくつかの組織に限定されることを示唆した。健常成人の心臓、脳、腎臓、肝臓、肺、脾臓、脾臓、筋肉、扁桃、胸腺、虫垂、リンパ節、胆嚢、前立腺又は精巣では、Ang-2の発現は検出できなかった。5週齢のマウスでは、腎臓は直細血管において著明なAng-2発現を示した（しかし成体サル又はヒトではAng-2発現は認められなかった）。この発現が胚発生の痕跡であるのかどうかを調べるため、マウスAng-2プローブと上述した条件を使用して、1年齢までの年齢範囲にわたるマウスに由来する腎臓に関してこの実験を反復した。Ang-2発現は新生児発育の間低下することが認められたが、1年齢のマウスの腎臓においてもまだ明らかであった。

10

【0282】

Ang-2発現はまた、結腸癌（5例）、乳癌（10例）、肺癌（8例）、グリア芽細胞腫（1例）などの原発性ヒト腫瘍、乳癌（2例）、肺癌（2例）及び脳に転移していた卵巣癌（2例）などの転移性ヒト腫瘍、及びC6（ラット神経膠腫）、HT29（ヒト結腸癌）、Colo-205（ヒト結腸癌）、HCT116（ヒト結腸癌）、A431（ヒト類表皮腫）、A673（ヒト横紋筋肉腫）、HT1080（ヒト線維肉腫）、PC-3（ヒト前立腺癌）、B16F10（マウス黒色腫）、MethA（マウス肉腫）、及びBLISラットの肺癌転移（met s）などのげっ歯類腫瘍モデルを含む、試験した実質的にすべての腫瘍型においても検出された。さらに、Ang-2発現は、VEGFに応答してMatrigel栓子へと成長する新生血管において及び未熟児網膜症のマウス低酸素症モデルにおいて検出された。

20

【実施例2】

【0283】

Ang-2ペプチ体を評価するための分子アッセイ

Ang-2及び関連ファミリー成員へのペプチ体の直接結合及びAng-2: Tie-2相互作用へのペプチ体の作用を評価するために、分子アッセイ（アフィニティーELISA、中和ELISA及びBIAコア）を開発した。これらのインビトロアッセイを下記に述べる。

【0284】

アフィニティーELISA

候補抗Ang-2ペプチ体の初期スクリーニングのために、精製ヒトAng-2（R&D Systems, Inc. ; カタログ番号623-AN; Ang-2は2つのトラнкеートバージョンの混合物として提供される）又はマウスAng-2ポリペプチド（上述したように調製した）を使用した。確認結合アッセイのために、完全長ヒトAng-2 DNAでトランスフェクトし、約50 µg/mlのウシ血清アルブミン（BSA）を含む無血清ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）中で培養したヒト293T細胞の順化培地からヒトAng-2を得た。

30

【0285】

マイクロタイタープレートを使用して、約100 µl/穴のAng-2を各々のウェルに加え、プレートを約2時間インキュベートした後、約0.1% Tween-20を含むリン酸緩衝食塩水（PBS）でプレートを4回洗った。次にPBS中約5% BSA 約250 µl/穴を使用してウェルを遮断し、プレートを室温で約2時間インキュベートした。インキュベーション後、過剰の遮断溶液を廃棄し、各々の候補抗Ang-2ペプチ体約100 µlを、約40ナノモルの濃度から出発し、約1% BSAを含むPBS中で連続的に4倍に希釈する希釈シリーズでウェルに加えた。その後プレートを室温で一晩インキュベートした。インキュベーション後、約0.1% Tween-20を含むPBSでプレートを洗った。洗浄をさらに4回繰り返した後、あらかじめ1% BSAを含むPBS中で1:5000に希釈しておいた約100 µl/穴のヒツジ抗ヒトIgG（Fc）-HRP（Pierce Chemical Co., カタログ番号31416）を加えた。プレー

40

50

トを室温で約1時間インキュベートした。次に約0.1% Tween-20を含むPBSでプレートを5回洗った後、約100 μ l/穴のTMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンLiquid Substrate System; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO、カタログ番号T8665)基質を加え、青色を呈するまでプレートを約5分から15分間インキュベートした。その後分光光度計において約370nmで吸光度を読み取った。

【0286】

中和ELISA

ヒトAng-2ポリペプチドが結合したマイクロタイタープレートを、アフィニティーELISAについて述べたように調製した。候補抗Ang-2ペプチ体を、約1%BSA及び約1nM Tie-2(Tie-2部分が分子の可溶性細胞外部分だけを含むTie-2-Fc分子として提供される; R&D Systems, カタログ番号313-TI)を含むPBSの溶液中4倍希釈で1000nMから0.2pMまで滴定した。約100 μ lの抗体/Tie-2溶液を各々のウェルに加えた後、プレートを室温で一晩インキュベートし、その後約0.1% Tween-20を含むPBS中で5回洗った。洗浄後、約100 μ l/穴の抗Tie-2抗体(Pharmingen Inc., カタログ番号557039)を加えて約1 μ g/mlの最終濃度にし、プレートを室温で約1時間インキュベートした。次に、約100 μ l/穴のヤギ抗マウスIgG-HRP(Pierce Chemical Co., カタログ番号31432)を、約1%BSAを含むPBS中1:10,000の希釈で加えた。プレートを室温で約1時間インキュベートした後、約0.1% Tween-20を含むPBSでプレートを5回洗った。次に約100 μ l/穴のTMB基質(上述)を加えて、呈色させた。その後分光光度計において370nmで吸光度を読み取った。

【0287】

アフィニティーBIAコア

各々の候補Ang-2ペプチ体のアフィニティー分析を、PBS及び0.005%P20界面活性剤(Biacore, Inc.)をランニング緩衝液としてBIAコア(登録商標)2000(Biacore, Inc., Piscataway, NJ)で実施した。組換えプロテインG(Repligen, Needham, MA)を、Amine Coupling Kit(Biacore, Inc.)を製造者の指示するプロトコールに従って使用して、第一級アミン基によって研究グレードのCM5センサーチップ(Biacore, Inc.)に固定した。

【0288】

最初に固定化プロテインGに対する各々の候補抗Ang-2ペプチ体約100Ruを捕獲して、その後様々な濃度(0nMから100nM)のhuAng-2又はmAng-2を50 μ l/分の流速で3分間、結合抗体表面に注入することによって結合アッセイを実施した。 k_a (会合速度定数)、 k_d (解離速度定数)及び K_D (解離平衡定数)を含むペプチ体結合の速度論的パラメータを、BIA評価3.1コンピュータプログラム(Biacore, Inc.)を用いて測定した。より低い解離平衡定数は、Ang-2に対するペプチ体のより大きな親和性を示唆した。

【実施例3】

【0289】

Ang-2結合ペプチドの特定

1. Ang-2被覆磁気ビーズの調製

A. 磁気ビーズへのAng-2の固定

非特異的溶出のために、ビオチニル化Ang-2タンパク質(Biotinylated Recombinant Human Angiopoietin-2, R&D Systems, Inc.; カタログ番号BT623)を、3回の選択すべてについて、製造者からのビーズ原液100 μ lにつきビオチニル化Ang-2タンパク質約4 μ gの濃度でStreptavidin Dynabeads(Dynal, Lake Succ

ess, NY) 上に固定した。抗原 (Ang-2) と受容体 (Tie-2) の溶出のために、ビオチニル化 Ang-2 タンパク質 $2\mu\text{g}$ を、2 回目の選択に関して、Streptavidin Dynabeads $50\mu\text{l}$ 上に固定した。3 回目の選択に関しては、被覆濃度をビーズ原液 $50\mu\text{l}$ につきビオチニル化 Ang-2 タンパク質約 $1\mu\text{g}$ に低下させた。磁石を使用してビーズを試験管の一方の側に引き寄せ、液体をピペットで取り除くことにより、ビーズをリン酸緩衝食塩水 (PBS) で 5 回洗い、PBS に再懸濁した。ビオチニル化 Ang-2 タンパク質を上記濃度の洗ったビーズに加え、回転させながら室温で 1 時間インキュベートし、その後、回転させながら 4°C で数時間から一晩インキュベートした。次に、約 1% の最終濃度まで BSA を加えて Ang-2 被覆ビーズを遮断し、回転させながら 4°C で一晩インキュベートした。生じた Ang-2 被覆ビーズを PBS で 5 回洗った後、選択手順に供した。

10

【0290】

B. 陰性選択ビーズの作製

陰性選択のためにさらなるビーズを作製した。各々のパニング条件に関して、製造者からのビーズ原液 $500\mu\text{l}$ を、ビオチニル化 Ang-2 に関するインキュベーション段階を省くことを除いて、上記手順 (1A 項) に供した。最後の線状段階で、ビーズを 5 つの $100\mu\text{l}$ アリコートに分けた。

【0291】

2. Ang-2 結合ファージの選択

A. 全体的戦略

20

「TN8-I X」 (5×10^9 の独立した形質転換体)、「TN12-I」 (1.4×10^9 の独立した形質転換体)、及び「Linear」 (2.3×10^9 の独立した形質転換体) (すべて Dya x Corp. より) と称される 3 つの糸状ファージライブラリーを Ang-2 結合ファージに関する選択に使用した。各々のライブラリーを非特異的溶出、Ang-2 溶出、及び受容体溶出 (Tie-2) のいずれかに供した。9 つの異なるパニング条件を Ang-2 に関して実施した (非特異的溶出法を用いる TN8-I X、Ang-2 溶出法を用いる TN8-I X、Tie-2 溶出法を用いる TN8-I X、非特異的溶出法を用いる TN12-I、Ang-2 溶出法を用いる TN12-I、Tie-2 溶出法を用いる TN12-I、非特異的溶出法を用いる Linear、Ang-2 溶出法を用いる Linear、及び Tie-2 溶出法を用いる Linear)。3 つのライブラリーすべてについて、1 回目の選択からのファージは、さらなる回の選択のために非特異的にのみ溶出した。2 回目と 3 回目の選択においては Ang-2 及び Tie-2 溶出を使用した。Linear ライブラリーについては、第 2 回目により Ang-2 及び Tie-2 溶出に関して選択を実施した。

30

【0292】

B. 陰性選択

各々のパニング条件のために、TN8-I X 及び TN12-I ライブラリー (TN8-I X については約 5×10^{11} pfu、及び TN12-I については約 1.4×10^{11} pfu) に関しては約 100 のランダムなライブラリー等価物、及び Linear ライブラリー (約 1×10^{11} pfu) に関しては約 10 のランダムなライブラリー等価物をライブラリー原液からアリコートに分けて、PBST (PBS と 0.05% Tween-20) で約 $400\mu\text{l}$ に希釈した。最後の洗浄後、陰性選択 (1B 項) のために調製したビーズの最初の $100\mu\text{l}$ アリコートから液体を抜き取り、約 $400\mu\text{l}$ の希釈ライブラリー原液をビーズに加えた。生じた混合物を回転させながら室温で約 10 分間インキュベートした。磁石を用いてファージ上清を抜き取り、もう 1 つの陰性選択段階のための第二の $100\mu\text{l}$ アリコートに加えた。このようにして、5 つの陰性選択段階を実施した。

40

【0293】

C. Ang-2 タンパク質被覆ビーズを用いた選択

最後の陰性選択段階 (1B 項) 後のファージ上清を Ang-2 被覆ビーズ (1A 項) に加えた。この混合物を回転させながら室温で 1 時間から 2 時間インキュベートして、ファ

50

ージを標的タンパク質に結合させた。上清を廃棄した後、ビーズをP B S Tで約10回洗浄し、次にP B Sで2回洗浄した。

【0294】

D. 非特異的溶出

最終洗浄後、液体を抜き取り(2C項)、Min A塩溶液(60mM K_2HPO_4 、33mM KH_2PO_4 、7.6mM $(NH_4)SO_4$ 、及び1.7mMクエン酸ナトリウム)約1mlをビーズに加えた。このビーズ混合物を注射用の濃縮細菌試料(下記の3A及び3B項参照)に直接加えた。

【0295】

E. 結合ファージの抗原(Ang-2)溶出

2回目に関しては、最後の洗浄段階(2C項)後、各々の条件について1pM、0.1nM及び10nMの組換えAng-2タンパク質(Recombinant Human Angiopoietin-2, R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota)100μlを連続的に加え、30分間インキュベートすることにより、結合ファージを磁気ビーズから溶出した。残りのファージは非特異的に溶出した(2D項)。10nMから溶出したファージと非特異的溶出ファージを合わせて、3回目の選択に供した(下記の4項参照)。

【0296】

3回目に関しては、最後の洗浄段階(2C項)後、各々の条件について約1nMの組換えAng-2タンパク質、及び10nMの組換えAng-2タンパク質を連続的に加え、30分間インキュベートすることにより、結合ファージを磁気ビーズから溶出した。さらに、回転装置上で約10分間、100mMトリエチルアミン溶液(Sigma, St. Louis, Missouri)1mlでファージを溶出した。ファージ含有トリエチルアミン溶液のpHを1M Tris-HCl(pH7.5)0.5mlで中和した。100mMトリエチルアミン溶液による最後の溶出後、ビーズを細菌に加えることによって残りのファージを溶出した(2D項)。

【0297】

F. 結合ファージの受容体(Tie-2)溶出

2回目に関しては、最後の洗浄段階(2C項)後、各々の条件について1pM、0.1nM及び10nMの組換えTie-2タンパク質(Recombinant Human Tie-2-Fc Chimera, R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota)約100μlを連続的に加え、30分間インキュベートすることにより、結合ファージを磁気ビーズから溶出した。残りのファージは非特異的に溶出した(2D項)。10nMから溶出したファージと非特異的溶出ファージを合わせて、3回目の選択に供した(下記の4項参照)。

【0298】

3回目に関しては、最後の洗浄段階(2C項)後、各々の条件について約1nMの組換えTie-2タンパク質、及び10nMの組換えTie-2タンパク質を連続的に加え、30分間インキュベートすることにより、結合ファージを磁気ビーズから溶出した。さらに、回転装置上で10分間、100mMトリエチルアミン溶液(Sigma, St. Louis, Missouri)1mlでファージを溶出した。ファージ含有トリエチルアミン溶液のpHを1M Tris-HCl(pH7.5)0.5mlで中和した。100mMトリエチルアミン溶液による最後の溶出後、ビーズを細菌に加えることによって残りのファージを溶出した(2D項)。

【0299】

3. 増幅

A. 平板培養細胞の調製

新鮮大腸菌(XL-1 Blue MRF')培養を、約12.5μg/mlテトラサイクリンを含むLB培地中約0.5のOD₆₀₀まで増殖させた。各々のパニング条件のために、この培養物約20mlを氷上で冷却し、遠心分離した。その細菌ペレットをMi

10

20

30

40

50

n A塩溶液約1mlに再懸濁した。

【0300】

B. 形質導入

上記に述べた(2D、2E及び2F項)各々の異なる溶出法からの各混合物を濃縮細菌試料(3A項)に加え、約37℃で約15分間インキュベートした。NZCYM培地(2×NZCYM、50μg/mlアンピシリン)約2mlを各混合物に加え、約37℃で15分間インキュベートした。生じた4ml溶液を、約50μg/mlアンピシリンを含む大型NZCYM寒天平板に塗布し、37℃で一晩インキュベートした。

【0301】

C. ファージの採集

各々の細菌/ファージ混合物を大型NZCYM寒天平板(3B項)で一晩増殖させた後、それらを削り取ってLB培地約35mlに入れた。寒天平板をさらなるLB培地35mlでさらに濯いだ。生じたLB培地中の細菌/ファージ混合物を遠心分離して、細菌をペレット化除去した。ファージ上清約50mlを新鮮試験管に移し、PEG溶液(20%PEG8000、3.5M酢酸アンモニウム)約12.5mlを加えて、氷上で2時間インキュベートしてファージを沈殿させた。沈殿したファージを遠心分離し、ファージ再懸濁緩衝液(250mM NaCl、100mM Tris pH8、1mM EDTA)6mlに再懸濁した。このファージ溶液を、遠心分離して残りの細菌を除去し、PEG溶液約1.5mlを加えてファージを再び沈殿させることによってさらに精製した。遠心分離段階後、ファージペレットをPBS約400μlに再懸濁した。この溶液を最終的な遠心分離に供して、残存する細菌デブリの溶液を取り除いた。生じたファージ調製物を標準的なプラーク形成アッセイを用いて力価を検定した。

【0302】

4. さらなる選択と増幅

2回目では、1回目(3C項)からの増幅ファージ調製物(約 10^{10} pfu)を、選択及び増幅段階(2及び3項)を実施するための投入ファージとして使用した。Ang-2及びTie-2溶出のために、10nM及び非特異的溶出からのファージを一緒にして、3回目の選択のために増幅した。今度は、2回目からの増幅ファージ調製物(約 10^9 pfu)を3回目の選択及び増幅(2及び3項)を実施するための投入ファージとして使用した。3回目の溶出段階後(2D、2E及び2F)、溶出したファージの小分画をプラーク形勢アッセイ(3C項)におけるように平板培養した。個々のプラークを採取し、各々のウェルにTE緩衝液100μlを含む96穴マイクロタイタープレートに入れた。これらのマスタープレートを4℃で一晩インキュベートして、ファージをTE緩衝液に溶出させた。

【0303】

5. クロウン分析

ファージクロウンをファージELISA及びDNA塩基配列決定法によって分析した。これら2つのアッセイからの統合結果に基づいて配列を等級付けた。

【0304】

A. ファージELISA

XL-1 Blue MRF'培養物を、OD₆₀₀が約0.5に達するまで増殖させた。この培養物約30μlを96穴マイクロタイタープレートの各々のウェルに分配した。溶出したファージ(4項)約10μlを各々のウェルに加え、室温で約15分間細菌に感染させた。約12.5μg/mlテトラサイクリン及び約50μg/mlアンピシリンを含むLB培地約100μlを各ウェルに加えた。次にマイクロタイタープレートを振とうしながら約37℃で一晩インキュベートした。組換えAng-2タンパク質(PBS中約1μg/ml)を96穴Maxisorpプレート(NUNC)に約4℃で一晩結合させた。対照として、純粋なストレプトアビジンを、PBS中約2μg/mlで別のMaxisorpプレートに被覆した。

【0305】

その翌日、タンパク質被覆したMaxisorpプレート中の液体を廃棄し、各々のウェルを約4℃で一晩（選択的に、室温で1時間）、5%乳溶液約300μlで遮断した。その後乳溶液を廃棄して、ウェルをPBST溶液で3回洗った。最後の洗浄段階後、PBST-4%乳約50μlを、タンパク質被覆Maxisorpプレートの各々のウェルに加えた。96穴マイクロタイタープレートの各ウェルからの一晩培養物約50μlを、Ang-2被覆プレートならびに対照ストレプトアビジン被覆プレートの対応するウェルに移した。各々の種類のプレート中の100μl混合物を室温で約1時間インキュベートした。Maxisorpプレートから液体を廃棄し、ウェルをPBSTで約3回洗った。HRP複合抗M13抗体（Amersham Pharmacia Biotech）を約1:7, 500に希釈し、希釈溶液約100μlをMaxisorpプレートの各ウェルに加えて室温で約1時間インキュベートした。再び液体を廃棄し、ウェルをPBSTで約5回洗った。次にTMB基質（Sigma）約100μlを各ウェルに加え、5N H₂SO₄溶液約50μlで反応を停止させた。OD₄₅₀を分光光度計（Molecular Devices）で読み取った。

10

【0306】

B. ファージクロンの塩基配列決定

各々のファージクロンについて、PCRを用いて塩基配列決定鋳型を作製した。約500ヌクレオチドフラグメントを増幅するために下記のオリゴヌクレオチド対を使用した：

【0307】

20

【化1】

プライマー-1: 5'-CGGCGCAACTATCGGTATCAAGCTG-3' (SEQ ID NO: 54)

プライマー-2: 5'-CATGTACCGTAACACTGAGTTTCGTC-3' (SEQ ID NO: 55)

【0308】

30

下記の混合物を各々のクロンについて作製した：

【0309】

【表8】

試薬	容量(μL/試験管)
dH ₂ O	26.25
50%グリセロール	10
10XPCR 緩衝液(w/oMgCl ₂)	5
25mM MgCl ₂	4
10mM dNTP 混合物	1
100μMプライマー-1	0.25
100μMプライマー-2	0.25
Taq ポリメラーゼ	0.25
TE 中のファージ(4項)	3
最終反応物容量	50

40

【0310】

PCRのために、サーモサイクラー（GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems）を使用して下記のプログラムを実施した：94℃を5分間；（94℃を30秒間、55℃を30秒間、72℃を45秒間）×30サ

50

イクル；72℃を7分間；4℃に冷却。各々の反応からのPCR産物を、製造者のプロトコールに従ってQIAquick Multiwell PCR Purificationキット（Qiagen）を用いて精製した。その後、1%アガロースゲル上で染料（10×BBXSアガロースゲル充填染料）約1μlと共に各PCR反応混合物約10μlを泳動させて精製PCR産物を検定した。残りの産物は、ABI377 Sequencer（Perkin Elmer）を用いて製造者の勧めるプロトコールに従って塩基配列決定した。

【0311】

6. 配列の順位及びコンセンサス配列の決定

A. 配列の順位と分析

種々のヌクレオチド配列から翻訳されたペプチド配列（5B項）をELISAデータに相関付けた。Ang-2被覆ウェルにおいて高いOD₄₅₀を示し、ストレプトアビジン被覆ウェルでは低いOD₄₅₀を示すクローンにより高い優先順位を与えた。何度も出現する配列にも高い優先順位を与えた。ペプチド又はペプチ体としてのさらなる分析のためにこれらの判定基準に基づいて候補配列を選択した。

【0312】

B. コンセンサス配列の決定

3つの異なるクラスのコンセンサスモチーフを、次のようにしてTN8-IXライブラリーから作製した：

【0313】

【化2】

K R P C E E X W G G C X Y X (SEQ ID NO:56)

K R P C E E X F G G C X Y X (SEQ ID NO:57)

X X X C X D X Y W Y C X X X (SEQ ID NO:61)

X X X C X D X Y T Y C X X X (SEQ ID NO:62)

X X X C X D X F W Y C X X X (SEQ ID NO:63)

X X X C X D X F T Y C X X X (SEQ ID NO:64)

X X X C X W D P W T C E X M (SEQ ID NO:58)

【0314】

1つのコンセンサスモチーフをTN12-Iライブラリーから作製した：

【0315】

【化3】

W S X C A W F X G X X X X C R R X (SEQ ID NO:59)

【0316】

すべてのコンセンサスモチーフ配列について、各々の位置で最も頻繁に生じるアミノ酸を決定することにより、各々のコンセンサス配列から下線を付した「コアアミノ酸配列」を得た。「X」は何らかの天然に生じるアミノ酸を表わす。コア配列に隣接する2個のシステインは、TN8-IX及びTN12-Iライブラリーにおける固定アミノ酸であった。

【0317】

Ang-2に結合するものとして特定されたペプチドを下記の表3に示す。

【0318】

【表9】

表3：Ang-2結合ペプチド

ペプチド	配列番号	配列
TN8-8	1	KRPCEEMWGGCNYD
TN8-14	2	HQICKWDPWTCKHW
TN8-Con1	3	KRPCEEIFGGCTYQ
TN8-Con4	4	QEECEWDPWTCEHM
TN12-9	5	FDYCEGVDPFTFGCDNH
L1	6	KFNPLDELEETLYEQFTFQQ
C17	7	QYGCDGFLYGCMIN

10

【実施例4】

【0319】

20

ペプチ体をコードするDNAの構築

潜在的にAng-2：Tie-2結合に対して阻害性であるとして選択された修飾ペプチド（表3参照）を使用して、各々のペプチドの単量体又は各々のペプチドの縦列二量体（単量体ユニットの間にリンカーを有する）のいずれかが、リンカーとそれに続くヒトIgG1のFc領域をコードするDNAにフレーム内で融合している融合タンパク質を構築した。各々の修飾ペプチドは、オリゴヌクレオチドの対（「オリゴ」）をアニーリングし、ペプチドに依存して5個のグリシン残基、8個のグリシン残基又は1個のリシン残基のいずれかから成るリンカーと共に該ペプチドをコードするポリヌクレオチド二重鎖を作製することによって構築した；これらの構築物はNdeIからXhoIまでのフラグメントとして作製した。これらの二重鎖ポリヌクレオチド分子を、あらかじめNdeIとXhoIで消化しておいた、ヒトFc遺伝子を含むベクター（下記でさらに述べる、pAMG21-Fc N末端）に連結した。生じた連結混合物を、標準的な手順を用いて電気穿孔法によって大腸菌株2596細胞（下記でさらに述べる、GM221）に形質転換した。クローンを、組換えタンパク質産物を産生し、正しいヌクレオチド配列を備えた遺伝子融合を有する能力に関してスクリーニングした。修飾ペプチドの各々について1個のそのようなクローンを選択した（すなわちFc-ペプチド融合産物）。

30

【0320】

pAMG21-Fc N末端ベクターの構築

pAMG21

発現プラスミドpAMG21（ATCC No. 98113）は、発現ベクターpCFM1656（ATCC No. 69576）及び米国特許第4,710,473号に述べられている発現ベクター系から、国際特許公開公報第WO00/24782号（その中のp. 100-103にわたる実施例2の部分ならびに図17A及び17B参照）に述べられている手順に従うことによって誘導される。

40

【0321】

Fc N末端ベクター

大腸菌株3788、pAMG21 Tpo_Gly5_Fc単量体を鋳型として使用して、Fc N末端ベクターを生成した。この菌株のクローニングに関する情報はWO00/24782号（その中の実施例2及び図10参照）に見出される。pAMG Tpo_Gly5の中のTpoペプチド配列を除去して、それをApaI及びXhoI部位を含

50

むポリリンカーで置き換えるように5' PCRプライマー（下記でさらに述べる）を設計した。菌株3788を鋳型として使用し、5' プライマーとして下記の配列番号8のオリゴヌクレオチド及び万能3' プライマーとして下記の配列番号9を使用して、Expand Long PolymeraseでPCRを実施した。生じたPCR産物をゲル精製し、制限酵素Nde I及びBsrGIで消化した。対象ペプチドをそのリンカーと共にコードするプラスミド及びポリヌクレオチドの両方を、Qiagen (Chatsworth, CA) ゲル精製スピンカラムを用いてゲル精製した。次に標準連結手法を用いてプラスミドとインサートを連結し、生じた連結混合物を大腸菌細胞（菌株2596）に形質転換した。1個のクローンを選択し、DNA塩基配列決定を実施した。正しいクローンを特定し、これをここで述べる修飾ペプチドのためのベクターソースとして使用した。

10

【0322】

【化4】

5' プライマー:

ACAAACAAACATATGGGTGCACAGAAAGCGGCCGCAAAAAA
CTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACA (SEQ ID NO: 8)

3' プライマー:

GGTCATTACTGGACCGGATC (SEQ ID NO: 9)

20

これらの修飾ペプチドをFcへのN末端融合（N末端ペプチ体）として作製することに加えて、それらの一部をC末端融合産物（C末端ペプチ体）としても作製した。C末端融合を作製するために使用したベクターを下記で説明する。

【0323】

Fc C末端ベクターの構築

大腸菌株3728、pAMG21 Fc_Gly5_Tpo単量体を鋳型として使用して、修飾ペプチドのためのFc C末端ベクターを生成した。この菌株のクローニングに関する情報はWO00/24782号（その中の実施例2及び図7参照）に見出される。Tpoペプチド配列を除去して、それをApal I及びXho I部位を含むポリリンカーで置き換えるように3' PCRプライマー（配列番号10）を設計した。菌株3728を鋳型として使用し、万能5' プライマー（配列番号11）及び上記3' プライマーを使用して、Expand Long PolymeraseでPCRを実施した。生じたPCR産物をゲル精製し、制限酵素BsrGI及びBamHIで消化した。各々の対象ペプチドをそのリンカーと共にコードするプラスミド及びポリヌクレオチドの両方を、Qiagenゲル精製スピンカラムを用いてゲル精製した。次に標準連結手法を用いてプラスミドとインサートを連結し、生じた連結混合物を大腸菌（菌株2596）細胞に形質転換した。1個のクローンを選択し、DNA塩基配列決定を実施した。正しいクローンを特定し、ここで述べる修飾ペプチドのためのベクターのソースとして使用した。

30

【0324】

【化5】

40

5' プライマー:

CGTACAGGTTTACGCAAGAAAATGG (SEQ ID NO: 10)

3' プライマー:

TTTGTTGGATCCATTACTCGAGTTTTTTTTCGGCCGCTTTCTGTG
CACCACCACCTCCACCTTTAC (SEQ ID NO: 11)

50

【0325】

GM221 (#2596)。Fc-ペプチド融合タンパク質を発現するために使用した宿主菌株2596は、luxプロモーター、及び初期ebg領域内に温度感受性リプレッサーcI857s7及び後期ebg領域内にlacI^Qリプレッサーを含むように改変された大腸菌K-12菌株である。これら2個のリプレッサー遺伝子の存在は、この宿主を様々な発現系と共に使用することを可能にする。この菌株のATCC名称は202174である。

【実施例5】

【0326】

ペプチ体の生産

大腸菌における発現。大腸菌GM221中のpAMG21-Fc融合構築物の各々の培養物をTerrific Broth培地（上記のSambrookらの参考文献で引用されている、TartofとHobbs, 「Improved media for growing plasmid and cosmid clones」, Bethesda Research Labs Focus, 第9巻, p. 12, 1987参照）において37℃で増殖させた。合成自己誘導物質、N-(3-オキソヘキサノイル)-DL-ホモセリンラクトン（20 ng/mlの最終濃度まで培地に添加して、luxPRプロモーターからの遺伝子産物発現の誘導を実施した。培養物をさらに6時間37℃でインキュベートした。次に細菌培養物を封入体の存在に関して顕微鏡で検査し、遠心分離によって収集した。屈曲（refractile）封入体が誘導した培養物中に認められ、おそらくFc-融合物が大腸菌内の不溶性分画において産生されたと考えられることを示唆した。細胞ペレットを、10%β-メルカプトエタノールを含むLaemmli試料緩衝液に直接再懸濁することによって溶解し、それからSDS-PAGEで分析した。ほとんどの場合に、適切な分子量の強いクマシー染色バンドがSDS-PAGEゲル上に認められた。

【0327】

精製。高圧均質化（14,000 PSIで2回の通過）を用いて細胞を水中（1/10）で破壊し、遠心分離（J-6B遠心分離機で4000 RPM、1時間）によって封入体を収集した。封入体を6Mグアニジン、50mM Tris、10mM DTT、pH 8.5に1/10の比率で1時間可溶化した。Fcに融合した線状ペプチドについては、可溶化混合物を2M尿素、50mM Tris、160mMアルギニン、2mMシステイン、pH 8.5に25倍希釈した。4℃で2日間酸化を進行させ、ジスルフィド結合化合物（すなわちFc-ペプチドホモ二量体）を形成させた。Fcに融合した環状ペプチドについては、この同じプロトコルを、次の3つの折りたたみ条件を加えて実施した：（1）2M尿素、50mM Tris、160mMアルギニン、4mMシステイン、1mMシスタミン、pH 8.5；（2）4M尿素、20%グリセロール、50mM Tris、160mMアルギニン、2mMシステイン、pH 8.5；及び（3）4M尿素、20%グリセロール、50mM Tris、160mMアルギニン、4mMシステイン、1mMシスタミン、pH 8.5。再生されたタンパク質を1.5M尿素、50mM NaCl、50mM Tris、pH 9.0に対して透析した。この混合物のpHを酢酸でpH 5に低下させた。沈殿物を遠心分離によって除去し、上清を、各融合産物の等電点に依存して5-6.5のpHに調整した。タンパク質をろ過し、各々の構築物について決定されたpHで、20mM NaAc、50mM NaCl中で平衡させたSP-Sepharose HPカラムに4℃で充填した。50mM NaClから500mM NaClまでの範囲の同じ緩衝液中20カラム容量の直線勾配を使用してタンパク質を溶出した。そのピークをプールし、ろ過した。

【0328】

上記の手順を用いて生成されたペプチ体を下記の表4に示す。

【0329】

【表 10】

表 4

ペプチ体	ペプチ体配列
L1 (N)	MGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:12)
L1 (N) WT	MKFNPLDELEETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:13)
L1 (N) 1K WT	MKFNPLDELEETLYEQFTFQQGSGSATGGSGSTASSGS GSATHLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:14)
2xL1 (N)	MGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQGGGGGGGGKFNPL DELEETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:15)
2xL1 (N) WT	MKFNPLDELEETLYEQFTFQQGGGGGGGGKFNPLDELEE TLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:16)
Con4 (N)	MGAQQEECEWDPWTCEHMLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:17)
Con4 (N) 1K-WT	MQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATH LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:18)
2xCon4 (N) 1K	MGAQQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGS ATHQEECEWDPWTCEHMLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:19)
L1 (C)	M-Fc-GGGGGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQLE (SEQ ID NO:20)

10

20

30

L1 (C) 1K	M-Fc- GGGGGAQGSATGGSGSTASSGSGSATHKFNPLDELE ETLYEQFTFQQLE (SEQ ID NO:21)
2xL1 (C)	M-Fc- GGGGGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQGGGGGGGGKFN NPLDELEETLYEQFTFQQLE (SEQ ID NO:22)
Con4 (C)	M-Fc-GGGGGAQQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:23)
Con4 (C) 1K	M-Fc- GGGGGAQGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWDP WTCEHMLE (SEQ ID NO:24)
2xCon4 (C) 1K	M-Fc- GGGGGAQQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASS GSGSATHQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:25)
Con4-L1 (N)	MGAQEECEWDPWTCEHMGSGGGGGGGKFNPLDELEET LYEQFTFQQGSGSATGGSGSTASSGSGSATHLEGGGGG- Fc (SEQ ID NO:26)
Con4-L1 (C)	M-Fc- GGGGGAQGSATGGSGSTASSGSGSATHKFNPLDELE ETLYEQFTFQQGGGGGQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:27)
TN-12-9 (N)	MGAQ-FDYCEGVDPFTFGCDNHLE-GGGGG-Fc (SEQ ID NO:28)
C17 (N)	MGAQ-QYGCDGFLYGCMINLE-GGGGG-Fc (SEQ ID NO:29)
TN8-8 (N)	MGAQ-KRPCEEMWGGCNYDLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:30)
TN8-14 (N)	MGAQ-HQICKWDPWTCKHWLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:31)
Con1 (N)	MGAQ-KRPCEEIFGGCTYQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:32)

10

20

30

40

表4において、「Fc」はヒトFc IgG1配列を表わす。2番目の欄はペプチ体のアミノ酸配列を示す。そのFc部分は「Fc」と分類表示されており、下記の配列番号60に示されている通りである。分類表示、例えば、「Con4」又は「Con-4」を使用する場合、これはCon-4ペプチドを表わし、その上の接尾辞「C」、「(C)」又は「-C」；若しくは「N」、「(N)」又は「-N」の使用は、その分子がここで述べるペプチ体であることを示す。ペプチ体名の中の接尾辞「N」、「(N)」又は「-N」は、そのAng-2結合ペプチド（単数又は複数）がFcドメインのN末端側であることを示し、及び接尾辞「C」、「(C)」又は「-C」は、そのAng-2結合ペプチド（単数又は複数）がFcドメインのC末端側であることを示す。さらに、配列番号25で定義されるような2×Con4(C)1Kは、ここでは「1K」の接尾辞を伴わずに称されることもある。

【0330】

各々のペプチ体のFc部分のアミノ酸配列は次の通りである（アミノ末端からカルボキシ末端へ）：

【0331】

【化 6】

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
 LSPGK (SEQ ID NO: 60)

10

【0 3 3 2】

それぞれ表 4 の中のペプチ体配列番号 1 2 - 3 2 に対応するペプチ体をコードする D N A 配列 (配列番号 3 3 - 5 3) を下記に示す:

【0 3 3 3】

【化 7】

SEQ ID NO: 33

ATGGGTGCACAGAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAACTCT
 GTACGAACAGTTCACTTTCCAGCAGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGG
 ACAAACACTCACACATGTCCACCTTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGG
 GACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT
 CTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA
 AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC
 ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC
 CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
 AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATC
 GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT
 GTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAG
 CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGA
 GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTC
 CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGT
 GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT
 GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC
 TCCGGGTAAATAATGGATCC

20

30

【0 3 3 4】

【化 8】

SEQ ID NO:34

ATGAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAACTCTGTACGAACA
GTTCACTTTCCAGCAGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCA
CACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGT
TTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC
CCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA
GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA
AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA
TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG
CCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC
CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
AATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTCTGGA
CTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG
CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC
TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA
ATAA

10

【 0 3 3 5】

【化 9】

SEQ ID NO:35

ATGAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAACTCTGTACGAACA
GTTCACTTTCCAGCAGGGATCCGGTTCTGCTACTGGTGGTTCGGGCTCC
ACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGTGCGACTCATCTCGAGGGTGGAGGC
GGTGGGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTC
CTGGGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACC
CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG
AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT
GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA
GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC
TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA
GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA
ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAA
CCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT
CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGA
CCACGCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAA
GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT
GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC
TCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

30

【 0 3 3 6】

40

【化 1 0】

SEQ ID NO:36

ATGGGTGCACAGAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAACTCT
GTACGAACAGTTCACCTTTCCAGCAGGGTGGTGGTGGTGGTGGCGGTGG
TAAGTTCAACCCACTGGATGAGCTGGAAGAGACTCTGTATGAACAGTT
CACTTTCCAGCAACTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCACA
CATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTT
TCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC
CTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG
GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA
GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCAT
CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC
CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCC
TGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC
TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC
AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
TAA

10

20

【 0 3 3 7】

【化 1 1】

SEQ ID NO:37

ATGAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAACTCTGTACGAACA
GTTCACTTTCCAGCAGGGTGGTGGTGGTGGCGGTGGTAAGTTCAACCC
ACTGGATGAGCTGGAAGAGACTCTGTATGAACAGTTCACCTTTCCAGCA
ACTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTT
GCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCC
AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATG
CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG
GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG
AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC
TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA
AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG
ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT
TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
GAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC
TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

30

40

【 0 3 3 8】

【化 1 2】

SEQ ID NO:38

ATGGGTGCACAGCAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCGA
ACACATGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCACACATGTC
CACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCTCTT
CCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT
CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT
CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
CAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

10

【 0 3 3 9】

【化 1 3】

SEQ ID NO:39

ATGCAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACACATGGG
ATCCGGTTCTGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCA
GGCAGTGCGACTCATCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCA
CACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGT
TTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC
CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA
GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA
AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA
TCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG
CCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC
CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
AATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA
CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG
CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC
TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA
ATAA

20

30

【 0 3 4 0】

【化 1 4】

SEQ ID NO:40

ATGGGTGCACAGCAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCGA
ACACATGGGATCCGTTCTGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAG
CTCTGGTTCAGGCAGTGCGACTCATCAGGAAGAATGCGAATGGGACCC
ATGGACTTGCGAACACATGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAA
CTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGT
CAGTTTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG
GACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC
CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG
CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG
GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG
TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAA
ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCCTGAC
CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGC
TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACA
AGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG
AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
GTAAATAA

10

20

【 0 3 4 1】

【化 1 5】

SEQ ID NO:41

ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
GGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCT
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGAAATTCAACCC
GCTGGACGAGCTGGAAGAGACTCTGTACGAACAGTTTACTTTTCAACA
GCTCGAGTAA

30

40

【 0 3 4 2】

【化 1 6】

SEQ ID NO:42

ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
GGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCT
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGGGATCCGGTTC
TGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGTGC
GACTCATAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAACTCTGTACGA
ACAGTTCACCTTCCAGCAACTCGAGTAA

10

20

【 0 3 4 3】

【化 1 7】

SEQ ID NO:43

ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
GGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCT
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGAAATTCAACCC
GCTGGACGAACTGGAAGAACTCTGTACGAACAGTTCACCTTCCAGCA
GGGTGGTGGTGGTGGTGGCGGTGGTAAGTTCAACCCACTGGATGAGCT
GGAAGAGACTCTGTATGAACAGTTCACTTTCAGCAACTCGAGTAA

30

40

【 0 3 4 4】

【化 1 8】

SEQ ID NO:44

ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
GGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCT
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGCAGGAAGAAT
GCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACACATGCTCGAGTAA

10

【 0 3 4 5】

【化 1 9】

20

SEQ ID NO:45

ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
GGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCT
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGGGATCCGGTTC
TGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGTGC
GACTCATCAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACACA
TGCTCGAGTAA

30

【 0 3 4 6】

40

【化 2 0】

SEQ ID NO:46

ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
GGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCT
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGCAGGAAGAAT
GCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACACATGGGATCCGGTTCTGCTA
CTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGCGCGACTC
ATCAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACACATGCTC
GAGTAA

10

20

【 0 3 4 7】

【化 2 1】

SEQ ID NO:47

ATGGGTGCACAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACA
CATGGGTGGTGGTGGTGGTGGCGGTGGTAAATTCAACCCGCTGGACGA
ACTGGAAGAACTCTGTACGAACAGTTCACTTTCCAGCAGGGATCCGG
TTCTGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGT
GCGACTCATCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGACAAAACCTCACACATGT
CCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCTCT
TCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG
TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT
TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT
CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
CAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

30

40

【 0 3 4 8】

【化 2 2】

SEQ ID NO:48

ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
GGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCT
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGGGATCCGGTTC
TGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGTGC
GACTCATAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAAACTCTGTACGA
ACAGTTCACTTTCCAGCAGGGTGGTGGCGGTGGTCAGGAAGAATGCGA
ATGGGACCCATGGACTTGCGAACACATGCTCGAGTAA

10

20

【 0 3 4 9】

【化 2 3】

SEQ ID NO:49

ATGGGTGCACAGTTCGACTACTGCGAAGGTGTTGAAGACCCGTTCACT
TTCGGTTGCGACAACCACCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAAC
TCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTC
AGTTTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG
ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT
GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT
CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA
CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAAC
CATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC
TGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCT
GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG
GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG
AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG
GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT
AAATAA

30

40

【 0 3 5 0】

【化 2 4】

SEQ ID NO:50

ATGGGTGCACAGCAGTACGGTTGCGACGGTTTTCTGTACGGTTGCATG
ATCAACCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCACACATGTCC
ACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTC
CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC
AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC
GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA
CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA
GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC
CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
AGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

10

【 0 3 5 1】

【化 2 5】

20

SEQ ID NO:51

ATGGGTGCACAGAAACGCCCATGCGAAGAAATGTGGGGTGGTTGCAA
CTACGACCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCACACATGTC
CACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCTCTT
CCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT
CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT
CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

30

【 0 3 5 2】

【化 2 6】

SEQ ID NO:52

ATGGGTGCACAGCACCAGATCTGCAAATGGGACCCGTGGACCTGCAA
ACACTGGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACACACATGTC
CACCTTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCTCTT
CCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT
CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT
CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
CAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

10

【 0 3 5 3】

【化 2 7】

20

SEQ ID NO:53

ATGGGTGCACAGAAACGTCCATGCGAAGAAATCTTCGGTGGTTGCACC
TACCAGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACACACATGTCC
ACCTTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTC
CCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC
AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC
GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA
CCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA
GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC
CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
AGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

30

【実施例 6】

【 0 3 5 4】

ペプチ体アッセイ

40

中和 E L I S A を使用して 1 4 個のペプチ体を試験し、アフィニティー E L I S A を使用して 3 個のペプチ体を試験した。その結果を表 5 に示す。

【 0 3 5 5】

【表 1 1】

ペプチド	hAng-2		mAng-2		hAng-1	
	IC50(nM)	EC50(nM)	IC50(nM)	EC50(nM)	IC50(nM)	EC50(nM)
2xCon4(C)1K	0.04		0.02			
Con4-L1(C)	0.05		0.04			
Con4(C)	0.20		0.30			
2xL1(N)	0.65		0.80			
Con4(N)	0.85	0.03	0.72	0.07	阻害なし	結合なし
2xL1(C)	0.90		1.0			
Con4(N)1K-WT			1.9			
L1(N)	6		11		阻害なし	
C17(N)	9		13		阻害なし	
12-19(N)	21		7.7		阻害なし	
Con1(N)	26		~200		阻害なし	
8-14(N)	45		33		阻害なし	
L1(C)	65		37			
8-8(N)	80		~700		阻害なし	
陰性対照ペプチド 4883	阻害なし	結合なし	阻害なし	結合なし	阻害なし	結合なし

【0 3 5 6】

陰性対照ペプチド 4883 のアミノ酸配列は次の通りである（Fc 部分には下線を付しており、リンカーは「GGGGG」であり、ペプチド部分は太字で示している）：

【0 3 5 7】

【化 2 8】

MDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK-GGGGG-CTAGYHWNSDCECCRRN (SEQ ID NO: 243)

ここでの「阻害なし」の語の使用は、化合物が阻害特性を持たないことを表わすわけではないことは認識される。むしろ、ここで使用する「阻害なし」は、ここで述べる条件下で中和 ELISA 検定法を用いて試験したとき、これらの化合物をスクリーニングする最高濃度であった 1000 nM よりも高い IC₅₀ 値を示した化合物を意味する。「阻害なし」を示すと分類表示された分子に関しては、有意の阻害特性は認められなかったが、それらの分子が、実際に、異なるアッセイ条件下又は異なるアッセイにおいては阻害特性を示しうることが認識される。好ましい実施形態では、本発明が、ここで述べるアッセイを用いて阻害特性を有するペプチドに関することは認識される。

【0 3 5 8】

2 個のペプチドはアフィニティー BIA コアアッセイ（実施例 2 で述べたような）を用いて試験した。その結果を下記の表 6 に示す。

【0 3 5 9】

【表 1 2】

表 6

hAng-2 及び mAng-2 に対するペプチ体 (Pb) の親和性

ペプチ体	hAng-2			K _D (nM)	mAng-2	
	K _D (nM)	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)		k _a (1/Ms)	k _d (1/s)
Pb L1 (N)	3.1	2.9 x 10 ⁵	9.1 x 10 ⁻⁴	0.42	5.6 x 10 ⁵	2.3 x 10 ⁻⁴
Con4 (N)	0.67	3.3 x 10 ⁵	2.2 x 10 ⁻⁴	0.60	7.3 x 10 ⁵	4.4 x 10 ⁻⁴
TN12-9 (N)	8.2	1.2 x 10 ⁵	1.0 x 10 ⁻³	0.32	7.2 x 10 ⁵	2.3 x 10 ⁻⁴

【実施例 7】

【0360】

全身投与した Ang-2 ペプチ体に関する治療効果試験

腫瘍攻撃誘発後 72 時間目から 1 日 1 回スケジュールで、A431 腫瘍を有するマウスに Ang-2 ペプチ体、TN8-Con4-C を皮下投与した。使用したペプチ体の容量は 1000、200、40 及び 8 µg / マウス / 日であった。合計 20 回の投与をすべての動物に実施した。腫瘍容積と体重を週に 3 回記録した。試験終了時に、動物を犠牲剖検し、ELISA によってペプチ体レベルを測定するために血清を採集した。腫瘍及び正常組織のパネルをすべての群から収集した。

【0361】

その結果を図 1 に示す。図からわかるように、Ang-2 ペプチ体処置群とビヒクル対照の間で腫瘍増殖に有意差が認められた。Ang-2 ペプチ体の 4 つの用量すべてがビヒクル対照と比較して腫瘍増殖を阻止した（反復測定 ANOVA を使用して、 $p < 0.0001$ vs ビヒクル対照）。これに対し、対照群における腫瘍ははるかに速い速度で増殖し続けた。このペプチ体による処置は、上記用量で処置した動物の最終体重、器官重量又は血液学的パラメータに有意の作用を及ぼさなかった。

【実施例 8】

【0362】

1. Ang-2 二次ペプチドライブラリーの構築

A. エレクトロコンピテント大腸菌細胞

Epicurian Coli (登録商標) XL1-Blue MRF' 電気穿孔コンピテント細胞 (Stratagene #200158) を Stratagene (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA) より購入した。

【0363】

B. pCES1 ベクターの改変

pCES1 ベクター (Target Quest Inc.) 1 µg を鋳型として、Extend Long Template PCR Systems (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN) を用いて PCR を実施した。PCR 混合物容量は、1 × PCR 緩衝液、2 個のプライマー：5'-CAAA CGAATGGATCCTCATTAAGCCAGA-3' (配列番号 244) 及び 5'-GGTGGTGGCGGCGCACTCGAGACTGTTGAAAGTTGTTT AGCA-3' (配列番号 245) の各々 200 nM、dNTP 200 nM 及び Taq DNA ポリメラーゼ 3 単位 (U) を含む 100 µl であった。TRIO-Thermo

block (Biometra) PCRシステムを次のように実施した：94℃を5分間；94℃を30秒間、50℃を30秒間、72℃を45秒間の30サイクル；及び72℃を10分間；4℃に冷却。

【0364】

次にPCR産物を1%アガロースゲル上で泳動させ、製造者のプロトコールに従ってQIAGEN Spin Column (QIAGEN Inc., Valencia, CA) で精製した。2回目のPCR反応を、上述したのと同じPCR条件下で、PCR産物5μl及び2個のプライマー：5'-CAAACGAATGGATCCTCATTAAGCCAGA-3' (配列番号246) 及び5'-AACACAAAGTGACAGGGTGGAGGTGGTGGTGGCGGCGCACT-3' (配列番号247) の各々200nMを用いて実施した。

10

【0365】

次に、PCR産物とものpCES1ベクターを、1×NEB2緩衝液、ApaLI (New England Biolabs, Beverly, MA) 60U、BamHI (New England Biolabs) 60Uを含む100μlの反応物中、37℃で1時間、別々に消化した。消化したDNAを、その後、QIAGEN Spin Columnを用いて精製し、1×連結緩衝液及びT4 DNAリガーゼ (New England Biolabs) 40Uを含む40μlの反応物中、室温で一晩連結した。

【0366】

上記ベクターを大腸菌にトランスフェクトし、37℃で一晩インキュベートした。単離した1個のコロニーを選択し、QIAGEN Spin Columnを用いてプラスミドを精製した。DNA塩基配列決定によって正しいインサートを確認した。

20

【0367】

C. ベクターDNAの作製

改変pCES1ベクターDNA (上記1B項より) 1μgを、2500V、25μF及び200オームに設定したGene Pulser II (BIO-RAD, Hercules, CA) を用いてエレクトロコンピテントXL1-Blue大腸菌 (上記1A項より) 40μlに形質転換した。形質転換した細菌試料を、直ちにSOC (2%トリプトン、0.5%酵母抽出物、10mM NaCl、2.5mM KCl、20mMグルコース、10mM MgSO₄、10mM MgCl₂) 960μlを含む試験管に移し、培養物を振とうしながら37℃で1時間増殖させた。

30

【0368】

次に細胞を2×YTAGT (2×YTと100μg/mlアンピシリン、12.5μg/mlテトラサイクリン及び2%グルコース) 寒天平板上に塗布し、37℃で一晩インキュベートした。1個のコロニーを塩基配列決定によって確認し、それを使用して、振とうしながら37℃で一晩、2×YTAGT培地2lに接種した。プラスミドベクターDNAを、製造者のプロトコールに従ってQIAGEN Plasmid Maxi Kitで精製した。

【0369】

D. ベクターDNAの消化

合計約2000μgのベクターDNA (上記1C項より) を、1×NEB2緩衝液、ApaLI 300U及びXhoI 300Uを含む5000μl反応物中、37℃で一晩消化した。制限消化反応物を37℃で一晩インキュベートし、あらかじめ作製された0.8%アガロースゲル (Embi Tec, San Diego, CA) において分析した。次に線状化したベクターDNAをゲルから切り出し、製造者の指示に従ってQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc.) で抽出した。

40

【0370】

E. ライブラリーオリゴヌクレオチドの作製

6個のライブラリーオリゴヌクレオチド (固定1個、ドープ5個) を、上述した結果か

50

ら誘導される配列に基づいて設計した。1個の固定ライブラリーオリゴヌクレオチドは：

5' - C A C A G T G C A C A G G G T N N K N N K N N K N N K N N K N N K N N K
S A R T G G G A T C C G T G G A S C N N K N N K N N K N N K N N K N N K N N K
C A T T C T C T C G A G A T C A - 3' (ライブラリー番号20) (配列番号248)

であり、2個の70%ドープしたライブラリーオリゴヌクレオチドは次の通りであった：

5' - C A C A G T G C A C A G G G T N N K N N K N N K a a K c g K c c K N N K
g a K g a K a t K t t K g g K g g K N N K a c K t a K c a K N N K N N K N N K C
A T T C T C T C G A G A T C A - 3' (ライブラリー番号27) (配列番号249)

5' - C A C A G T G C A C A G G G T N N K a a K t t K a a K c c K c t K g a K
g a K c t K g a K g a K a c K c t K t a K g a K c a K t t K a c K t t K c a K c
a K N N K C A T T C T C T C G A G A T C A - 3' (ライブラリー番号99) (配列番
号250)

10

小文字は、示されている塩基70%と他の3つのヌクレオチド各々10%の混合物を表わす。他の3つの91%ドープしたライブラリーオリゴヌクレオチドは次の通りであった：

5' - C A C A G T G C A C A G G G T N N K N N K N N K c a K g a K g a K T G C
g a K t g K g a K c c K t g K a c K T G C g a K c a K a t K N N K N N K N N K C
A T T C T C T C G A G A T C A - 3' (ライブラリー番号94) (配列番号251)

5' - C A C A G T G C A C A G G G T N N K t t K g a K t a K N N K g a K g g K
g t K g a K g a K c c K t t K a c K t t K g g K N N K g a K a a K c a K N N K C
A T T C T C T C G A G A T C A - 3' (ライブラリー番号25) (配列番号252)

20

5' - C A C A G T G C A C A G G G T N N K a a K t t K a a K c c K c t K g a K
g a K c t K g a K g a K a c K c t K t a K g a K c a K t t K a c K t t K c a K c
a K N N K C A T T C T C T C G A G A T C A - 3' (ライブラリー番号26) (配列番
号253)

上記のオリゴに関して、当業者は、「N」は、4個のヌクレオチド(A、T、C及びG)の各々がオリゴ合成において等しく提示されることを表わし、及び「K」は、ヌクレオチドG及びTがオリゴ合成において等しく提示されることを表わすことを認識する。小文字は、指示されている塩基91%と他の3つのヌクレオチド各々3%の混合物を表わす。これらのオリゴヌクレオチドの各々をPCRにおける鋳型として使用した。

30

【0371】

Expand High Fidelity PCR Systemキット(Roch
e D i a g n o s t i c s C o r p .) をPCR反応のために使用した。各々のライ
ブラリーオリゴを、ライブラリーオリゴヌクレオチド1nM、1×PCR緩衝液、プライ
マー：

5' - C A C A G T G C A C A G G G T - 3' (配列番号254)

5' - T G A T C T C G A G A G A A T G - 3' (配列番号255)

各々300nM、dNTP 200μM、1.5mM MgCl₂及びExpandポリ
メラーゼ350Uを含む96穴の50μl PCR反応物中で増幅した。サーモサイクラ
ー(GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosys
t e m s) を使用して下記のプログラムを実施した：94℃を5分間；(94℃を30秒
間、52.5℃を60秒間、72℃を30秒間)×25サイクル；72℃を10分間；4
℃に冷却。QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN
I n c . カタログ番号28104)を製造者のプロトコールに従って使用して遊離ヌ
クレオチドを除去した。

40

【0372】

F. ライブラリーオリゴヌクレオチドの消化

各々のライブラリーについて、PCR産物(1E項)を、1×NEB2緩衝液、Apa
L I 750U及びXhoI 750Uを含む1200μl反応物中、37℃で一晩消化
した。消化したDNAをあらかじめ作製した3%アガロースゲル(Embi Tec)上

50

で分離した。各反応物からの対象とするDNAバンドをゲルから切り出し、COSTAR Spin-X遠心分離管フィルター、0.22 μ m酢酸セルロース (Corning Inc., カタログ番号8160) で抽出した。

【0373】

G. ライブラリーオリゴヌクレオチドとベクターの連結

450 μ lの連結反応物は、1:5のモル比の線状化ベクター (1D項) と各々の消化ライブラリーPCR産物 (1F項)、1 $\times$ NEB連結緩衝液、及びT4 DNAリガーゼ20,000 Uを16 $^{\circ}$ Cで一晩含んだ。連結した産物を65 $^{\circ}$ Cで20分間インキュベートしてT4 DNAリガーゼを不活性化し、NotI 100 Uと共に37 $^{\circ}$ Cで2時間さらにインキュベートしてベクターの自己連結を最小化した。次に、連結産物を標準フェノール/クロロホルム抽出 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Maniatisら、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000) によって精製し、H₂O 120 μ lに再懸濁した。

【0374】

H. 電気穿孔形質転換

各々のライブラリーについて、12の電気穿孔反応を実施した。各々の形質転換のための、連結したベクターDNA (1G項) 10 μ lとXL1-BLUE MRF'細胞 (1A項) 300 μ lを0.2 cmキューベット (BIO-RAD) 中で混合した。生じた混合物を、2500 V、25 μ F及び200 オームに設定したGene Pulser IIによってパルスした。12の電気穿孔反応からの形質転換細菌を合わせて、SOC 26 mlを含むフラスコに移し、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。細胞を2 $\times$ YT AG 450 mlに加え、振とうしながら37 $^{\circ}$ Cで5時間増殖させた。細胞を4000 rpm、4 $^{\circ}$ Cで15分間遠心分離した。その後、細胞ペレットを15%グリセロール/2 $\times$ YT 12 mlに再懸濁し、-80 $^{\circ}$ Cで保存した。これがライブラリーの一次原液であった。力価は、5.0 $\times$ 10⁹ (ライブラリー番号20)、3.3 $\times$ 10¹⁰ (ライブラリー番号94)、4.7 $\times$ 10⁹ (ライブラリー番号25)、5.0 $\times$ 10⁹ (ライブラリー番号26)、3.0 $\times$ 10⁹ (ライブラリー番号27)、及び4.2 $\times$ 10⁹ (ライブラリー番号99)の独立した形質転換体のライブラリーサイズを示した。

【0375】

2. ライブラリーの増幅

A. ライブラリーの二次原液の作製

一次ライブラリー細胞原液 (上記1H項より) から、各々のライブラリーサイズの10倍過剰をカバーするのに十分な細胞を使用して、出発OD₆₀₀が0.1であるように2 $\times$ YT AGT (2 $\times$ YTと100 μ g/mlアンピシリン、12.5 μ g/mlテトラサイクリン及び2%グルコース) 培地に接種した。培養物を、OD₆₀₀=0.5になるまで振とうしながら37 $^{\circ}$ Cで数時間増殖させた。各ライブラリーから1/10アリコートを取り、別々のフラスコ内でさらに2時間、37 $^{\circ}$ Cで増殖させた。次にこれらのサブ培養物を、Beckman JA-14回転装置を用いて4 $^{\circ}$ Cで10分間、4000 rpmで遠心分離し、細菌ペレットを15%グリセロール/2 $\times$ YT 7.0 ml (各ライブラリーについて) に再懸濁し、-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

【0376】

B. ファージの誘導

M13KO7ヘルパーファージアリコート (Amersham Pharmacia Biotech) をOD₆₀₀=0.5の残りの細菌培養物 (上記2A項より) に加えて、3 $\times$ 10⁹ pfu/mlの最終濃度にした。ヘルパーファージを、37 $^{\circ}$ Cで振とうせずに30分間及び緩やかに振とうしながら30分間細菌に感染させた。感染細胞を4 $^{\circ}$ Cで15分間、5000 rpmで遠心分離した。細胞ペレットを、同じ容量 (上記2A項より) の2 $\times$ YT AK培地 (2 $\times$ YTと100 μ g/mlアンピシリン及び40 μ g/mlカナマイシン) に再懸濁した。振とうしながら30 $^{\circ}$ Cで一晩、ファージミドを生成させた。

【0377】

C. ファージの採集

上記2B項からの細菌培養物を4℃で15分間、5000rpmで遠心分離した。上清を新しいビンに移し、0.2容量の20%PEG/2.5M NaClを加えて、氷上で1時間インキュベートしてファージミドを沈殿させた。沈殿したファージミドを4℃で30分間、10,000rpmで遠心分離し、低温PBS 100mlに慎重に再懸濁した。ファージミド溶液を、4℃で10分間、4000rpmで遠心分離して残りの細胞を除去し、0.2容量の20%PEG/2.5M NaClを加えてファージミドを沈殿させることによってさらに精製した。そのファージミドを4℃で30分間、10,000rpmで遠心分離し、ファージミドペレットを低温PBS 18mlに再懸濁した。60%グリセロール溶液6mlをファージミド溶液に加えて-80℃で保存した。ファージミドの力価を標準手順(Molecular Cloning, Maniatisら、第3版)によって測定した。

10

【0378】

3. Ang-2 結合ファージの選択

A. 磁気ビーズへのAng-2の固定

ビオチニル化Ang-2タンパク質(上記3A項より)を、製造者からのビーズ原液100μlにつきAng-2タンパク質約2000ngの濃度でDynabead M-280 Streptavidin(DYNAL, Lake Success, NY)上に固定した。磁石を使用してビーズを試験管の一方の側に引き寄せ、液体をピペットで取り除いた後、ビーズをリン酸緩衝食塩水(PBS)で2回洗い、PBSに再懸濁した。ビオチニル化Ang-2タンパク質を上記濃度の洗ったビーズに加え、回転させながら室温で1時間インキュベートした。次に、2%の最終濃度までBSAを加えてAng-2被覆ビーズを遮断し、回転させながら4℃で一晩インキュベートした。生じたAng-2被覆ビーズをPBST(PBSと0.05%Tween-20)で2回洗った後、選択手順に供した。

20

【0379】

B. Ang-2 被覆ビーズを用いた選択

約1000倍ライブラリー当量ファージミド(上記2C項より)を、2%BSAを含むPBS 1mlで1時間遮断した。遮断したファージミド試料を、ブランクビーズ(3A項と同じビーズであるがAng-2タンパク質で被覆していない)に加えることによって3つの陰性選択段階に供し、この混合物を回転させながら室温で15分間インキュベートした。磁石を使用してファージミドを含む上清を抜き取り、ブランクビーズ(上記3A項で述べたと同じビーズであるがAng-2タンパク質で被覆していない)を含む第二の試験管に移して、この混合物を回転させながら室温で15分間インキュベートした。

30

【0380】

この手順を反復した。磁石を使用してファージミドを含む上清を抜き取り、Ang-2タンパク質被覆ビーズ(上記3A項より)を含む新しい試験管に移して、その混合物を回転させながら室温で1時間インキュベートした。上清を廃棄した後、ファージミド結合ビーズを、2%乳-PBSで10回; 2%BSA-PBSで10回; PBSTで10回及びPBSで2回洗った。次にファージミドを、回転装置上で10分間、100mMトリエチルアミン溶液(Sigma, St. Louis, MO)1ml中に溶出させた。1M Tris-HCl(pH7.5)0.5mlを加えてファージミド含有溶液のpHを中和した。生じたファージミドを使用して、新鮮増殖XL1-Blue MRF'細菌(約0.5のOD₆₀₀)10mlに、37℃で振とうせずに30分間及び緩やかに振とうしながら30分間感染させた。その後、すべての感染XL1-Blue MRF'細胞を15×15cmの2×YTAG平板に塗布し、30℃で一晩インキュベートした。

40

【0381】

C. ファージの誘導と採集

2×YTAGT培地の10mlアリコートを平板(3B項より)に加えてXL1-BL

50

U E M R F ' 細胞を再懸濁した。すべての X L 1 - B L U E M R F ' 細胞を試験管に収集し、これらの細胞の $250 \mu\text{l}$ アリコートをして $2 \times \text{Y T A G T } 25 \text{ ml}$ に加えて、 $\text{O D}_{600} = 0.5$ になるまで 37°C で増殖させた。M 1 3 K O 7 ヘルパーファージを加えて $3 \times 10^9 \text{ c f u / ml}$ の最終濃度にして、 37°C で振とうせず、30 分間及び緩やかに振とうしながら 30 分間インキュベートした。細胞を 4°C で 10 分間、 5000 rpm で遠心分離し、 $2 \times \text{Y T A K } 25 \text{ ml}$ に再懸濁した。振とうしながら 30°C で一晚細菌を増殖させた。誘導したファージミドを採集し、2 C 項におけるように精製した。

【0382】

D. 2 回目の選択

2 回目の選択は、次の点を除いて 3 B - 3 C 項で概説したように実施した。3 C 項から生じた約 100 倍ライブラリー当量ファージミドを投入ファージミドとして使用した。D y n a b e a d M - 2 8 0 S t r e p t a v i d i n へのビオチニル化 A n g - 2 タンパク質 (3 A 項) 被覆の量を 20 ng に低下した。次に、ファージミド結合ビーズを 2 % 乳 - P B S で 10 回 ; 2 % B S A - P B S で 10 回 ; P B S T で 10 回洗い、最終洗浄は P B S T 中室温で 60 分間のインキュベーションを含んだ。そのビーズを P B S で 2 回洗った。溶出条件は 1 回目 (3 B 項) と同じであった。

【0383】

E. 3 回目の選択

3 回目の選択は、次の点を除いて 3 B - 3 C 項で概説したように実施した。3 D 項から生じた約 10 倍ライブラリー当量のファージミドを投入ファージミドとして使用した。約 2 ng のビオチニル化 A n g - 2 タンパク質 (3 A 項) を使用して D y n a b e a d M - 2 8 0 S t r e p t a v i d i n を被覆した。ファージミド結合ビーズを 2 % 乳 - P B S で 10 回 ; 2 % B S A - P B S で 10 回 ; P B S T で 10 回洗い、最終洗浄は P B S T 中室温で 60 分間のインキュベーションを含んだ。そのビーズを P B S で 2 回洗った。溶出条件は 1 回目 (3 B 項) と同じであった。

【0384】

F. 4 回目の選択

4 回目の選択は、次の点を除いて 3 B - 3 C 項で概説したように実施した。3 E 項から生じたライブラリー当量ファージミドを投入ファージミドとして使用した。D y n a b e a d M - 2 8 0 S t r e p t a v i d i n へのビオチニル化 A n g - 2 タンパク質 (3 A 項) 被覆の量を、ライブラリー 25、26 及び 27 については 0.4 ng に低下した。ライブラリー 20 及び 94 については、被覆量は 3 回目の 2 ng のままに維持した。ライブラリー 99 は、4 回目の選択段階では実施しなかった。溶出条件は 1 回目 (3 B 項) と同じであった。

【0385】

4. クローン分析

A. マスター平板の調製

2 回目の選択からの単一コロニーを採取し、各ウエルにつき $120 \mu\text{l}$ の $2 \times \text{Y T A G T}$ を含む 96 穴平板に接種した。96 穴平板を 30°C の振とう機で一晩インキュベートした。 60% グリセロール $40 \mu\text{l}$ を各々のウエルに加えて -80°C で保存した。

【0386】

B. ファージミド E L I S A

マスター平板 (上記 4 A 項) からの細胞の約 $2 \mu\text{l}$ アリコートを、 $2 \times \text{Y T A G T } 100 \mu\text{l}$ / 穴を含む新鮮 C o s t a r (登録商標) 96 穴平板 (C o r n i n g i n c o r p o r a t e d, C o r n i n g, N Y, カタログ番号 9794) に接種し、この新しい平板の細胞を、およそ $\text{O D}_{600} = 0.5$ になるまで 37°C で増殖させた。

【0387】

M 1 3 K O 7 ヘルパーファージ ($1.5 \times 10^{13} \text{ c f u / ml}$) を含む $2 \times \text{Y T A G T } 40 \mu\text{l}$ を各々のウエルに加え、96 穴平板を 37°C で振とうせず、30 分間及び緩やかに振とうしながらさらに 30 分間インキュベートした。平板を 4°C で 10 分間、20

10

20

30

40

50

00rpmで遠心分離した(Beckman CS-6R卓上用遠心分離機)。ウエルから上清を除去し、各々の細胞ペレットを、2×YTAK 150μl/穴を用いて再懸濁した。ファージミド発現のために平板を30℃で一晩インキュベートした。

【0388】

ヒトAng-2タンパク質を、1×PBS中4℃で一晩、1μg/mlで96穴Maxisorp平板(NUNC)上に被覆した。対照として、2%BSA(Sigma)を別のMaxisorp平板に被覆した。その翌日、細胞培養を4℃で10分間、2000rpmで遠心分離した。各々のウエルからの上清10μlを、BSA/PBS溶液を含む新しい96穴平板に移して、上清を1:10に希釈した。生じた混合物を振とうしながら室温で1時間インキュベートしてファージミドを遮断した。一方、Ang-2タンパク質被覆平板は、2%BSA/PBS溶液/穴 400μlで、振とうしながら室温で1時間遮断した。BSA溶液を廃棄し、各ウエルをPBS溶液で3回洗った。最後の洗浄段階後、遮断したファージミド溶液100μlを、Ang-2タンパク質被覆平板ならびに対照平板の各々のウエルに加え、振とうしながら室温で1時間インキュベートした。液体を廃棄し、各ウエルをPBST溶液で3回洗った。15,000希釈のHRP複合抗M13mAb(Amersham Pharmacia Biotech)100μlを、Ang-2タンパク質被覆及び対照平板の各々のウエルに加え、これらの平板を振とうしながら室温で1時間インキュベートした。再び液体を廃棄し、各ウエルをPBST溶液で3回洗った。LumiGLO化学発光基質(Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)100μlをウエルに加え、各々のウエルをLuminoskan Ascent DLRearly機器(Labsystems, Franklin, MA)で読み取った。

【0389】

C. ファージクロンの塩基配列決定

マスター平板(4A項)の各々のウエルからの細菌1μlを鋳型として使用してPCR反応を実施した。各PCR混合物の容量は、1×PCR緩衝液、2個のプライマー:

5'-GTTAGCTCACTCATTTAGGCAC-3'(配列番号256)及び

5'-GTACCGTAACACTGAGTTTTCG-3'(配列番号257)

の各々300nM、dNTP 200μM、2mM MgCl₂及びtaq DNAポリメラーゼ2.5U(Roche Molecular Biochemicals)を含む50μlであった。GeneAmp PCR System 9700(Applied Biosystems)を使用して次のプログラムを実施した:94℃を5分間;(94℃を45秒間、55℃を45秒間、72℃を90秒間)×40サイクル;72℃を10分間;4℃に冷却。PCR産物を、製造者の指示に従ってQIAquick 96 PCR Purification Kit(QIAGEN Inc.)で精製した。すべての精製PCR産物を、製造者の指示に従ってABI3770 Sequencer(Perkin Elmer)を用いて、プライマー 5'-TTACACTTTATGCTTCCG-3'(配列番号258)で塩基配列決定した。

【0390】

5. 配列の順位

スクレオチド配列から翻訳されたペプチド配列(上記4C項)をELISAデータに相関付けた。Ang-2被覆ウエルにおいて高いOD読取り値を示し、BSA被覆ウエルでは低いOD読取り値を示すクローンをより重要とみなした。何度も出現する配列も重要とみなした。ライブラリー20からの24ペプチド配列、ライブラリー94からの26ペプチド配列、ライブラリー25からの7ペプチド配列、ライブラリー26からの18ペプチド配列、ライブラリー27からの6ペプチド配列、及びライブラリー99からの4ペプチド配列を、さらなる分析とペプチド生成のために選択した。さらに、ライブラリー20及び94からの11コンセンサス配列、ライブラリー26及び99からの3コンセンサス配列、及びライブラリー25からの2コンセンサス配列を推論し、ペプチドを生成するために使用した。表7中のペプチド体は、本文中実施例10で述べた中和ELISAプロトコル

ルを用いて評価した。その結果を下記の表 7 に示す。

【 0 3 9 1 】

【表 1 3】

表 7

Con 4 由来の 親和性成熟ペプチ体	hAng-2:Tie2 IC ₅₀ (nM)	ペプチ体配列 (配列番号)
Con4-44 (C)	0.09	M-Fc-GGGGGAQ- PIRQEEDWDPWTCEHMWEV-LE (SEQ ID NO: 259)
Con4-40 (C)	0.10	M-Fc-GGGGGAQ- TNIQEECEWDPWTCDHMPGK-LE (SEQ ID NO: 260)
Con4-4 (C)	0.12	M-Fc-GGGGGAQ- WYEQDACEWDPWTCEHMAEV-LE (SEQ ID NO: 261)
Con4-31 (C)	0.16	M-Fc-GGGGGAQ- NRLQEVCEWDPWTCEHMENV-LE (SEQ ID NO: 262)
Con4-C5 (C)	0.16	M-Fc-GGGGGAQ- AATQEECEWDPWTCEHMPRS-LE (SEQ ID NO: 263)
Con4-42 (C)	0.17	M-Fc-GGGGGAQ- LRHQEGCEWDPWTCEHMFWDW-LE

10

20

		(SEQ ID NO: 264)	
Con4-35 (C)	0.18	M-Fc-GGGGGAQ-VPRQKDCEWDPWTCEHMYVG-LE (SEQ ID NO: 265)	
Con4-43 (C)	0.18	M-Fc-GGGGGAQ-SISHEECEWDPWTCEHMQVG-LE (SEQ ID NO: 266)	
Con4-49 (C)	0.19	M-Fc-GGGGGAQ-WAAQEECEWDPWTCEHMGRM-LE (SEQ ID NO: 267)	10
Con4-27 (C)	0.22	M-Fc-GGGGGAQ-TWPQDKCEWDPWTCEHMGST-LE (SEQ ID NO: 268)	
Con4-48 (C)	0.26	M-Fc-GGGGGAQ-GHSQEECGWDPWTCEHMGTS-LE (SEQ ID NO: 269)	
Con4-46 (C)	0.26	M-Fc-GGGGGAQ-QHWQEECEWDPWTCDHMPSK-LE (SEQ ID NO: 270)	20
Con4-41 (C)	0.26	M-Fc-GGGGGAQ-NVRQEKCEWDPWTCEHMPVR-LE (SEQ ID NO: 271)	
Con4-36 (C)	0.28	M-Fc-GGGGGAQ-KSGQVECNWDPWTCEHMPRN-LE (SEQ ID NO: 272)	
Con4-34 (C)	0.28	M-Fc-GGGGGAQ-VKTQEHCDWDPWTCEHMREW-LE (SEQ ID NO: 273)	
Con4-28 (C)	0.30	M-Fc-GGGGGAQ-AWGQEGCDWDPWTCEHMLPM-LE (SEQ ID NO: 274)	30
Con4-39 (C)	0.30	M-Fc-GGGGGAQ-PVNQEDCEWDPWTCEHMPPM-LE (SEQ ID NO: 275)	
Con4-25 (C)	0.31	M-Fc-GGGGGAQ-RAPQEDCEWDPWTCAHMDIK-LE (SEQ ID NO: 276)	

Con4-50 (C)	0.38	M-Fc-GGGGGAQ-HGQNMECEWDPWTCEHMFYR-LE (SEQ ID NO: 277)
Con4-38 (C)	0.40	M-Fc-GGGGGAQ-PRLQEECVWDPWTCEHMPLR-LE (SEQ ID NO: 278)
Con4-29 (C)	0.41	M-Fc-GGGGGAQ-RTTQEKCEWDPWTCEHMESQ-LE (SEQ ID NO: 279)
Con4-47 (C)	0.44	M-Fc-GGGGGAQ-QTSQEDCVWDPWTCDHMOVSS-LE (SEQ ID NO: 280)
Con4-20 (C)	0.48	M-Fc-GGGGGAQ-QVIGRPCEWDPWTCEHLEGL-LE (SEQ ID NO: 281)
Con4-45 (C)	0.48	M-Fc-GGGGGAQ-WAQEECAWDPWTCDHMOVGL-LE (SEQ ID NO: 282)
Con4-37 (C)	0.49	M-Fc-GGGGGAQ-LPGQEDCEWDPWTCEHMOVRS-LE (SEQ ID NO: 283)
Con4-33 (C)	0.52	M-Fc-GGGGGAQ-PMNQVECDWDPWTCEHMPRS-LE (SEQ ID NO: 284)
AC2-Con4 (C)	0.52	M-Fc-GGGGGAQ-FGWSHGCEWDPWTCEHMGST-LE (SEQ ID NO: 285)
Con4-32 (C)	0.75	M-Fc-GGGGGAQ-KSTQDDCDWDPWTCEHMOVGP-LE (SEQ ID NO: 286)
Con4-17 (C)	0.96	M-Fc-GGGGGAQ-GPRISTCQWDPWTCEHMDQL-LE (SEQ ID NO: 287)
Con4-8 (C)	1.20	M-Fc-GGGGGAQ-STIGDMCEWDPWTCAHMQVD-LE (SEQ ID NO: 288)
AC4-Con4 (C)	1.54	M-Fc-GGGGGAQ-VLGGQGCEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 289)
Con4-1 (C)	2.47	M-Fc-GGGGGAQ-VLGGQGCQWDPWTCSHLEDG-LE (SEQ ID NO: 290)
Con4-C1 (C)	2.75	M-Fc-GGGGGAQ-TTIGSMCEWDPWTCAHMQGG-LE

10

20

30

40

		(SEQ ID NO: 291)	
Con4-21 (C)	3.21	M-Fc-GGGGGAQ- TKGKSVCQWDPWTCSHMQSG-LE (SEQ ID NO: 292)	
Con4-C2 (C)	3.75	M-Fc-GGGGGAQ- TTIGSMCQWDPWTCAHMQGG-LE (SEQ ID NO: 293)	
Con4-18 (C)	4.80	M-Fc-GGGGGAQ- WVNEVVCEWDPWTCNHWDTP-LE (SEQ ID NO: 294)	10
Con4-19 (C)	5.76	M-Fc-GGGGGAQ- VVQVGMQWDPWTCKHMRLQ-LE (SEQ ID NO: 295)	
Con4-16 (C)	6.94	M-Fc-GGGGGAQ- AVGSQTCEWDPWTCAHLVEV-LE (SEQ ID NO: 296)	
Con4-11 (C)	9.70	M-Fc-GGGGGAQ- QGMKMFCEWDPWTCAHIVYR-LE (SEQ ID NO: 297)	20
Con4-C4 (C)	9.80	M-Fc-GGGGGAQ- TTIGSMCQWDPWTCEHMQGG-LE (SEQ ID NO: 298)	
Con4-23 (C)	9.88	M-Fc-GGGGGAQ- TSQRVGCEWDPWTCQHLYT-LE (SEQ ID NO: 299)	
Con4-15 (C)	15.00	M-Fc-GGGGGAQ- QWSWPPCEWDPWTCQTVWPS-LE (SEQ ID NO: 300)	
Con4-9 (C)	20.11	M-Fc-GGGGGAQ- GTSPSFCQWDPWTCSHMQVQG-LE (SEQ ID NO: 301)	30
Con4-10 (C)	86.61	M-Fc-GGGGGAQ- TQGLHQCEWDPWTCKVLWPS-LE (SEQ ID NO: 302)	
Con4-22 (C)	150.00	M-Fc-GGGGGAQ- VWRSQVCQWDPWTCNLGGDW-LE (SEQ ID NO: 303)	
Con4-3 (C)	281.50	M-Fc-GGGGGAQ- DKILEECQWDPWTCQFFYGA-LE (SEQ ID NO: 304)	40

Con4-5 (C)	阻害なし	M-Fc-GGGGGAQ- ATFARQCQWDPWTCALGGNW-LE (SEQ ID NO: 305)
Con4-30 (C)	阻害なし	M-Fc-GGGGGAQ- GPAQEECEWDPWTCEPLPLM-LE (SEQ ID NO: 306)
Con4-26 (C)	阻害なし	M-Fc-GGGGGAQ- RPEDMCSQWDPWTWHLQGYC-LE (SEQ ID NO: 307)
Con4-7 (C)	阻害なし	M-Fc-GGGGGAQ- LWQLAVCQWDPQTCDHMGAL-LE (SEQ ID NO: 308)
Con4-12 (C)	阻害なし	M-Fc-GGGGGAQ- TQLVSLCEWDPWTCRLLDGW-LE (SEQ ID NO: 309)
Con4-13 (C)	阻害なし	M-Fc-GGGGGAQ- MGGAGRCEWDPWTCQLLQGW-LE (SEQ ID NO: 310)
Con4-14 (C)	阻害なし	M-Fc-GGGGGAQ- MFLPNECQWDPWTCSNLPEA-LE (SEQ ID NO: 311)
Con4-2 (C)	阻害なし	M-Fc-GGGGGAQ- FGWSHGCEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 312)
Con4-6 (C)	阻害なし	M-Fc-GGGGGAQ- WPQTEGCQWDPWTCRLLHGW-LE (SEQ ID NO: 313)
Con4-24 (C)	阻害なし	M-Fc-GGGGGAQ- PDTRQGCQWDPWTCRLYGMW-LE (SEQ ID NO: 314)
AC1-Con4 (C)	阻害なし	M-Fc-GGGGGAQ- TWPQDKCEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 315)
AC3-Con4 (C)	阻害なし	M-Fc-GGGGGAQ- DKILEECEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 316)
AC5-Con4 (C)	阻害なし	M-Fc-GGGGGAQ- AATQEECEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 317)

10

20

30

40

L 1 由来の 親和性成熟ペプチ体	hAng-2:Tie2 IC₅₀ (nM)	ペプチ体配列 (配列番号)
L1-7 (N)	0.03	MGAQ- TNFMPMDDEQRLYEQFILQQG- LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 318)
AC6-L1 (N)	0.03	MGAQ- TNYKPLDELDATLYEHWILQHS LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 319)
L1-15 (N)	0.04	MGAQ- QKYQPLDELDKTLYDQFMLQQG LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 320)
L1-2 (N)	0.04	MGAQ-LNFTPLDELEQTLYEQWTLQQS LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 321)
L1-10 (N)	0.05	MGAQ- QKFQPLDELEQTLYEQFMLQQA LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 322)
L1-13 (N)	0.05	MGAQ- QEYEPLDELDETLYNQWMFHQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 323)
L1-5 (N)	0.05	MGAQ-VKYKPLDELDEILYEQQTFQER LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 324)
L1-C2 (N)	0.05	MGAQ- TKFQPLDELDTLYEQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 325)
L1-C3 (N)	0.06	MGAQ- TNFQPLDELDTLYEQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 326)
L1-11 (N)	0.07	MGAQ- QNFKPMDELEDTRYKQFLFQHS LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 327)

10

20

30

40

L1-17 (N)	0.08	MGAQ- VKYKPLDELDEWLYHQFTLHHQ LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 328)
L1-12 (N)	0.08	MGAQ- YKFTPLDDLEQTLYEQWTLQHV LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 329)
L1-1 (N)	0.08	MGAQ-QNYKPLDELDAATLYEHFIFHYT LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 330)
L1-4 (N)	0.08	MGAQ- VKFKPLDALEQTLYEHWMFQQA LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 331)
L1-20 (N)	0.09	MGAQ- EDYMPLDALDAQLYEQFILLHG LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 332)
L1-22 (N)	0.09	MGAQ- YKFNPMDELEQTLYEEFLFQHA LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 333)
L1-14 (N)	0.11	MGAQ- SNFMPLDELEQTLYEQFMLQHQ LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 334)
L1-16 (N)	0.11	MGAQ- QKFQPLDELEETLYKQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 335)
L1-18 (N)	0.16	MGAQ-QKFMPLDELDEILYEQFMFQQS LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 336)
L1-3 (N)	0.16	MGAQ- TKFNPLDELEQTLYEQWTLQHQ LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 337)
L1-21 (N)	0.17	MGAQ- HTFQPLDELEETLYYQWLYDQL LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 338)

10

20

30

40

L1-C1 (N)	0.56	MGAQ- QKFKPLDELEQTLYEQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 339)
L1-19 (N)	1.26	MGAQ- QTFQPLDDLEEYLYEQWIRRYH LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 340)
L1-9 (N)	1.62	MGAQ- SKFKPLDELEQTLYEQWTLQHA LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 341)
Con1由来の 親和性成熟ペプチ体	hAng-2:Tie2 IC₅₀ (nM)	ペプチ体配列 (配列番号)
Con1-4 (C)	1.68	M-Fc-GGGGGAQ- SGQLRPC EEIFGCGTQNLAL-LE (SEQ ID NO: 342)
Con1-1 (C)	3.08	M-Fc-GGGGGAQ- AGGMRPYDGMLGWPNYDVQA-LE (SEQ ID NO: 343)
Con1-6 (C)	8.60	M-Fc-GGGGGAQ- GQDLRPCEDMFGCGTKDWYG-LE (SEQ ID NO: 344)
Con1-3 (C)	16.42	M-Fc-GGGGGAQ- APGQRPYDGMLGWPTYQRIV-LE (SEQ ID NO: 345)
Con1-2 (C)	阻害なし	M-Fc-GGGGGAQ- QTWDDPCMHLGPVTWRRCI-LE (SEQ ID NO: 346)
Con1-5 (C)	阻害なし	M-Fc-GGGGGAQ- FGDKRPLECMFGGPIQLCPR-LE (SEQ ID NO: 347)
親: Con1 (C)	26.00	M-Fc-GGGGGAQ-KRPC EEIFGGCTYQ- LE (SEQ ID NO: 348)

10

20

30

12-9由来の 親和性成熟ペプチ体	hAng-2:Tie2 IC ₅₀ (nM)	ペプチ体配列 (配列番号)
12-9-3 (C)	0.81	M-Fc-GGGGGAQ- LQEWCEGVDPFTFGCEKQR-LE (SEQ ID NO: 349)
12-9-7 (C)	0.93	M-Fc-GGGGGAQ- MLDYCEGMDDPFTFGCDKQM-LE (SEQ ID NO: 350)
12-9-6 (C)	0.95	M-Fc-GGGGGAQ- HQEYCEGMEDPFTFGCEYQG-LE (SEQ ID NO: 351)
12-9-C2 (C)	1.41	M-Fc-GGGGGAQ- LQDYCEGVDPFTFGCENQR-LE (SEQ ID NO: 352)
12-9-5 (C)	1.56	M-Fc-GGGGGAQ- LLDYCEGVQDPFTFGCENLD-LE (SEQ ID NO: 353)
12-9-1 (C)	1.84	M-Fc-GGGGGAQ- GFEYCDGMEDPFTFGCDKQT-LE (SEQ ID NO: 354)
12-9-4 (C)	2.05	M-Fc-GGGGGAQ- AQDYCEGMEDPFTFGCEMQK-LE (SEQ ID NO: 355)
12-9-C1 (C)	2.68	M-Fc-GGGGGAQ- LQDYCEGVDPFTFGCEKQR-LE (SEQ ID NO: 356)
12-9-2 (C)	8.42	M-Fc-GGGGGAQ- KLEYCDGMEDPFTQGCDNQS-LE (SEQ ID NO: 357)
親 : 12-9 (C)	15.00	M-Fc-GGGGGAQ- FDYCEGVDPFTFGCDNH-LE (SEQ ID NO: 358)

【実施例 9】

【0392】

Ang-2 ペプチ体の 6 つの試料を、huAng-2 (R&D Systems, BNO12103A) へのそれらの結合活性に関して BIA コア で試験した。プロテイン G を標準アミンカップリングプロトコール (BIAcore Inc.) に従って CM5 チップに固定し、次にペプチ体を捕獲のためにプロテイン G 表面上に注入した (RL ~ 100 Ru)。huAng-2 と捕獲したペプチ体の間の結合を調べるために、0.3 nM - 40 nM の huAng-2 を捕獲ペプチ体表面に注入し、結合センサーグラムを BIAevaluation 3.0 (BIAcore Inc.) を用いて解析した。表 8 はこの実験の結果をまとめたものである。

【0393】

10

20

30

40

【表 1 4】

表 8

ペプチ体	Lot #	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)
Con4-44 (C)	011702	2.1E-10	2.9E+05	5.9E-05
L1-7 (N)	022102	2.4E-10	3.7E+05	8.7E-05
L1-10 (N)	021302	7.7E-10	1.5E+05	1.1E-04
L1-21 (N)	021802	2.4E-10	5.6E+05	1.4E-04
Con4 (C)	33456-77	3.8E-10	5.3E+05	2.0E-04
2xCon4 (C) 1K	092501	3.4E-10	4.8E+05	1.6E-04

10

【実施例 1 0】

【0 3 9 4】

中和 E L I S A

ヒト、マウス、イヌ及びラット A n g - 2、及びヒト及びマウス A n g - 1 順化培地を次のように D M E M / 5 0 μ g / m l B S A 中で希釈した：h A n g - 2 - 1 : 6 4 希釈；m A n g - 2 - 1 : 6 4 希釈；ラット A n g - 2 - 1 希釈せず；サル A n g - 2 - 1 : 3 2 希釈；h A n g - 1 - 1 : 4 希釈；及び m A n g - 1 - 1 : 4 希釈。

20

【0 3 9 5】

これらの順化培地の各々を希釈する割合は、最大達成可能結合（すなわちプラトー）の 5 0 % で 1 n M h T i e - 2 - F c に結合する能力（T i e - 2 部分が分子の可溶性細胞外部分だけを含む T i e - 2 - F c 分子として提供される；R & D S y s t e m s , カタログ番号 3 1 3 - T I）によって決定した。マイクロタイタープレートで希釈順化培地 1 0 0 μ l で被覆した。A n g - 2 中和 E L I S A のために、候補抗 A n g - 2 ペプチ体を、約 1 % B S A 及び約 1 n M T i e - 2 （T i e - 2 部分が分子の可溶性細胞外部分だけを含む T i e - 2 - F c 分子として提供される；R & D S y s t e m s , カタログ番号 3 1 3 - T I）を含む P B S の溶液中 4 倍希釈で 6 2 . 5 n M から 0 . 0 1 5 p M まで滴定した。A n g - 1 中和 E L I S A のために、候補抗 A n g - 2 ペプチ体を、約 1 % B S A 及び約 1 n M T i e - 2 （T i e - 2 部分が分子の可溶性細胞外部分だけを含む T i e - 2 - F c 分子として提供される；R & D S y s t e m s , カタログ番号 3 1 3 - T I）を含む P B S の溶液中 4 倍希釈で 1 0 0 0 n M から 0 . 2 p M まで滴定した。

30

【0 3 9 6】

約 1 0 0 μ l のペプチ体 / T i e - 2 溶液を各々のウェルに加えた後、プレートを室温で一晩インキュベートし、その後約 0 . 1 % T w e e n - 2 0 を含む P B S 中で 5 回洗った。洗浄後、約 1 0 0 μ l / 穴の抗 T i e - 2 抗体（P h a r m i n g e n I n c . , カタログ番号 5 5 7 0 3 9）を加えて約 1 μ g / m l の最終濃度にし、プレートを室温で約 1 時間インキュベートした。次に、約 1 0 0 μ l / 穴のヤギ抗マウス I g G - H R P （P i e r c e C h e m i c a l C o . , カタログ番号 3 1 4 3 2）を、約 1 % B S A を含む P B S 中 1 : 1 0 , 0 0 0 の希釈で加えた。

40

【0 3 9 7】

プレートを室温で約 1 時間インキュベートした後、約 0 . 1 % T w e e n - 2 0 を含む P B S でプレートを 5 回洗った。次に約 1 0 0 μ l / 穴の T M B 基質（S I G M A , カタログ番号 T 8 6 6 5）を加えて、青色を発現させた。その後分光光度計において 3 7 0 n m で吸光度を読み取った。その結果を下記の表 9 に示す。

【0 3 9 8】

【表 15】

表9
ペプチ体を介した
アンギオポエチン：Tie2相互作用の中和

	hAng-2	mAng-2	rAng-2	cAng-2	hAng-1	mAng-1
ペプチ体	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)
2xCon4 (C)	0.026	0.035	0.024	0.047	3.0	3.2
Con4 (C)	0.197	0.289	0.236	0.540	200	300
Con4-44 (C)	0.08	0.16	0.22	----	43	----
Con4-40 (C)	0.20	0.27	0.35	----	> 1000	----
L1-7 (N)	0.046	0.063	0.035	0.108	> 1000	> 1000
L1-21 (N)	0.179	0.249	0.204	0.608	> 1000	> 1000
L1-10 (N)	0.06	0.06	0.06	----	> 1000	----

【実施例 11】

【0399】

PK試験

試験計画

体重20gから30gの雄性CD-1マウスを各々のペプチ体処置群（2×Con4-C、L1-7-N及びL1-21-N）に無作為に分けた。動物に、単回IVボラス（n=38/群）又は50μgペプチ体の単回SC投与（n=34/群）を実施した。注射は、IV及びSC投与に関してそれぞれ尾静脈を通して及び肩の皮膚下に行った。

【0400】

血液採取及び分析方法

各々の抗Ang-2ペプチ体濃度測定のために、投与前、及びSC及びIV群については投与後1、2、4、8、16、24、48、72、96、120、144、168、216、264、312及び336時間目に血液試料を採集した。IV群についてはさらなる試料を投与の5分後及び30分後に採集した。各時点で2匹の動物から採血し、採血後動物を犠牲剖検した。血液（約0.50mL）は、心臓穿刺からポリプロピレンmicrotainer（登録商標）血清分離管に収集した。試料を、約20分間若しくは血餅形成が起こるまで氷上に保持した。血清を2℃から8℃で約10分間の遠心分離によって血液試料から分離し、検定時まで約-70℃で保存した。試料を、定量下限（LLOQ）100ng/mlの検定済み時間分解蛍光（TRF）アッセイを用いて測定した。NUNCフルオロMaxisorpマイクロタイタープレート組換えマウスAng-2タンパク質で被覆した。次に非特異的結合を低下させるためにプレートをタンパク質溶液で遮断した。標準、品質管理及び未知試料を10%マウス血清アッセイ緩衝液中で調製し、マイクロタイタープレートのウェルにピペットで分配した。ペプチ体を固定Ang-2に特異的に結合させた。非結合物質を洗い流した後（Kirkgaard & Perry Laboratories Inc.）、ビオチニル化ヤギ抗ヒトIgG（H+L）モノクローナル抗体（Jackson Immuno Research Laboratories Inc.）をウェルに加えた。非結合ビオチニル化モノクローナル抗体を除去するための洗浄段階後、ユーロピウム標識ストレプトアビジンをウェルに加えた。非結合ストレプトアビジンユーロピウムを洗浄除去した後、酸性溶液を各々のウェルにピペットで加えて、結合ユーロピウムをストレプトアビジンから遊離させた。蛍光シグナルを生じさせ、Wallac蛍光光度リーダーで読み取った。マウス血清中の抗Ang-2ペプチ体の分析についての検定範囲は0.078μg/mLから5μg/mLであった。

【0401】

薬物動態分析

各々の群についての統合平均濃度－時間データを、WinNonlin Professional（バージョン3.3、Pharsight Corp., Mountain View, CA）を用いて非コンパートメント解析に供した。試料は名目時間の10%以内に採集したので、PK解析には名目試料採取時間を使用した。PK解析前にLLOQ未満のすべての濃度値をゼロに設定した。次のPKパラメータを評価した：

・最終半減期（ $t_{1/2}$ ）は、 $t_{1/2} = \ln(2) / k_{el}$ であった〔式中、 k_{el} は最終対数線形減衰期の線形回帰によって評価した一次最終速度定数である〕。

・血清濃度－時間曲線下面積（ $AUC_{(0-1ast)}$ ）を、0時から最後まで、すなわち最後の定量可能濃度（ C_{1ast} ）の時点まで線形／対数台形法を用いて評価した。

・0から無限大までの曲線下面積（ $AUC_{(0-\infty)}$ ）を、対応する（ $AUC_{(0-1ast)}$ ）と推定 C_{1ast} / k_{el} 値の合計として評価した：

【0402】

【数1】

$$AUC_{(0-\infty)} = AUC_{(0-last)} + \frac{\text{推定 } C_{last}}{k_{el}}$$

【0403】

SC投与後の絶対生体利用効率（F）を：

【0404】

【数2】

$$F = \frac{AUC_{(0-\infty)SC}}{AUC_{(0-\infty)IV}} \times 100$$

として算定した。

【0405】

その結果を図2に示す。

【実施例12】

【0406】

試験0日目に、雌性ヌードマウスに 1×10^7 A431細胞を皮下注射した。3日目に、Ang-2ペプチ体 $2 \times Con4-C$ を $200 \mu g / \text{マウス} / \text{日}$ の用量で皮下投与した。図に示すような規則的間隔で腫瘍容積と体重を記録した。Ang-2ペプチ体処置群対ビヒクル対照及び対照ペプチ体の間で腫瘍増殖に有意差が認められた（Scheffeのポストホック検定と反復測定ANOVAを使用して、 $p < 0.0001$ vs 各々の対照）。このペプチ体による処置は体重に有意の影響を及ぼさなかった。その結果を図3に示す。

【実施例13】

【0407】

A431インビトロ増殖曲線

A431細胞を、10%ウシ胎仔血清（FBS）を補足したDMEM $200 \mu l$ 中、 2000 細胞／ウエルで96穴組織培養平板に接種した。接種の16時間後に培地を吸引した。その後次のものをウエルに戻し加え、3組作製した： $100 \mu l / \text{ウエル}$ のDMEM、10%FBS、 $1 mg / ml$ の陰性対照ペプチ体4883又はペプチ体TN8-Con4。同じ設定を5平板に関して反復した。1つの平板からの培地を処置後24、48、72、96及び120時間目に吸引した。10%トリクロロ酢酸（TCA）を平板あたり $100 \mu l$ 加え、平板を4℃で保存した。最後の平板が少なくとも4時間10%TCAにあったときすべての平板を収集した。10%TCAを振とうして、ウエルを水道水で5回洗浄した。次に細胞を、室温で10分間、1%酢酸（Sigma A-6283）中0.4%スルホローダミンB（Sigma S-9012） $100 \mu l$ で染色し、1%酢酸

10

20

30

40

50

で5回洗った。その後平板を空気乾燥した。前記染料を、回転振とう機上で2時間、20 mM非緩衝Tris (pH>10) 300 µlで可溶化した。光学密度(OD)をマイクロタイタープレートリーダーにおいて540 nmで読み取った。その結果を図4に示す。

【実施例14】

【0408】

試験0日目に、雌性ヌードマウスに 2×10^6 Colo-205細胞プラスMatrigel (2:1)を皮下注射した。3日目に、Ang-2ペプチ体L1-7-N、L1-21-N、Con4-C及び $2 \times$ Con4-Cを14 µg/マウスの用量で週に2回皮下投与した。抗Ang-2抗体Ab536、47 µg/マウスを陽性対照として週に3回投与した。規則的間隔で腫瘍容積と体重を記録した。

10

【0409】

Ang-2ペプチ体処置群対ビヒクル対照及び対照ペプチ体の各々1つの間で腫瘍増殖に有意差が認められた(Scheffeのポストホック検定と反復測定ANOVAを使用して、 $p < 0.0001$ vs 各々の対照)。これらのペプチ体による処置は体重に有意の影響を及ぼさなかった(結果は示していない)。それらの結果を図5に示す。

【実施例15】

【0410】

試験0日目に、雌性ヌードマウスに 2×10^6 Colo-205細胞プラスMatrigel (2:1)を皮下注射した。3日目に、Ang-2ペプチ体 $2 \times$ Con4-Cを14、2.8及び0.56 µg/マウスの用量で週に2回皮下投与した。図に示すような規則的間隔で腫瘍容積と体重を記録した。2つのより高い用量のAng-2ペプチ体処置群対ビヒクル対照及び対照ペプチ体の間で腫瘍増殖に有意差が認められた(Scheffeのポストホック検定と反復測定ANOVAを使用して、中間用量については $p = 0.003$ 及び高用量については $p < 0.0001$)。これらのペプチ体による処置は体重に有意の影響を及ぼさなかった。破線は、1匹のマウスの原因不明の死亡により、群の総数が10匹から9匹のマウスに減少したことを表わす。それらの結果を図6に示す。

20

【実施例16】

【0411】

抗Ang-2ペプチ体対Colo-205異種移植片腫瘍

試験0日目に、雌性ヌードマウスに 2×10^6 Colo-205細胞プラスMatrigel (2:1)を皮下注射した。3日目に、Ang-2ペプチ体 $2 \times$ Con4-C又は対照ペプチ体を350 µg/日の用量で週に2回皮下投与した。対照ペプチ体(表5に示すような)で処置した群からの腫瘍を14日目(サイズ対合対照)又は18日目(時間対合対照)に採取した。 $2 \times$ Con4 (C)からの腫瘍は18日目に採取した。図に示すような規則的間隔で腫瘍容積と体重を記録した。時間対合対照群と $2 \times$ Con4-C処置群の間で腫瘍増殖に有意差が認められた(Scheffeのポストホック検定と反復測定ANOVAにより、 $p = 0.0154$)。これらのペプチ体による処置は体重に有意の影響を及ぼさなかった。

30

【0412】

画像解析用に調製した腫瘍を冠状面で二等分し、半分をOCT (Sakura Finetek USA Inc., Torrance, CA)に急速凍結(snap frozen)した。凍結切片を、DABを色素原として、抗マウスCD31(カタログ番号553370、BD Pharmingen, San Diego, CA)を2 µg/mlで使用して免疫組織化学的に染色した。腫瘍切片を20Xの対物レンズ倍率でデジタル写真撮影した。処置群当たり10の腫瘍に関して、各腫瘍について4つの「コンパスポイント」領域をとらえた。MetaMorph (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA)画像解析システムを使用して、画像内のCD31染色血管について閾値を定めた。CD31陽性染色の面積を、各々の領域内の総腫瘍組織の比として表わした。その結果を図7に示す。

40

【実施例17】

50

【0413】

試験0日目に、雌性ヌードマウスに 2×10^6 Colo-205細胞プラスMatrigel (2:1)を皮下注射した。試験3、10又は15日目のいずれかに、 $350 \mu\text{g}$ /マウス、皮下、週に2回のAng-2ペプチ体 $2 \times \text{Con}4-\text{C}$ による処置、又は同等の対照ペプチ体による処置を開始した。規則的間隔で腫瘍容積と体重を記録した。すべてのAng-2ペプチ体処置群対ビヒクル対照の間で腫瘍増殖に有意差が認められた (Scheffeのポストホック検定と反復測定ANOVAを使用して、15日目群については $p=0.089$ 及び3日目及び10日目群については $p<0.0001$)。これらのペプチ体による処置は体重に有意の影響を及ぼさなかった。それらの結果を図8に示す (体重は示していない)。

10

【実施例18】

【0414】

A431及びColo-205異種移植片モデルの両方において、週に3回腹腔内投与した $47 \mu\text{g}$ /雌性ヌードマウスの抗体Ab536、又は種々の長期試験 (≥ 10 週間の投与)における多回投与スケジュールで皮下投与したペプチ体 $2 \times \text{Con}4-\text{C}$ を使用して、完全応答 (CR) 率の要約を得た。ここで用いるCRは、処置後測定可能な腫瘍が残存しなかったという結果を意味する。それらの結果を図9に示す。

【実施例19】

【0415】

a) Colo-205腫瘍モデルにおけるペプチ体とタキソテルの併用

20

試験0日目に、雌性ヌードマウスに 2×10^6 Colo-205細胞プラスMatrigel (2:1)を皮下注射した。試験14日目に、a) $350 \mu\text{g}$ /マウス、皮下、週に2回のAng-2ペプチ体 $2 \times \text{Con}4-\text{C}$ 、b) $20 \text{mg}/\text{kg}$ 、腹腔内、週に3回のタキソテル、又はc) 両方の併用による処置を開始した。規則的間隔で腫瘍容積と体重を記録した。すべての処置群対ビヒクル対照の間で腫瘍増殖に有意差が認められた (Scheffeのポストホック検定と反復測定ANOVAを使用して $p<0.0001$)。さらに、併用治療群は単独療法のどちらの群とも有意の差があった ($p<0.0001$ vs $2 \times \text{Con}4-\text{C}$ 及び $p=0.0122$ vs タキソテル)。破線は、1匹のマウスの原因不明の死亡により、群の総数が10匹から9匹のマウスに減少したことを表わす。これらのペプチ体による処置は体重に有意の影響を及ぼさなかった。それらの結果を図10aに示す。

30

【0416】

b) Colo-205腫瘍モデルにおけるペプチ体と5-FUの併用

試験0日目に、雌性ヌードマウスに 2×10^6 Colo-205細胞プラスMatrigel (2:1)を皮下注射した。試験14日目に、a) $350 \mu\text{g}$ /マウス、皮下、週に2回のAng-2ペプチ体 $2 \times \text{Con}4-\text{C}$ 、b) $50 \text{mg}/\text{kg}$ 、腹腔内1日1回を5日間の5-FU、又はc) 両方の併用による処置を開始した。図に示すような規則的間隔で腫瘍容積と体重を記録した。

【0417】

すべての処置群対ビヒクル対照の間で腫瘍増殖に有意差が認められた (Scheffeのポストホック検定と反復測定ANOVAを使用して $p<0.0001$)。さらに、併用治療群は単独療法のどちらの群とも有意の差があった ($p=0.0375$ vs $2 \times \text{Con}4-\text{C}$ 及び $p=0.0453$ vs 5-FU)。5-FU処置群 (試験20日目で18%) ならびに併用療法群 (試験20日目で16%) において一過性の体重減少が認められたが、その後体重は完全に回復した。それらの結果を図10bに示す。

40

【実施例20】

【0418】

アジュバント関節炎モデル

雄性ルイスラット (120gから130g、Charles River, Wilmington, MA) を、12時間の明暗周期で環境制御室 (温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相対湿度5

50

0 ± 20%) 内のフィルターキャップケージに2匹ずつ収容した。動物には市販のげっ歯類飼料 (F o m u l a t i o n 8 6 4 0 ; T e k L a b , M a d i s o n , W I) を与え、フィルター精製した水道水を自由に摂取させた。食餌のカルシウム及びリン含量はそれぞれ1.2%と1.0%であった。

【0419】

パラフィン油0.05mL (C r e s c e n t C h e m i c a l C o . , H a u p p a u g e , N Y) に懸濁した熱死滅ヒト型結核菌 (M y c o b a c t e r i u m t u b e r c u l o s i s) H 3 7 R a (D i f f c o L a b o r a t o r i e s , D e t r o i t , M I) の単回0.5mg注射を尾の基部に経皮的に実施して、アジュバント関節炎を誘発した。関節炎の臨床的発症は、後足の腫脹と歩行困難によって示されたように9日目であった。2 × C o n 4 (C) 処置群 (免疫後1日目から処置した) を除いて、免疫後9日目 (関節炎の発症前) から、毎日の皮下注射として処置を開始し、18日目まで継続した。

10

【0420】

アジュバント関節炎の臨床的モニタリング

F e i g e ら、C e l l u l a r M o l e c . L i f e S c i . , 5 7 : 1 4 5 7 - 1 4 7 0 (2 0 0 0) が述べた方法に従って水プレチスモグラフィーを使用する後足容積の間欠的測定によって炎症の進行を臨床的に評価した。式：

$$[1 - \{(\text{処置 Ad A}) - \text{正常}\} / (\text{未処置 Ad A} - \text{正常})] \times 100$$

に従って台形規則を用いて、曲線下面積 (A U C) に基づいて足の炎症の抑制を算定した。

20

【0421】

さらに、この関節炎モデルでは体重減少が関節炎症の進行と並行することが示されているので、補足的エンドポイントとして9日間の治療プログラム中毎日、総体重を測定した。18日目にCO₂下で動物を犠牲死亡させた。

【0422】

骨無機質密度 (BMD) の損失を剖検で検査した (免疫後18日目)。後足を柔皮線 (足根関節 (踵関節) のすぐ近く) で切除し、70%エタノールに浸して、その後ファンビームX線デンストメータ (Q D R - 4 5 0 0 A 型 ; H o l o g i c , W a l t h a m , M A) を使用して水平方向に走査した。F e i g e ら、前出参照。走査後、分析する部位を描写するために踵足を中心とする長方形の箱 (29 × 25mm) を位置づけ、特許アルゴリズム (H o l o g i c ソフトウェア) で骨面積、骨無機質含量及び骨無機質密度を算定した。

30

【0423】

すべての結果を平均 ± 標準誤差で表わした。群間の有意差を表わすのに0.05のp値を使用した。臨床データ (連続変数) に関して、市販の統計ソフトウェア (S t a t s o f t v 3 . 0 ; S t a t s o f t , T u l s a , O K) を使用してクラスカル-ウォリスANOVA及びマン-ホイットニーU検定を実施した。

【0424】

結果をそれぞれ図11a、11b及び11cに示す。

40

【実施例21】

【0425】

角膜血管新生モデル

ラットにおけるVEGF誘導血管新生へのCON4 (C) の作用

A n g - 2 ペプチ体CON4 (C) をラットにおける血管新生の角膜モデルで評価した。VEGF (又はBSA対照) に浸したナイロンディスクを角膜支質に移植することによって血管新生を誘導した (n = 8 / 群)。ペプチ体TN8CON4-Cを1.0又は0.1mg / ラット / 日の用量の皮下注射によって7日間投与した。他の2つの群の動物は、同じ用量の陰性対照ペプチ体4883で処置した。すべての群を、1.0又は0.1mgの維持用量の3倍である3.0又は0.3mgの単回負荷用量で前処置した (図参照)。

50

7日間の処置後、2つの血管エンドポイントをラット角膜の各々のデジタル画像から判定した：ディスクと角膜縁の間の中間点を横切る血管の数、及び血管面積。TN8CON4-Cによる処置はVEGF誘導の血管新生を用量依存的に有意に阻止したが（ $p < 0.04$ ）、対照ペプチ体による処置はどちらのエンドポイントにも有意の作用を及ぼさなかった。処置動物の体重に基づく明らかな毒性の証拠は存在しなかった。結果を図12に示す。

【実施例22】

【0426】

エピトープマッピング

完全長（アミノ酸1-495）、N末端（アミノ酸1-254）及びC末端（アミノ酸255-495）ヒトAng-2（hAng-2）タンパク質を、C末端6xHisタグを有するCMV-推進哺乳類発現ベクターにクローニングした。生じた3つの構築物プラスベクター対照を293T細胞に一過性発現させた。次に順化培地をトランスフェクト細胞から収集し、培地中のAng-2の発現レベルを抗6xHis ELISA及びウエスタンブロット法によって評価した。

【0427】

抗Ang-2抗体及びペプチ体の結合エピトープを、次のプロトコールに従ったELISAにより、ヒトhAng-2の3つのバージョンに結合する能力によって判定した：高結合96穴アッセイ平板をウエル当り100 μ lの順化培地で被覆し、37℃で1時間インキュベートした。順化培地を吸引し、平板を、ウエル当り200 μ lのPBS中5%BSAにより室温で1時間遮断した。その後遮断溶液を吸引した。ウエル当り100 μ lの抗体、ペプチ体又はTie2-FcをPBS中1%BSAに1 μ g/mlで加え、室温で1時間インキュベートした。ウエルをPBS中0.1%Tween 200 μ lで4回洗った。ウエル当り100 μ lのHRP複合ヤギ抗ヒトIgG又はヤギ抗マウスIgGを加え、室温で45分間インキュベートした。その後ウエルをPBS中0.1%Tween 200 μ lで4回洗った。ウエル当り100 μ lのTMB基質を加えた。O.D.を370nmで読み取った。

【0428】

結果をそれぞれ図13a、13b及び13cに示す。

【実施例23】

【0429】

BiaCoreアッセイに固有のある種の感受性限界の故に、結合親和性をSepidyne KinExAアッセイによっても評価した。

【0430】

huAng-2への2×CON4-C（Pb5714）の結合をKinExA（Sepidyne, Boise, ID）で試験した。Reacti-Gel 6xビーズ（Pierce, Rockford, IL）をhuAng-2で前被覆し、BSAで遮断した。10pM及び30pMの2×CON4-C試料を様々な濃度のhuAng-2（0.3pM-3nM）と共に室温で8時間インキュベートした後、huAng-2被覆ビーズを通過させた。ビーズ結合ペプチ体の量を蛍光（Cy5）標識ヤギ抗ヒト-Fc抗体（Jackson Immuno Research, West Grove, PA）によって定量した。結合シグナルは、平衡での遊離ペプチ体の濃度に比例する。

【0431】

解離平衡定数（ K_D ）を、二重曲線一部位均一結合モデル（KinEx（商標）ソフトウェア）を用いた競合曲線の非線形回帰から得た。次に K_D を、huAng-2との2×CON4-C結合に関して約2pMと決定した。

【0432】

図14に示すように、KinExAアッセイを使用して、ペプチ体2×Con4はhAng-2に対して～2pMの親和性を有することが示された。

【実施例24】

【0433】

ペグ化ペプチド

L i - 1 7 ペプチドを、標準カップリングプロトコール及び、N末端からC末端へ番号付けて、残基14 (met) からN末端残基1 (Cys) までの二重カップリングを用いて431 ABI シンセサイザーで合成した。

【0434】

「mPEG5K-(L1-7ペプチド)」と称される、L1-7ペプチドとメトキシポリ(エチレングリコール)-マレイミド；分子量：5DKaの複合物

緩衝液1(20mMリン酸塩、5mM EDTA、pH6.5)400μl中のL1-7ペプチド0.8mgの溶液を、メトキシポリ(エチレングリコール)-マレイミド(分子量：5KDa；Shearwater Corp.)13.5mg；緩衝液1中50.0mg/mLの溶液0.27mlで処理した。反応混合物を4℃で一晩インキュベートし、緩衝液A(20mM Tris塩酸塩、pH7.2)1.6mLで希釈して、Slide-A-Lyzerカセット(3500MWCO, Pierce)において同じ緩衝液に対して透析した。透析した反応混合物を1.0mL HiTrap Q Sepharose HPカラム(Amersham Biosciences Corp.)でイオン交換クロマトグラフィーによって精製した。生成物ピークを、40カラム容量で100%緩衝液Aから100%緩衝液B(緩衝液A+0.5M NaCl)までの勾配によって2つの1.0mL分画中に溶出した。併合生成物分画を、Microsep 1K Centrifugal Device(Pall Life Sciences)で0.23mgタンパク質/mLを含む250μlに濃縮した。

【0435】

「PEO4(L1-7ペプチド)₂」と称される、L1-7ペプチドと1,11-ビス-マレイミドテトラエチレングリコールの複合物

緩衝液1(20mMリン酸塩、5mM EDTA、pH6.5)500μL中のL1-7ペプチド1.0mgの溶液を、1,11-ビス-マレイミドテトラエチレングリコール(Pierce)0.0375mg(緩衝液1中0.1mg/mLの溶液0.375mL)で処理した。反応混合物を4℃で3.33時間インキュベートし、Slide-A-Lyzerカセット(3500MWCO, Pierce)において緩衝液A(20mM Tris塩酸塩、pH7.2)に対して透析した。透析した反応混合物を1.0mL HiTrap Q Sepharose HPカラム(Amersham Biosciences Corp.)でイオン交換クロマトグラフィーによって精製した。二量体生成物ピークを、40カラム容量で100%緩衝液Aから100%緩衝液B(緩衝液A+0.5M NaCl)までの勾配によって3つの1.0mL分画中に溶出した。併合生成物分画を、Microsep 1K Centrifugal Device(Pall Life Sciences)で0.12mgタンパク質/mLを含む550μLに濃縮した。

【0436】

「PEG3.4K(L1-7ペプチド)₂」と称される、L1-7ペプチドとポリ(エチレングリコール)-ビス-マレイミド；分子量：3.4DKaの複合物

緩衝液1(20mMリン酸塩、5mM EDTA、pH6.5)1.5mL中のL1-7ペプチド3.0mgの溶液を、ポリ(エチレングリコール)-ビス-マレイミド(分子量=3.4KDa、Shearwater Corp.)1.125mg；緩衝液1中2.0mg/mLの溶液0.563mLで処理した。反応混合物を4℃で一晩インキュベートし、Slide-A-Lyzerカセット(3500MWCO, Pierce)において緩衝液A(20mM Tris塩酸塩、pH7.2)に対して透析した。透析した反応混合物を5.0mL HiTrap Q Sepharose HPカラム(Amersham Biosciences Corp.)でイオン交換クロマトグラフィーによって精製した。生成物ピークを、40カラム容量で100%緩衝液Aから100%緩衝液B(緩衝液A+0.5M NaCl)までの勾配によって3つの3.0mL分画中に溶出し

た。併合生成物分画を、Microsep 1K Centrifugal Device (Pall Life Sciences) で0.24mgタンパク質/mLを含む850 μ lに濃縮した。

【0437】

MALDI-TOF質量分析結果は次の通りであった：

【0438】

【表16】

試料番号	同一性	予想質量	認められた質量
1	L1-7(非 α 化 β チド)	3,545	3,538.7
2	mPEG5K-(L1-7 α チド)	8,500	8,851
3	PEO4(L1-7 α チド) ₂	7,443	7,446.29
4	PEG3.4K(L1-7 α チド) ₂	10,550	10,552 6,882.61 3,550.13

10

PEG3.4K(L1-7ペプチド)及びPEO4(L1-7ペプチド)についての下付き文字「₂」は、ポリマー鎖に付き2個のペプチドが存在し、ポリマーの各々の末端に1個が位置することを示すことは認識される。

【0439】

IC₅₀測定

20

L1-7遊離及びペグ化ペプチドについてのhAng-2:hTie2-Fc相互作用の阻害に関するIC₅₀を実施例2で述べたような中和ELISAによって測定した。中和ELISAのために、ヒトAng-2ポリペプチドが結合したマイクロタイタープレートを、アフィニティーELISAに関して実施例2で述べたように調製した。候補抗Ang-2 L1-7ペグ化及び遊離ペプチドペプチ体を、約1%BSA及び約1nM Tie-2(Tie-2部分が分子の可溶性細胞外部分だけを含むTie-2-Fc分子として提供される；R&D Systems, カタログ番号313-TI)を含むPBSの溶液中4倍希釈で1000nMから0.2pMまで滴定した。約100 μ lの抗体/Tie-2溶液を各々のウェルに加えた後、プレートを室温で一晩インキュベートし、その後約0.1%Tween-20を含むPBS中で5回洗った。洗浄後、約100 μ l/穴の抗Tie-2抗体(Pharmingen Inc., カタログ番号557039)を加えて約1 μ g/mlの最終濃度にし、プレートを室温で約1時間インキュベートした。次に、約100 μ l/穴のヤギ抗マウスIgG-HRP(Pierce Chemical Co., カタログ番号31432)を、約1%BSAを含むPBS中1:10,000の希釈で加えた。プレートを室温で約1時間インキュベートした後、約0.1%Tween-20を含むPBSでプレートを5回洗った。次に約100 μ l/穴のTMB基質(上述)を加えて、呈色させた。その後分光光度計において370nmで吸光度を読み取った。

30

【0440】

L1-7ペプチド(C-GGGGG-AQ-TNFMPPMDDLEQRLYEQFILQQG-LE)(配列番号359)は、PEGへのカップリングのためのN末端システイン及び5Glyリンカーを含んだ。AQ及びLE隣接配列が、もとのファージクローン及びペプチ体の両方に存在した。hAng-2:Tie2阻害のIC₅₀の結果は次の通りであった：

40

【0441】

【表 17】

ペプチド	IC ₅₀ (nM)
L1-7ペプチド	0.49
mPEG5K-(L1-7ペプチド)	11.7
PEO4(L1-7ペプチド) ₂	0.064
PEG3.4K(L1-7ペプチド) ₂	0.058

【図面の簡単な説明】

【0442】

【図1】本発明のペプチドTN8-Con4-C又はリン酸緩衝食塩水(PBS)で処置した、A-431腫瘍を有するマウスにおける腫瘍容積(y軸)対時間(x軸)のグラフである。詳細は実施例の中で述べる。

10

【図2】2xCon4-C、L1-7-N又はL1-21-Nペプチ体のいずれかの50 µg用量で処置した野生型マウスにおけるペプチド濃度(y軸)対投与後の時間(x軸)のグラフである。詳細は実施例の中で述べる。

【図3】本発明によるペプチド2xCon4-C、又はリン酸緩衝食塩水(PBS)又は対照ペプチドで処置した、A-431腫瘍を有するマウスにおける腫瘍容積(y軸)対時間(x軸)のグラフである。詳細は実施例の中で述べる。

【図4】本発明によるペプチドCon4-C又は対照ペプチドで処置した、又は未処置の、培養A-431細胞のインビトロ増殖を示すグラフである。詳細は実施例の中で述べる。

20

【図5】本発明によるペプチドCon4-C、ペプチドL1-7-N、ペプチドL1-21-N、又はペプチド2xCon4-C、又はリン酸緩衝食塩水(PBS)、抗Ang-2抗体(Ab536)、又はFcで処置したColo205腫瘍細胞における腫瘍容積(y軸)対時間(x軸)のグラフである。詳細は実施例の中で述べる。

【図6】種々の用量の本発明によるペプチド2xCon4-C、又はリン酸緩衝食塩水(PBS)又はFcで処置した、Colo205異種移植腫瘍を有するマウスにおける腫瘍容積(y軸)対時間(x軸)のグラフである。詳細は実施例の中で述べる。

【図7】本発明によるペプチド2xCon4-C又は対照ペプチドで処置した、Colo205異種移植腫瘍を有するマウスにおける腫瘍容積(y軸)対時間(x軸)のグラフである。図7はまた、これらのペプチドについてのCD31染色面積/総腫瘍面積のグラフも示す。詳細は実施例の中で述べる。

30

【図8】本発明によるペプチド2xCon4-C、又はリン酸緩衝食塩水(PBS)又は対照ペプチドで処置した、Colo205異種移植腫瘍を有するマウスにおける腫瘍容積(y軸)対時間(x軸)のグラフである。詳細は実施例の中で述べる。このグラフは、抗Ang-2ペプチドは、投与がいつ開始されたかに関わりなく、Colo205腫瘍増殖を阻止しうることを示している。

【図9】A431及びColo-205異種移植モデルの両方において、抗体Ab536又はペプチド2xCon4-Cを使用して雌性ヌードマウスにおいて得られた完全応答(CR)率の要約である。詳細は実施例の中で述べる。

40

【図10A】本発明によるペプチド2xCon4-C、又は2xCon4-Cとタキソールの組合せ、又はリン酸緩衝食塩水(PBS)、又はPBSプラスタキソールで処置した、Colo205異種移植腫瘍を有するマウスにおける腫瘍容積(y軸)対時間(x軸)のグラフである。詳細は実施例の中で述べる。

【図10B】本発明によるペプチド2xCon4-C、又は2xCon4-Cと5-FUの組合せ、又はリン酸緩衝食塩水(PBS)、又はPBSプラス5-FUで処置した、Colo205異種移植腫瘍を有するマウスにおける腫瘍容積(y軸)対時間(x軸)のグラフである。詳細は実施例の中で述べる。

【図11A】本発明によるペプチド2xCon4-C、又はリン酸緩衝食塩水(PBS)、又は対照ペプチドで処置したラットにおけるアジュバント誘発性関節炎モデル、又は正

50

常又は関節炎対照での、足腫脹レベル（AUC±SE）のグラフである。詳細は実施例の中で述べる。

【図11B】本発明によるペプチ体2xC_{on}4-C、又はリン酸緩衝食塩水（PBS）、又は対照ペプチ体で処置したラットにおけるアジュバント誘発性関節炎モデル、又は正常又は関節炎対照での、足骨無機質密度（BMD）のグラフである。詳細は実施例の中で述べる。

【図11C】本発明によるペプチ体2xC_{on}4-C、又はリン酸緩衝食塩水（PBS）、又は対照ペプチ体で処置したラットにおけるアジュバント誘発性関節炎モデル、又は正常又は関節炎対照での、体重変化のグラフである。詳細は実施例の中で述べる。

【図12】ラットにおけるVEGF誘導の角膜血管新生の阻止を示す2つのグラフである。最初のグラフは、ウシ血清アルブミン（BSA）、VEGFプラスリン酸緩衝食塩水（PBS）、又はVEGFプラス本発明のペプチ体C_{on}4-Cで処置したラットにおいて測定された血管の数を示す。2番目のグラフは、BSA、VEGFプラスリン酸緩衝食塩水（PBS）、又はVEGFプラス本発明のペプチ体C_{on}4-Cで処置したラットにおける血管面積（mm²）を示す。詳細は実施例の中で述べる。

【図13A】本発明によるペプチ体TN8-C_{on}4-C、L1-7-N及び12-9-3-C、ならびに対照ペプチ体、Tie2-Fc、C2B8又は5B12についての、それぞれ完全長Ang-2（hAng-2）、hAng-2のN末端、及びhAng-2のC末端に関するエピトープマッピングデータ（O. D. 370）である。詳細は実施例の中で述べる。

【図13B】本発明によるペプチ体TN8-C_{on}4-C、L1-7-N及び12-9-3-C、ならびに対照ペプチ体、Tie2-Fc、C2B8又は5B12についての、それぞれ完全長Ang-2（hAng-2）、hAng-2のN末端、及びhAng-2のC末端に関するエピトープマッピングデータ（O. D. 370）である。詳細は実施例の中で述べる。

【図13C】本発明によるペプチ体TN8-C_{on}4-C、L1-7-N及び12-9-3-C、ならびに対照ペプチ体、Tie2-Fc、C2B8又は5B12についての、それぞれ完全長Ang-2（hAng-2）、hAng-2のN末端、及びhAng-2のC末端に関するエピトープマッピングデータ（O. D. 370）である。詳細は実施例の中で述べる。

【図14】Sapidyne KinExAアッセイを使用した、本発明によるペプチ体2xC_{on}4-Cの結合親和性（K_D）を示す。詳細は実施例の中で述べる。

【配列表】

10

20

30

A-801B (PCT).ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> AMGEN INC.

<120> SPECIFIC BINDING AGENTS OF HUMAN ANGIOPOIETIN-2

<130> A-801B

<140> NOT YET ASSIGNED

<141> 2002-10-11

<150> US 60/414,155

<151> 2002-09-27

<150> US 60/328,624

<151> 2001-10-11

<160> 359

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Ang-2 Binding Peptides

<400> 1

Lys Arg Pro Cys Glu Glu Met Trp Gly Gly Cys Asn Tyr Asp
1 5 10

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

10

20

30

A-801B (PCT).ST25.txt
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Ang-2 Binding Peptides

<400> 2

His Gln Ile Cys Lys Trp Asp Pro Trp Thr Cys Lys His Trp
1 5 10

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Ang-2 binding Polypeptide

<400> 3

Lys Arg Pro Cys Glu Glu Ile Phe Gly Gly Cys Thr Tyr Gln
1 5 10

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Ang-2 binding Polypeptide

<400> 4

Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met
1 5 10

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Ang-2 binding Polypeptide

A-801B (PCT).ST25.txt

<400> 5

Phe Asp Tyr Cys Glu Gly Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Asp
 1 5 10 15

Asn His

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Ang-2 binding Polypeptide

<400> 6

Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe
 1 5 10 15

Thr Phe Gln Gln
 20

20

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Ang-2 Binding Peptides

<400> 7

Gln Tyr Gly Cys Asp Gly Phe Leu Tyr Gly Cys Met Ile Asn
 1 5 10

30

<210> 8

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide

A-801B (PCT).ST25.txt

<400> 8
acaaacaaac atatgggtgc acagaaagcg gccgcaaaaa aactcgaggg tggaggcggt 60
ggggaca 67

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

10

<220>
<223> oligonucleotide
<400> 9
ggtcattact ggaccggatc 20

<210> 10
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

20

<220>
<223> oligonucleotide
<400> 10
cgtacagggt tacgcaagaa aatgg 25

<210> 11
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

30

<220>
<223> oligonucleotide
<400> 11
tttgttgat ccattactcg agtttttttg cggccgcttt ctgtgcacca ccacctccac 60
ctttac 66

<210> 12
<211> 32
<212> PRT

<213> Artificial Sequence A-801B (PCT).ST25.txt

<220>

<223> Peptibody capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (32)..(32)

<223> Xaa = Fc

10

<400> 12

Met Gly Ala Gln Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu
1 5 10 15

Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
20 25 30

<210> 13

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Peptibody capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (29)..(29)

<223> Xaa = Fc

30

<400> 13

Met Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln
1 5 10 15

Phe Thr Phe Gln Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
20 25

<210> 14

<211> 51

<212> PRT

<213> Artificial Sequence A-801B (PCT).ST25.txt

<220>

<223> Peptibody capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (51)..(51)

<223> Xaa = Fc

10

<400> 14

Met Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln
1 5 10 15

Phe Thr Phe Gln Gln Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser
20 25 30

Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Leu Glu Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Gly Xaa
50

20

<210> 15

<211> 60

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibody capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (60)..(60)

<223> Xaa = Fc

30

<400> 15

Met Gly Ala Gln Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu
1 5 10 15

Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30

A-801B (PCT).ST25.txt

Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe
35 40 45

Thr Phe Gln Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
50 55 60

<210> 16

<211> 56

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Peptibody capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (56)..(56)

<223> Xaa = Fc

20

<400> 16

Met Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln
1 5 10 15

Phe Thr Phe Gln Gln Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Lys Phe Asn Pro
20 25 30

Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln
35 40 45

Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
50 55

30

<210> 17

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibody capable of binding to Ang-2

<220>

A-801B (PCT).ST25.txt

<221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> Xaa = Fc

<400> 17

Met Gly Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu
 1 5 10 15

His Met Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
 20 25

10

<210> 18

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibody capable of binding to Ang-2

<220>

20

<221> misc_feature

<222> (45)..(45)

<223> Xaa = Fc

<400> 18

Met Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly
 1 5 10 15

Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser
 20 25 30

30

Gly Ser Ala Thr His Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
 35 40 45

<210> 19

<211> 62

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

A-801B (PCT).ST25.txt
 <223> Peptibody capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (62)..(62)

<223> Xaa = Fc

<400> 19

Met Gly Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu
 1 5 10 15

10

His Met Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser
 20 25 30

Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro
 35 40 45

Trp Thr Cys Glu His Met Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
 50 55 60

<210> 20

<211> 31

20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibody capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

30

<400> 20

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu
 1 5 10 15

Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Leu Glu
 20 25 30

<210> 21

<211> 53

A-801B (PCT).ST25.txt

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibody capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

10

<400> 21

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly
1 5 10 15Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Lys
20 25 30Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr
35 40 45Phe Gln Gln Leu Glu
50

20

<210> 22

<211> 59

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibody capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

30

<400> 22

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu
1 5 10 15

A-801B (PCT).ST25.txt

Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr
 35 40 45

Leu Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Leu Glu
 50 55

<210> 23

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Peptibody capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

20

<400> 23

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp
 1 5 10 15

Pro Trp Thr Cys Glu His Met Leu Glu
 20 25

<210> 24

<211> 47

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Peptibody capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

A-801B (PCT).ST25.txt

<400> 24

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Gln
 20 25 30

Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Leu Glu
 35 40 45

<210> 25

<211> 61

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibody capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 25

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp
 1 5 10 15

Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser
 20 25 30

Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Gln Glu Glu
 35 40 45

Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Leu Glu
 50 55 60

<210> 26

<211> 75

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

20

30

A-801B (PCT).ST25.txt

<220>

<223> Peptibody capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (75)..(75)

<223> Xaa = Fc

<400> 26

Met Gly Ala Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

10

Met Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu
 20 25 30

Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Gly Ser Gly
 35 40 45

Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser
 50 55 60

Ala Thr His Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
 65 70 75

20

<210> 27

<211> 72

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibody capable of binding to Ang-2

<220>

30

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 27

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Lys
 20 25 30

40

A-801B (PCT).ST25.txt

Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr
 35 40 45

Phe Gln Gln Gly Gly Gly Gly Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro
 50 55 60

Trp Thr Cys Glu His Met Leu Glu
 65 70

<210> 28

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Peptibody capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (30)..(30)

<223> Xaa = Fc

20

<400> 28

Met Gly Ala Gln Phe Asp Tyr Cys Glu Gly Val Glu Asp Pro Phe Thr
 1 5 10 15

Phe Gly Cys Asp Asn His Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
 20 25 30

<210> 29

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Peptibody capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)..(26)

A-801B (PCT).ST25.txt

<223> Xaa = Fc

<400> 29

Met Gly Ala Gln Gln Tyr Gly Cys Asp Gly Phe Leu Tyr Gly Cys Met
1 5 10 15

Ile Asn Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
20 25

<210> 30

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Peptibody capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> Xaa = Fc

20

<400> 30

Met Gly Ala Gln Lys Arg Pro Cys Glu Glu Met Trp Gly Gly Cys Asn
1 5 10 15

Tyr Asp Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
20 25

<210> 31

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Peptibody capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)..(26)

A-801B (PCT).ST25.txt

<223> Xaa = Fc

<400> 31

Met Gly Ala Gln His Gln Ile Cys Lys Trp Asp Pro Trp Thr Cys Lys
 1 5 10 15

His Trp Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
 20 25

<210> 32

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Peptibody capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> Xaa = Fc

20

<400> 32

Met Gly Ala Gln Lys Arg Pro Cys Glu Glu Ile Phe Gly Gly Cys Thr
 1 5 10 15

Tyr Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
 20 25

<210> 33

<211> 784

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> DNA encoding peptibodies capable of binding to Ang-2

<400> 33

atgggtgcac agaaattcaa cccgctggac gaactggaag aaactctgta cgaacagttc 60

actttccagc agctcgaggg tggaggcggg ggggacaaaa ctcacacatg tccaccttgc 120

ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gttttcctct tcccccaaaa acccaaggac 180

40

A-801B (PCT).ST25.txt

```

accctcatga tctcccgga ccttgaggtc acatgcgtgg tggaggacgt gagccacgaa 240
gaccttgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 300
aagccgcggg aggagcagta caacagcacg tacggtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 360
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgaagg tctccaacaa agccctccca 420
gcccccatcg agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acagggtgac 480
accctgcccc catcccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 540
aaaggcttct atcccagca catgccgtg gaggggaga gcaatgggca gccggagaac 600
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag 660
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag ggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 720
gaggctctgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaataatgg 780
atcc 784

```

<210> 34

<211> 768

<212> DNA

<213> Artificial sequence

10

<220>

<223> DNA encoding peptibodies capable of binding to Ang-2

<400> 34

```

atgaaattca acccgctgga cgaactggaa gaaactctgt acgaacagtt cactttccag 60
cagctcgagg gtggaggcgg tggggacaaa actcacat gtccaccttg cccagcacct 120
gaactcctgg ggggaccgtc agttttcttc tccccccaa aaccaagga caccctcatg 180
atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 240
gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gagggtcata atgccaagac aaagccgcgg 300
gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 360
tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agccccatc 420
gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacagggtga caccctgccc 480
ccatcccgga atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 540
tatccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 600
accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagca gctcaccgtg 660
gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 720
cacaaccact acacgcagaa gacccctctc ctgtctccgg gtaaataa 768

```

<210> 35

20

30

A-801B (PCT).ST25.txt

<211> 834

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptibodies capable of binding to Ang-2

<400> 35

atgaaattca	acccgctgga	cgaactggaa	gaaactctgt	acgaacagtt	cactttccag	60	
cagggatccg	gttctgctac	tgggtggtcc	ggctccaccg	caagctctgg	ttcaggcagt	120	10
gcgactcatc	tcgaggggtg	aggcgggtgg	gacaaaactc	acacatgtcc	accttgccca	180	
gcacctgaac	tcctgggggg	accgtcagtt	ttcctcttcc	ccccaaaacc	caaggacacc	240	
ctcatgatct	cccggaaccc	tgaggtcaca	tgcgtggtgg	tggacgtgag	ccacgaagac	300	
cctgaggtca	agttcaactg	gtacgtggac	ggcgtggagg	tgcataatgc	caagacaaag	360	
ccgcgggagg	agcagtacaa	cagcacgtac	cgtgtggtca	gcgtcctcac	cgctctgcac	420	
caggactggc	tgaatggcaa	ggagtacaag	tgcaaggtct	ccaacaaagc	cctcccagcc	480	
cccacgaga	aaaccatctc	caaagccaaa	gggcagcccc	gagaaccaca	ggtgtacacc	540	
ctgcccccat	cccggaatga	gtgaccaag	aaccagggtc	gcctgacctg	cctgggtcaaa	600	
ggcttctatc	ccagcgacat	cgccgtggag	tgggagagca	atgggcagcc	ggagaacaac	660	20
tacaagacca	cgctctccgt	gttggaactc	gacggctcct	tcttctctta	cagcaagctc	720	
accgtggaca	agagcagggtg	gcagcagggg	aacgtcttct	catgctccgt	gatgcatgag	780	
gctctgcaca	accactacac	gcagaagagc	ctctccctgt	ctccgggtaa	ataa	834	

<210> 36

<211> 861

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptibodies capable of binding to Ang-2

<400> 36

atgggtgcac	agaaattcaa	cccgtggac	gaactggaag	aaactctgta	cgaacagttc	60	
actttccagc	aggggtggtg	tgggtggtgg	ggtggttaagt	tcaaccact	ggatgagctg	120	
gaagagactc	tgtatgaaca	gttcactttc	cagcaactcg	aggggtggagg	cggtggggac	180	
aaaactcaca	catgtccacc	ttgccagca	cctgaactcc	tggggggacc	gtcagttttc	240	
ctcttccccc	caaaacccaa	ggacaccctc	atgatctccc	ggaccctga	ggtcacatgc	300	
gtggtggtgg	acgtgagcca	cgaagaccct	gaggtcaagt	tcaactggta	cgtggacggc	360	

10

20

30

40

A-801B (PCT).ST25.txt

```

gtggagggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 420
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 480
aagggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccctctccaa agccaaaggg 540
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac 600
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 660
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 720
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 780
gtcttctcat gtcctgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 840
tccctgtctc cgggtaaata a 861

```

10

<210> 37

<211> 849

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptibodies capable of binding to Ang-2

20

<400> 37

```

atgaaattca acccgctgga cgaactggaa gaaactctgt acgaacagtt cactttccag 60
caggggtgggt gtgggtggcg tggtlaagttc aacccactgg atgagctgga agagactctg 120
tatgaacagt tcactttcca gcaactcgag ggtggaggcg gtggggacaa aactcacaca 180
tgtccacctt gccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagttttcct ctcccccca 240
aaaccaaggt acacctcat gatctcccg accctgagg tcacatgctg ggtggtggac 300
gtgagccacg aagacctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 360
aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 420
ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 480
aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 540
ccacaggtgt acacctgcc cccatcccg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 600
acctgcctgy tcaaaggctt ctatccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 660
cagccggaga acaactacaa gaccacgct cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc 720
ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 780
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 840
ggtaataaa 849

```

30

<210> 38

A-801B (PCT).ST25.txt

<211> 759

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptibodies capable of binding to Ang-2

<400> 38

atgggtgcac agcaggaaga atgcgaatgg gacccatgga cttgcgaaca catgctcgag	60	
ggtggaggcg gtggggacaa aactcacaca tgtccacctt gcccagcacc tgaactcctg	120	10
gggggaccgt cagttttcct cttccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg	180	
acccttgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc	240	
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag	300	
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat	360	
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc	420	
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg	480	
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc	540	
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgctt	600	
cccgtgctgg actccgacgg ctctttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc	660	20
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac	720	
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataa	759	

<210> 39

<211> 816

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptibodies capable of binding to Ang-2

<400> 39

atgcaggaag aatgcgaatg ggacccatgg acttgcaac acatgggatc cggttctgct	60	
actggtggtt ccggctccac cgcaagctct ggttcaggca gtgcgactca tctcgagggt	120	
ggaggcggtg gggacaaaac tcacacatgt ccaccttgcc cagcacctga actcctgggg	180	
ggaccgtcag ttttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc	240	
cctgagggtc catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgagggt caagttcaac	300	
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac	360	
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc	420	40

10

20

30

40

A-801B (PCT).ST25.txt

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 480
 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat 540
 gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttggtca aaggcttcta tcccagcgac 600
 atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 660
 gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 720
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcagtctcc gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac 780
 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaataa 816

<210> 40

<211> 867

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> DNA encoding peptibodies capable of binding to Ang-2

<400> 40

atgggtgcac agcaggaaga atgcgaatgg gacccatgga cttgcgaaca catgggatcc 60
 ggttctgcta ctggtggttc cggctccacc gcaagctctg gttcaggcag tgcgactcat 120
 caggaagaat gcgaatggga cccatggact tgcgaacaca tgctcgaggg tggaggcggg 180
 ggggacaaaa ctacacatg tccaccttg cagcacctg aactcctggg gggaccgtca 240
 gttttcctct tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 300
 acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 360
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgctgg aggagcagta caacagcacg 420
 tacctgtggt tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 480
 aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 540
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 600
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 660
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 720
 tccgacggct ctttcttctt ctacagcaag ctaccctggg acaagagcag gtggcagcag 780
 gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cagcagaag 840
 agcctctccc tgctctccgg taaataa 867

<210> 41

<211> 774

<212> DNA

10

20

30

A-801B (PCT).ST25.txt

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptibodies capable of binding to Ang-2

<400> 41

atggacaaaa ctcacacatg tccaccttgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	60	
gttttcctct tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc	120	
acatgcgtgg tggtaggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	180	
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	240	10
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	300	
aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc	360	
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc	420	
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	480	
gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	540	
tccgacggct ctttcttctt ctacagcaag ctacacgtgg acaagagcag gtggcagcag	600	
gggaacgtct tctcargctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cacgcagaag	660	
agcctctccc tgtctccggg taaaggtgga ggtggtggtg cacagaaatt caaccgcgtg	720	
gacgagctgg aagagactct gtacgaacag ttactttttc aacagctcga gtaa	774	20

<210> 42

<211> 840

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptibodies capable of binding to Ang-2

<400> 42

atggacaaaa ctcacacatg tccaccttgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	60	30
gttttcctct tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc	120	
acatgcgtgg tggtaggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	180	
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	240	
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	300	
aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc	360	
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc	420	
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	480	
gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	540	40

A-801B (PCT).ST25.txt

tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	600
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctc acaaccacta cacgcagaag	660
agcctctccc tgtctccggg taaagggtga ggtgggtgtg cacagggatc cggttctgct	720
actggtggtt cgggtccac cgcaagctct ggttcaggca gtgcgactca taaattcaac	780
ccgctggacg aactggaaga aactctgtac gaacagttca cttccagca actcgagtaa	840

<210> 43

<211> 858

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> DNA encoding peptibodies capable of binding to Ang-2

<400> 43

atggacaaaa ctacacatg tccacctg cccagcactg aactcctggg gggaccgtca	60
gttttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc	120
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	240
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	300
aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc	360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc	420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	480
gagtgaggaga gcaatgggca gccggagAAC aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	540
tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	600
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctc acaaccacta cacgcagaag	660
agccctctcc tgtctccggg taaagggtga ggtgggtgtg cacagaaatt caaccgctg	720
gacgaactgg aagaaactct gtacgaacag ttcactttcc agcaggggtg tgggtgggtg	780
ggcggtggtg agttcaaccc actggatgag ctggaagaga ctctgtatga acagttcact	840
ttccagcaac tcgagtaa	858

<210> 44

<211> 756

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

30

A-801B (PCT).ST25.txt

<220>

<223> DNA encoding peptibodies capable of binding to Ang-2

<400> 44

```

atggacaaaa ctcacacatg tccaccttgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca    60
gttttctctt tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc    120
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg    180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg    240
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac    300
aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca gcccctatcg agaaaacat ctccaaagcc    360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc    420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg    480
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac    540
tccgacggct ctttcttctt ctacagcaag ctaccctggg acaagagcag gtggcagcag    600
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag    660
agcctctccc tgtctccggg taaaggtgga ggtggtggtg cacagcagga agaatgcgaa    720
tgggacccat ggacttgcga acacatgctc gagtaa                                756

```

10

<210> 45

<211> 822

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> DNA encoding peptibodies capable of binding to Ang-2

<400> 45

```

atggacaaaa ctcacacatg tccaccttgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca    60
gttttctctt tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc    120
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg    180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg    240
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac    300
aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca gcccctatcg agaaaacat ctccaaagcc    360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc    420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg    480
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac    540
tccgacggct ctttcttctt ctacagcaag ctaccctggg acaagagcag gtggcagcag    600
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag    660

```

30

40

A-801B (PCR).ST25.txt

```

agcctctccc tgtctccggg taaaggigga ggtggtggtg cacagggatc cggttctgct 720
actggtgggt cgggtccac cgcaagctct ggttcaggca gtgcgactca tcaggaagaa 780
tgcgaatggg acccatggac ttgcgaacac atgctcgagt aa 822

```

<210> 46
 <211> 864
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> DNA encoding peptibodies capable of binding to Ang-2

```

<400> 46
atggacaaaa ctcacacatg tccaccttgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 60
gttttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 120
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgctgg aggagcagta caacagcacg 240
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 300
aagtgcgaag tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctcaaagcc 360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 480
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 540
tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 600
gggaacgtct tctcatgtc cgtgatgcat gaggtcttgc acaaccacta cacgcagaag 660
agcctctccc tgtctccggg taaaggigga ggtggtggtg cacagcagga agaatgcgaa 720
tgggacccat ggacttgca acacatggga tccggttctg ctactggtgg ttccggctcc 780
accgcaagct ctggttcagg cagcgcgact catcaggaag aatgcgaatg ggacccatgg 840
acttgcaaac acatgctcga gtaa 864

```

20

30

<210> 47
 <211> 906
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptibodies capable of binding to Ang-2

A-801B (PCT).ST25.txt

```

<400> 47
atgggtgcac aggaagaatg cgaatgggac ccatggactt gcgaacacat ggggtggtggt    60
gggtggtggcg gtggtaaatt caaccgctg gacgaactgg aagaaactct gtacgaacag    120
ttcacttttc agcagggatc cggttctgct actggtggtt ccggctccac cgcaagctct    180
ggttcaggca gtgcgactca tctcgagggt ggaggcgggt gggacaaaac tcacacatgt    240
ccaccttgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag ttttcctctt cccccaaaa    300
cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc cctgagggtca catgctggtt ggtggacgtg    360
agccacgaag accctgagggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat    420
gccaaagaca agccgcggga ggagcagtag aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc    480
accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa    540
gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca    600
caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccagggt cagcctgacc    660
tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag    720
ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc    780
tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgtctc    840
gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt    900
aaataa                                           906

```

10

20

<210> 48

<211> 897

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptibodies capable of binding to Ang-2

```

<400> 48
atggacaaaa ctacacatg tccacctgac ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca    60
gttttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc    120
acatgcgtgg tggiggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg    180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg    240
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac    300
aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc    360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc    420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg    480
gagtgaggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac    540
tccgacggct cttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag    600

```

30

40

A-801B (PCT).ST25.txt

```

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 660
agcctctccc tgtctccggg taaaggtgga ggtggtggtg cacagggatc cggttctgct 720
actggtggtt ccggctccac cgcaagctct ggttcaggca gtgcgactca taaattcaac 780
ccgctggacg aactggaaga aactctgtac gaacagttca ctttccagca gggtaggtggc 840
ggtggtcagg aagaatgcga atgggaccca tggacttgcg aacacatgct cgagtaa 897

```

<210> 49

<211> 771

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> DNA encoding peptibodies capable of binding to Ang-2

<400> 49

```

atgggtgcac agttcgacta ctgcgaaggt gttgaagacc cgttcacttt cggttgcgac 60
aaccacctcg aggggtggagg cgggtggggac aaaactcaca catgtccacc ttgccagca 120
cctgaactcc tgggggggacc gtcagttttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 180
atgatctccc ggacccttga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 240
gaggtcaagt tcaactggtg cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg 300
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcttcaccgt cctgcaccag 360
gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 420
atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 480
ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc 540
ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 600
aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tctctacag caagctcacc 660
gtggacaaga gcagggtggc gcaggggaac gtcctctcat gctccgtgat gcatgaggct 720
ctgcacaacc actacagca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaata a 771

```

20

30

<210> 50

<211> 759

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> DNA encoding peptibodies capable of binding to Ang-2

A-801B (PCT).ST25.txt

<400> 50
 atgggtgcac agcagtagcg ttgcgacggt tttctgtacg gttgcatgat caacctcgag 60
 ggtggaggcg gtggggacaa aactcacaca tgtccacctt gccagcacc tgaactcctg 120
 gggggaccgt cagttttcct cttcccccca aaaccaagg acacctcat gatctcccg 180
 acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagacctga ggtcaagttc 240
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 300
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 360
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 420
 atctccaaag ccaaagggca gcccggagaa ccacaggtgt acacctgcc ccatcccg 480
 gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 540
 gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 600
 cccgtgctgg actccgacgg ctctttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 660
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 720
 tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataa 759

10

<210> 51

<211> 759

<212> DNA

20

<213> Artificial sequence

<220>

<223> DNA encoding peptibodies capable of binding to Ang-2

<400> 51
 atgggtgcac agaaacgccc atgcgaagaa atgtggggtg gttgcaacta cgacctcgag 60
 ggtggaggcg gtggggacaa aactcacaca tgtccacctt gccagcacc tgaactcctg 120
 gggggaccgt cagttttcct cttcccccca aaaccaagg acacctcat gatctcccg 180
 acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagacctga ggtcaagttc 240
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 300
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 360
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 420
 atctccaaag ccaaagggca gcccggagaa ccacaggtgt acacctgcc ccatcccg 480
 gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 540
 gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 600
 cccgtgctgg actccgacgg ctctttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 660
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 720
 tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataa 759

30

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<210> 52
 <211> 759
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<400> 52
 atgggtgcac agcaccagat ctgcaaatgg gacccgtgga cctgcaaaca ctggctcgag 60
 ggtggaggcg gtggggacaa aactcacaca tgtccacctt gccagcacc tgaactcctg 120
 gggggaccgt cagttttcct cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg 180
 acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 240
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 300
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 360
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 420
 atctccaag ccaaggaggca gccccgagaa ccacagggtgt acaccctgcc ccatccccgg 480
 gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 540
 gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 600
 cccgtgctgg actccgacgg ctctttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 660
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 720
 tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataa 759

20

<210> 53
 <211> 759
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> DNA encoding peptibodies capable of binding to Ang-2

<400> 53
 atgggtgcac agaaacgtcc atgcgaagaa atcttcggtg gttgcaccta ccagctcgag 60
 ggtggaggcg gtggggacaa aactcacaca tgtccacctt gccagcacc tgaactcctg 120
 gggggaccgt cagttttcct cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg 180
 acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 240
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 300

40

A-801B (PCT).ST25.txt

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat	360
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc	420
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg	480
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc	540
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct	600
cccgtgctgg actccgacgg ctctttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc	660
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac	720
tacacgcaga agagcctctc cctgtctcgg ggtaaataa	759

10

<210> 54

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide

<400> 54

cggcgcaact atcggtatca agctg

25

20

<210> 55

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide

<400> 55

catgtaccgt aacacigagt ttcgtc

26

30

<210> 56

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Consensus motifs generated from TN8-IX library

A-801B (PCT).ST25.txt

<220>

<221> misc_feature

<222> (7, 12 and)..(14)

<223> Xaa refers to any naturally occurring amino acid.

<400> 56

Lys Arg Pro Cys Glu Glu Xaa Trp Gly Gly Cys Xaa Tyr Xaa
 1 5 10

<210> 57

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

10

<220>

<223> Consensus motifs generated from TN8-IX library

<220>

<221> misc_feature

<222> (7, 12 and)..(14)

<223> Xaa refers to any naturally occurring amino acid.

20

<400> 57

Lys Arg Pro Cys Glu Glu Xaa Phe Gly Gly Cys Xaa Tyr Xaa
 1 5 10

<210> 58

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Consensus motifs generated from TN8-IX library

<220>

<221> misc_feature

<222> (1, 2, 3, 5 and)..(13)

<223> Xaa refers to any naturally occurring amino acid.

A-801B (PCT).ST25.txt

<400> 58

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu Xaa Met
 1 5 10

<210> 59

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Consensus motif generated from TN12-I library

<220>

<221> misc_feature

<222> (3, 8, 10-14 and)..(18)

<223> xaa refers to any naturally occurring amino acid.

<400> 59

Trp Ser Xaa Cys Ala Trp Phe Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Arg
 1 5 10 15

20

Arg Xaa

<210> 60

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Human Fc IgG1

<400> 60

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

40

A-801B (PCT).ST25.txt

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

10

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

20

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 61

30

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Consensus motifs generated from TN8-IX library

<220>

<221> misc_feature

A-801B (PCT).ST25.txt
 <222> (1-3, 5, 7, 12, 13 and)..(14)

<223> Xaa refers to any naturally occurring amino acid.

<400> 61

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Asp Xaa Tyr Trp Tyr Cys Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 62

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

10

<220>

<223> Consensus motifs generated from TN8-IX library

<220>

<221> misc_feature

<222> (1-3, 5, 7, 12, 13 and)..(14)

<223> xaa refers to any naturally occurring amino acid.

20

<400> 62

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Asp Xaa Tyr Thr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 63

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

30

<220>

<223> Consensus motifs generated from TN8-IX library

<220>

<221> misc_feature

<222> (1-3, 5, 7, 12, 13 and)..(14)

<223> Xaa refers to any naturally occurring amino acid.

<400> 63

40

A-801B (PCT).ST25.txt

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Asp Xaa Phe Trp Tyr Cys Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 64

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

10

<223> Consensus motifs generated from TN8-IX library

<220>

<221> misc_feature

<222> (1-3, 5, 7, 12, 13 and)..(14)

<223> Xaa refers to any naturally occurring amino acid.

<400> 64

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Asp Xaa Phe Thr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

20

<210> 65

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 65

30

Trp Asp Pro Trp Thr
 1 5

<210> 66

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

A-801B (PCT).ST25.txt
 <223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 66

Trp Asp Pro Trp Thr Cys
 1 5

<210> 67

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

10

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is an acidic or neutral polar amino acid residue

<400> 67

20

Cys Xaa Trp Asp Pro Trp Thr
 1 5

<210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is an acidic or neutral polar amino acid residue

<400> 68

Cys Xaa Trp Asp Pro Trp Thr Cys
 1 5

A-801B (PCT).ST25.txt

<210> 69
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2
<220> 10
<221> misc_feature
<222> (1, 2 and)..(3)
<223> Xaa are each independent amino acid residues.

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa is an amino acid residue.
20

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> Xaa is absent or an amino acid residue.

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> Xaa is absent or a neutral hydrophobic, neutral polar, or a basic amino acid residue. 30

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> Xaa is a neutral hydrophobic or neutral polar amino acid residue.

<400> 69
Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Trp Asp Pro Trp Thr Cys Xaa Xaa Xaa 40

1 5 A-801B (PCT).ST25.txt
10

<210> 70
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2 10
<220>
<221> misc_feature
<222> (1 and)..(15)
<223> Xaa is absent or an amino acid residue.

<220>
<221> misc_feature
<222> (2 and)..(16)
<223> Xaa is absent or a neutral hydrophobic, neutral polar, or a basic amino acid residue. 20

<220>
<221> misc_feature
<222> (3-6, 18, 19 and)..(20)
<223> Xaa are each independently absent or amino acid residues.

<220>
<221> misc_feature 30
<222> (8)..(8)
<223> Xaa is an amino acid residue.

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> Xaa is absent or a neutral hydrophobic or neutral polar amino acid residue.

A-801B (PCT).ST25.txt

<400> 70

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Trp Asp Pro Trp Thr Cys Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa
20

<210> 71

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> xaa is a neutral hydrophobic amino acid residue.

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is a A, D, or E.

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is an acidic amino acid residue.

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is an amino acid residue.

<220>

A-801B (PCT).ST25.txt

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> xaa is a neutral hydrophobic, neutral polar, or basic amino acid residue.

<400> 71

Pro	Xaa	Asp	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Tyr
1				5					10

<210> 72

10

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (1, 4 and)..(20)

20

<223> xaa is absent, or an amino acid residue.

<220>

<221> misc_feature

<222> (2, 15, 16 and)..(21)

<223> Xaa is absent, or a neutral polar, acidic, or a basic amino acid residue.

<220>

30

<221> misc_feature

<222> (3, 17 and)..(18)

<223> Xaa is absent, or a neutral hydrophobic, or neutral polar amino acid residue.

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<223> Xaa is a neutral hydrophobic amino acid residue.

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is a A, D, or E.

<220>

10

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is an acidic amino acid residue.

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> Xaa is an amino acid residue.

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Xaa is a neutral hydrophobic, neutral polar, or basic amino acid residue.

<220>

<221> misc_feature

<222> (19 and)..(22)

<223> Xaa is absent, or a neutral hydrophobic, neutral polar, or basic amino acid residue.

30

<400> 72

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Pro	Xaa	Asp	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Tyr	Xaa	Xaa
1				5				10						15	

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
					20

<210> 73

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2
<220>
<221> misc_feature 10
<222> (3)..(3)
<223> Xaa is a neutral polar amino acid residue.

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa is an acidic amino acid residue.

<220> 20
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa is a neutral polar or an acidic amino acid residue.

<220>
<221> misc_feature
<222> (6 and)..(7)
<223> Xaa is a neutral hydrophobic amino acid residue. 30

<400> 73
Arg Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly
1 5

<210> 74
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

A-801B (PCT).ST25.txt

<220>
<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2
<220>
<221> misc_feature
<222> (1, 2, 4, 13, 14, 19 and)..(20)
<223> xaa is a neutral hydrophobic or neutral polar amino acid residue.

<220> 10
<221> misc_feature
<222> (3, 9 and)..(17)
<223> xaa is a neutral polar or acidic amino acid residue.

<220>
<221> misc_feature
<222> (7, 15 and)..(16)
<223> xaa is a neutral polar amino acid residue. 20

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> xaa is an acidic amino acid residue.

<220>
<221> misc_feature
<222> (10 and)..(11) 30
<223> xaa is a neutral hydrophobic amino acid residue.

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> xaa is a neutral hydrophobic or basic amino acid residue.

<400> 74 40

A-801B (PCT).ST25.txt

Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa
 20

<210> 75

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> xaa is an acidic amino acid residue;

<220>

20

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> xaa is a neutral hydrophobic amino acid residue.

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> xaa is E, D, or Q.

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> xaa is a neutral hydrophobic or neutral polar amino acid residue.

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<223> Xaa is an acidic residue.

<400> 75

Cys Xaa Gly Xaa Xaa Asp Pro Phe Thr Xaa Gly Cys Xaa
1 5 10

<210> 76

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 76

Pro Ile Arg Gln Glu Glu Cys Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1 5 10 15

Met Trp Glu Val
20

20

<210> 77

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 77

Thr Asn Ile Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His
1 5 10 15

30

Met Pro Gly Lys
20

<210> 78

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

A-801B (PCT).ST25.txt

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 78

Trp Tyr Glu Gln Asp Ala Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Ala Glu Val
 20

<210> 79

10

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 79

Asn Arg Leu Gln Glu Val Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

20

Met Glu Asn Val
 20

<210> 80

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 80

Ala Ala Thr Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

30

Met Pro Arg Ser
 20

<210> 81

<211> 20

<212> PRT

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 81

Leu Arg His Gln Glu Gly Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Phe Asp Trp
 20

10

<210> 82

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 82

20

Val Pro Arg Gln Lys Asp Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Tyr Val Gly
 20

<210> 83

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 83

Ser Ile Ser His Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Gln Val Gly
 20

<210> 84

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 84

Trp Ala Ala Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

10

Met Gly Arg Met
 20

<210> 85

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 85

Thr Trp Pro Gln Asp Lys Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Gly Ser Thr
 20

<210> 86

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 86

Gly His Ser Gln Glu Glu Cys Gly Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Gly Thr Ser

40

A-801B (PCT).ST25.txt

20

<210> 87

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

10

<400> 87

Gln His Trp Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His
 1 5 10 15

Met Pro Ser Lys
 20

<210> 88

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 88

Asn Val Arg Gln Glu Lys Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Pro Val Arg
 20

<210> 89

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 89

Lys Ser Gly Gln Val Glu Cys Asn Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His

40

1 5 A-801B (PCT).ST25.txt 10 15

Met Pro Arg Asn
20

<210> 90
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2
<400> 90

Val Lys Thr Gln Glu His Cys Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1 5 10 15

Met Arg Glu Trp
20

<210> 91
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2
<400> 91

Ala Trp Gly Gln Glu Gly Cys Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1 5 10 15

Met Leu Pro Met
20

<210> 92
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

10

20

30

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<400> 92

Pro Val Asn Gln Glu Asp Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Pro Pro Met
 20

<210> 93

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 93

Arg Ala Pro Gln Glu Asp Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His
 1 5 10 15

Met Asp Ile Lys
 20

20

<210> 94

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 94

His Gly Gln Asn Met Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

30

Met Phe Arg Tyr
 20

<210> 95

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

A-801B (PCT).ST25.txt

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 95

Pro Arg Leu Gln Glu Glu Cys Val Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1 5 10 15

Met Pro Leu Arg
20

<210> 96

10

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 96

Arg Thr Thr Gln Glu Lys Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1 5 10 15

20

Met Glu Ser Gln
20

<210> 97

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 97

Gln Thr Ser Gln Glu Asp Cys Val Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His
1 5 10 15

30

Met Val Ser Ser
20

<210> 98

<211> 20

<212> PRT

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 98

Gln Val Ile Gly Arg Pro Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Leu Glu Gly Leu
 20

10

<210> 99

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 99

20

Trp Ala Gln Gln Glu Glu Cys Ala Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His
 1 5 10 15

Met Val Gly Leu
 20

<210> 100

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 100

Leu Pro Gly Gln Glu Asp Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Val Arg Ser
 20

<210> 101

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 101

Pro Met Asn Gln Val Glu Cys Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

10

Met Pro Arg Ser
 20

<210> 102

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 102

Phe Gly Trp Ser His Gly Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Gly Ser Thr
 20

<210> 103

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 103

Lys Ser Thr Gln Asp Asp Cys Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Val Gly Pro

40

A-801B (PCT).ST25.txt

20

<210> 104

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

10

<400> 104

Gly Pro Arg Ile Ser Thr Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Asp Gln Leu
 20

<210> 105

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 105

Ser Thr Ile Gly Asp Met Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His
 1 5 10 15

Met Gln Val Asp
 20

<210> 106

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 106

Val Leu Gly Gly Gln Gly Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu

40

A-801B (PCT).ST25.txt

10

20

30

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<400> 109

Thr Lys Gly Lys Ser Val Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His
1 5 10 15

Met Gln Ser Gly
20

<210> 110

<211> 20

<212> PRT

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 110

Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His
1 5 10 15

Met Gln Gly Gly
20

20

<210> 111

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 111

Trp Val Asn Glu Val Val Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asn His
1 5 10 15

30

Trp Asp Thr Pro
20

<210> 112

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

A-801B (PCT).ST25.txt

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 112

Val Val Gln Val Gly Met Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Lys His
 1 5 10 15

Met Arg Leu Gln
 20

<210> 113

10

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 113

Ala Val Gly Ser Gln Thr Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His
 1 5 10 15

20

Leu Val Glu Val
 20

<210> 114

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 114

Gln Gly Met Lys Met Phe Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His
 1 5 10 15

30

Ile Val Tyr Arg
 20

<210> 115

<211> 20

<212> PRT

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 115

Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15

Met Gln Gly Gly
 20

10

<210> 116

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 116

20

Thr Ser Gln Arg Val Gly Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln His
 1 5 10 15

Leu Thr Tyr Thr
 20

<210> 117

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 117

Gln Trp Ser Trp Pro Pro Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln Thr
 1 5 10 15

Val Trp Pro Ser
 20

<210> 118

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 118

Gly Thr Ser Pro Ser Phe Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His
 1 5 10 15

10

Met Val Gln Gly
 20

<210> 119

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 119

Gln Asn Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Ala Thr Leu Tyr Glu His
 1 5 10 15

Phe Ile Phe His Tyr Thr
 20

<210> 120

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 120

Leu Asn Phe Thr Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln Gln Ser

40

A-801B (PCT).ST25.txt

20

<210> 121

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

10

<400> 121

Thr Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln His Gln
 20

<210> 122

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 122

Val Lys Phe Lys Pro Leu Asp Ala Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu His
 1 5 10 15

Trp Met Phe Gln Gln Ala
 20

<210> 123

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 123

Val Lys Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Ile Leu Tyr Glu Gln

40

1 5 A-801B (PCT).ST25.txt 15
10

Gln Thr Phe Gln Glu Arg
20

<210> 124

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 124

Thr Asn Phe Met Pro Met Asp Asp Leu Glu Gln Arg Leu Tyr Glu Gln
1 5 10 15

Phe Ile Leu Gln Gln Gly
20

<210> 125

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 125

Ser Lys Phe Lys Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln His Ala
20

30

<210> 126

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<400> 126

Gln Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15

Phe Met Leu Gln Gln Ala
 20

<210> 127

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 127

Gln Asn Phe Lys Pro Met Asp Glu Leu Glu Asp Thr Leu Tyr Lys Gln
 1 5 10 15

Phe Leu Phe Gln His Ser
 20

20

<210> 128

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 128

Tyr Lys Phe Thr Pro Leu Asp Asp Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15

30

Trp Thr Leu Gln His Val
 20

<210> 129

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

A-801B (PCT).ST25.txt

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 129

Gln Glu Tyr Glu Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Thr Leu Tyr Asn Gln
 1 5 10 15

Trp Met Phe His Gln Arg
 20

<210> 130

10

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 130

Ser Asn Phe Met Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15

20

Phe Met Leu Gln His Gln
 20

<210> 131

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 131

Gln Lys Tyr Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Lys Thr Leu Tyr Asp Gln
 1 5 10 15

30

Phe Met Leu Gln Gln Gly
 20

<210> 132

<211> 22

<212> PRT

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 132

Gln Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Lys Gln
 1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln Gln Arg
 20

10

<210> 133

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 133

20

Val Lys Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Trp Leu Tyr His Gln
 1 5 10 15

Phe Thr Leu His His Gln
 20

<210> 134

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 134

Gln Lys Phe Met Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Ile Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15

Phe Met Phe Gln Gln Ser
 20

<210> 135

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 135

Gln Thr Phe Gln Pro Leu Asp Asp Leu Glu Glu Tyr Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15

10

Trp Ile Arg Arg Tyr His
 20

<210> 136

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 136

Glu Asp Tyr Met Pro Leu Asp Ala Leu Asp Ala Gln Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15

Phe Ile Leu Leu His Gly
 20

<210> 137

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 137

His Thr Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Tyr Gln
 1 5 10 15

Trp Leu Tyr Asp Gln Leu

40

A-801B (PCT).ST25.txt

20

<210> 138

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

10

<400> 138

Tyr Lys Phe Asn Pro Met Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Glu
 1 5 10 15

Phe Leu Phe Gln His Ala
 20

<210> 139

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 139

Thr Asn Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Ala Thr Leu Tyr Glu His
 1 5 10 15

Trp Ile Leu Gln His Ser
 20

<210> 140

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 140

Gln Lys Phe Lys Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln

40

1 5 A-801B (PCT).ST25.txt 15
10

Trp Thr Leu Gln Gln Arg
20

<210> 141

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 141

Thr Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln Gln Arg
20

<210> 142

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 142

Thr Asn Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln Gln Arg
20

30

<210> 143

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> polypeptide capable of binding to Ang-2

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<400> 143

Ala Gly Gly Met Arg Pro Tyr Asp Gly Met Leu Gly Trp Pro Asn Tyr
 1 5 10 15

Asp Val Gln Ala
 20

<210> 144

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 144

Gln Thr Trp Asp Asp Pro Cys Met His Ile Leu Gly Pro Val Thr Trp
 1 5 10 15

Arg Arg Cys Ile
 20

20

<210> 145

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 145

Ala Pro Gly Gln Arg Pro Tyr Asp Gly Met Leu Gly Trp Pro Thr Tyr
 1 5 10 15

30

Gln Arg Ile Val
 20

<210> 146

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

A-801B (PCT).ST25.txt

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 146

Ser Gly Gln Leu Arg Pro Cys Glu Glu Ile Phe Gly Cys Gly Thr Gln
 1 5 10 15

Asn Leu Ala Leu
 20

<210> 147

10

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 147

Phe Gly Asp Lys Arg Pro Leu Glu Cys Met Phe Gly Gly Pro Ile Gln
 1 5 10 15

20

Leu Cys Pro Arg
 20

<210> 148

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> polypeptide capable of binding to Ang-2

30

<400> 148

Gly Gln Asp Leu Arg Pro Cys Glu Asp Met Phe Gly Cys Gly Thr Lys
 1 5 10 15

Asp Trp Tyr Gly
 20

<210> 149

<211> 20

<212> PRT

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 149

Gly Phe Glu Tyr Cys Asp Gly Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
 1 5 10 15

Asp Lys Gln Thr
 20

10

<210> 150

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 150

Lys Leu Glu Tyr Cys Asp Gly Met Glu Asp Pro Phe Thr Gln Gly Cys
 1 5 10 15

Asp Asn Gln Ser
 20

20

<210> 151

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 151

Leu Gln Glu Trp Cys Glu Gly Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
 1 5 10 15

Glu Lys Gln Arg
 20

<210> 152

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 152

Ala Gln Asp Tyr Cys Glu Gly Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
 1 5 10 15

10

Glu Met Gln Lys
 20

<210> 153

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 153

Leu Leu Asp Tyr Cys Glu Gly Val Gln Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
 1 5 10 15

Glu Asn Leu Asp
 20

<210> 154

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 154

His Gln Glu Tyr Cys Glu Gly Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
 1 5 10 15

Glu Tyr Gln Gly

40

20

A-801B (PCT).ST25.txt

<210> 155

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

10

<400> 155

Met Leu Asp Tyr Cys Glu Gly Met Asp Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
1 5 10 15Asp Lys Gln Met
20

<210> 156

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 156

Leu Gln Asp Tyr Cys Glu Gly Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
1 5 10 15Glu Asn Gln Arg
20

<210> 157

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

<400> 157

Leu Gln Asp Tyr Cys Glu Gly Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys

40

A-801B (PCT).ST25.txt
10

10

20

30

```
<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
```

<223> Xaa is E, D, or Q. A-801B (PCT).ST25.txt

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> Xaa is a neutral hydrophobic, neutral polar, or a basic amino acid residue.

<220>

10

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> Xaa is absent or an amino acid residue.

<400> 158

Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Gly Xaa Xaa Asp Pro Phe Thr Xaa Gly Cys
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa
20

20

<210> 159

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 159

ccgatccgtc aggaagaatg cgactgggac ccgtggacct gcgaacacat gtgggaagtt 60

30

<210> 160

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 160

A-801B (PCT).ST25.txt
accaacatcc aggaagaatg cgaatgggac ccgtggacct gcgaccacat gccgggtaaa 60

<210> 161

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2 10

<400> 161

tggtacgaac aggacgcttg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat ggctgaagtt 60

<210> 162

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2 20

<400> 162

aaccgtctgc aggaagtttg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat ggaaaacgtt 60

<210> 163

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2 . 30

<400> 163

gctgctaccc aggaagaatg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat gccgcgttcc 60

<210> 164

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

A-801B (PCT).ST25.txt

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 164

ctgcgtcacc aggaagggtg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat gttcgactgg 60

<210> 165

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 165

gttccgcgtc agaaagactg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat gtacgttggt 60

<210> 166

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 166

tgggctgctc aggaagaatg cgaatgggat ccgtggacct gcgaacacat gggtcgtatg 60

<210> 167

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 167

acttgccgc aggacaaatg cgaatgggat ccgtggacct gcgaacacat gggttctact 60

<210> 168

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

A-801B (PCT).ST25.txt

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 168
ggtcactccc aggaagaatg cggttgggac ccgtggacct gcgaacacat gggtagctcc 60

<210> 169

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 169
cagcactggc aggaagaatg cgaatgggac ccgtggacct gcgaccacat gccgtccaaa 60

<210> 170

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 170
aacgttcgtc aggaaaaatg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat gccggttcgt 60

<210> 171

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 171
aaatccggtc aggttgaatg caactgggac ccgtggacct gcgaacacat gccgcgtaac 60

<210> 172

<211> 60

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 172
gttaaaaccc aggaacactg cgactgggac ccgtggacct gcgaacacat gcgtgaatgg 60

<210> 173

10

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 173
gcttggggtc aggaagggtg cgactgggac ccgtggacct gcgaacacat gctgccgatg 60

<210> 174

20

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 174
ccggttaacc aggaagactg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat gccgccgatg 60

<210> 175

30

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 175
cgtgctccgc aggaagactg cgaatgggac ccgtggacct gcgctcacat ggacatcaaa 60

A-801B (PCT).ST25.txt

<210> 176

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 176

cacggtcaga acatggaatg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat gttccgttac 60

10

<210> 177

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 177

ccgcgtctgc aggaagaatg cgtttgggac ccgtggacct gcgaacacat gccgctgcgt 60

20

<210> 178

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 178

cgtaccaccc aggaaaaatg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat ggaatcccag 60

30

<210> 179

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<400> 179
cagacctccc aggaagactg cgtttgggac ccgtggacct gcgaccacat ggtttcctcc 60

<210> 180

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 180
cagggttatcg gtcgtccgtg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacct ggaaggctctg 60

<210> 181

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 181
tggggtcagc aggaagaatg cgcttgggac ccgtggacct gcgaccacat ggttggctctg 60

<210> 182

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 182
ctgccgggtc aggaagactg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat ggttcgttcc 60

<210> 183

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial sequence

A-801B (PCT).ST25.txt

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2 .

<400> 183

ccgatgaacc aggttgaatg cgactgggac ccgtggacct gcgaacacat gccgcgttcc 60

<210> 184

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 184

ttcgttggc ctcacggtg cgaatgggat ccgtggacct gcgaacacat gggttctacc 60

<210> 185

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 185

aatccacc aggacgactg cgactgggac ccgtggacct gcgaacacat ggttggtccg 60

<210> 186

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 186

ggccgcgta tctccacctg ccagtgggac ccgtggacct gcgaacacat ggaccagctg 60

<210> 187

<211> 60

<212> DNA

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 187
tccaccatcg gtgacatgtg cgaatgggac ccgtggacct gcgctcacat gcagggttgac 60

<210> 188

<211> 60

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 188
gttctgggtg gtcagggttg cgaatgggac ccgtggacct gccgtctgct gcagggttgg 60

<210> 189

<211> 60

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 189
gttctgggtg gtcagggttg ccagtgggac ccgtggacct gctccacact ggaagacggt 60

<210> 190

<211> 60

30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 190
accaccaicg gttccatgtg cgaatgggac ccgtggacct gcgctcacat gcagggtggt 60

<210> 191

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2
<400> 191
accaaaggta aatccgtttg ccagtgggac ccgtggacct gctcccacat gcagtccggt 60 10

<210> 192
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2
<400> 192
accaccatcg gttccatgtg ccagtgggac ccgtggacct gcgctcacat gcagggtggt 60 20

<210> 193
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2
<400> 193
tgggttaacg aagttgtttg cgaatgggac ccgtggacct gcaaccactg ggacacccccg 60 30

<210> 194
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2
<400> 194 40

A-801B (PCT).ST25.txt
gttgttcagg ttggtatgtg ccagtgggac ccgtggacct gcaaacacat gcgtctgcag 60

<210> 195

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2 10

<400> 195
gctgttggtt cccagacctg cgaatgggac ccgtggacct gcgtcacct ggttgaagtt 60

<210> 196

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2 20

<400> 196
cagggtatga aaatgttctg cgaatgggac ccgtggacct gcgtcacat cgtttaccgt 60

<210> 197

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2 30

<400> 197
accaccatcg gttccatgtg ccagtgggac ccgtggacct gcgaacacat gcagggtggt 60

<210> 198

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 198
acctcccagc gtgttggttg cgaatgggac ccgtggacct gccagcacct gacctacacc 60

<210> 199

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 199
cagtggctct ggccgccgtg cgaatgggac ccgtggacct gccagaccgt ttggccgtcc 60

<210> 200

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 200
ggtagctccc cgtccttctg ccagtgggac ccgtggacct gctccacat gggtcagggt 60

<210> 201

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 201
caggaagaat gcgaatggga cccatggact tgcaacaca tg 42

<210> 202

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 202
cagaactaca aaccgctgga cgaactggac gctaccctgt acgaacactt catcttccac 60
tacacc 66

<210> 203

<211> 66

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 203
ctgaacttca ccccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag 60
cagttcc 66

<210> 204

<211> 66

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 204
accaaattca acccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag 60
caccag 66

30

<210> 205

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 205

40

A-801B (PCT).ST25.txt
 gttaaattca aaccgctgga cgctctggaa cagaccctgt acgaacactg gatgttccag 60
 caggct 66

<210> 206

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 206
 gttaaataca aaccgctgga cgaactggac gaaatcctgt acgaacagca gaccctccag 60
 gaacgt 66

<210> 207

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 207
 accaacttca tgccgatgga cgacctggaa cagcgtctgt acgaacagtt catcctgcag 60
 cagggt 66

<210> 208

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 208
 tccaaattca aaccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag 60
 cagcgt 66

<210> 209

<211> 66

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 209
 cagaaattcc agccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtt catgctgcag 60
 caggct 66

10

<210> 210

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 210
 cagaacttca aaccgatgga cgaattggaa gacaccctgt acaaacagtt cctgttccag 60
 cactcc 66

20

<210> 211

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 211
 taaaaattca ccccgctgga cgacctggaa cagaccctgt acgaacagtg gacctgcag 60
 caggtt 66

30

<210> 212

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 212
 aggaatacga accgctggac gaactggacg aaaccctgta caaccagtgg atgttcacc 60
 agcgt 65

<210> 213

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 213
 tccaacttca tgccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtt catgctgcag 60
 caccag 66

<210> 214

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 214
 cagaaatacc agccgctgga cgaactggac aaaaccctgt acgatcagtt catgctgcag 60
 cagggt 66

<210> 215

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 215
 cagaaattcc agccgctgga cgaactggaa gaaaccctgt acaaacagtg gaccctgcag 60
 cagcgt 66

A-801B (PCT).ST25.txt

<210> 216
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 216 10
 gttaaataca aaccgctgga cgaactggac gaatggctgt accaccagtt caccctgcac 60
 caccag 66

<210> 217
 <211> 67
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2 20

<400> 217
 cagaaattca tgccgctgga cgaactggac gaaatcctgt acgaacagtt catgttccag 60
 cagtccc 67

<210> 218
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220> 30
 <223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 218
 cagaccttcc agccgctgga cgacctggaa gaatacttgt acgaacagtg gatccgtcgt 60
 taccac 66

<210> 219
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 40

A-801B (PCT).ST25.txt

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 219
gaagactaca tgccgctgga cgctctggac gctcagctgt acgaacagtt catcctgctg 60
cacggt 66

<210> 220

<211> 66

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 220
cacaccttcc agccgctgga cgaactggaa gaaaccctgt actaccagtg gctgtacgac 60
cagctg 66

<210> 221

<211> 66

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 221
tacaaattca acccgatgga cgaactggaa cagaccctgt acgaagaatt cctgttccag 60
cacgct 66

30

<210> 222

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 222

40

A-801B (PCT).ST25.txt

accactaca aaccgctgga cgaactggac gctaccctgt acgaacactg gatcctgcag 60
cactcc 66

<210> 223

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 223
cagaaattca aaccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag 60
cagcgt 66

<210> 224

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 224
accacttcc agccgctgga cgaactggac cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag 60
cagcgt 66

<210> 225

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 225
accacttcc agccgctgga cgaactggac cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag 60
cagcgt 66

<210> 226

<211> 60

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 226
aaattcaacc cgctggacga gctggaagag actctgtacg aacagtttac ttccaacag 60

<210> 227

10

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 227
gctgggtgga tgcgtccgta cgacggtatg ctgggttggc cgaactacga cgttcaggct 60

<210> 228

20

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 228
cagacttggg acgatccgtg catgcacatt ctgggtccgg ttacttggcg tcgttgcac 60

<210> 229

30

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 229
gctccgggtc agcgtccgta cgacggtatg ctgggttggc cgacctacca gcgtatcggt 60

A-801B (PCT).ST25.txt

<210> 230

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 230
tccggtcagc tgcgtccgtg cgaagaaatc ttcggttgcg gtaccagaa cctggctctg 60

10

<210> 231

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 231
ttcggtgaca aacgtccgct ggaatgcatg ttcggtggtc cgatccagct gtgcccgcgt 60

20

<210> 232

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 232
ggtcaggacc tgcgtccgtg cgaagacatg ttcggttgcg gtaccaaaga ctggtacggt 60

30

<210> 233

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<400> 233
ggtttcgaat actgcgacgg tatggaagac ccgttcacct tcggttgca caaacagacc 60

<210> 234

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 234
aaactggaat actgcgacgg tatggaagac ccgttcaccc agggttgca caaccagtcc 60

<210> 235

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 235
ctgcaggaat ggtgcgaagg tggtgaagac ccgttcacct tcggttgca aaaacagcgt 60

<210> 236

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 236
gctcaggact actgcgaagg tatggaagac ccgttcacct tcggttgca aatgcagaaa 60

<210> 237

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

A-801B (PCT).ST25.txt

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 237

ctgctggact actgcgaagg tggtcaggac ccgttcacct tcggttgcca aaacctggac 60

<210> 238

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 238

caccaggaat actgcgaagg tatggaagac ccgttcacct tcggttgcca ataccagggc 60

<210> 239

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 239

atgctggact actgcgaagg tatggacgac ccgttcacct tcggttgcca caaacagatg 60

<210> 240

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 240

ctgcaggact actgcgaagg tggtgaagac ccgttcacct tcggttgcca aaaccagcgt 60

<210> 241

<211> 60

<212> DNA

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 241
 ctgcaggact actgcgaagg tgttgaagac ccgttcacct tcggttgcca aaaacagcgt 60

<210> 242

<211> 54

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 242
 ttcgactact gcgaaggtgt tgaagacccg ttcactttcg gctgtgataa ccac 54

<210> 243

<211> 250

20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding peptide capable of binding to Ang-2

<400> 243

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 20 25 30

30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

40

85

95

10

20

Asn Ser Asp Cys Glu Cys Cys Arg Arg Asn
245 250

<210> 244

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

 $\langle 220 \rangle$

<223> oligonucleotide

<400> 244

<400> 244
caaacgaatg gatcctcatt aaagccaga

29

<210> 245

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<220>

<223> oligonucleotide

<400> 245

ggtggtgcgg ccgcactcga gactgttgaa agttgttttag ca 42

<210> 246

<211> 29

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide

<400> 246

caaacgaatg gatactcatt aaagccaga 29

<210> 247

<211> 43

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide

<400> 247

aacacaaaag tgcacagggt ggaggtggtg gtgcggccgc act 43

<210> 248

<211> 91

<212> PRT

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide

<400> 248

Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn
1 5 10 15

Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn

40

10

20

30

<210>	250
<211>	95
<212>	PRT
<213>	Artificial Sequence

A-801B (PCT).ST25.txt

<220>

<223> oligonucleotide

<400> 250

Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn
 1 5 10 15

Asn Lys Ala Ala Lys Thr Thr Lys Ala Ala Lys Cys Cys Lys Cys Thr
 20 25 30

Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys Cys Thr Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys
 35 40 45

10

Ala Cys Lys Cys Thr Lys Thr Ala Lys Gly Ala Lys Cys Ala Lys Thr
 50 55 60

Thr Lys Ala Cys Lys Thr Thr Lys Cys Ala Lys Cys Ala Lys Asn Asn
 65 70 75 80

Lys Cys Ala Thr Thr Cys Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr
 85 90 95

<210> 251

<211> 91

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> oligonucleotide

<400> 251

Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn
 1 5 10 15

Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Cys Ala Lys Gly Ala Lys Gly Ala
 20 25 30

30

Lys Thr Gly Cys Gly Ala Lys Thr Gly Lys Gly Ala Lys Cys Cys Lys
 35 40 45

Thr Gly Lys Ala Cys Lys Thr Gly Cys Gly Ala Lys Cys Ala Lys Ala
 50 55 60

Thr Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Cys Ala Thr Thr Cys
 65 70 75 80

Thr cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala

40

A-801B (PCT).ST25.txt
90

85

<210> 252
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide

10

<400> 252

Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn
 1 5 10 15
 Asn Lys Thr Thr Lys Gly Ala Lys Thr Ala Lys Asn Asn Lys Gly Ala
 20 25 30
 Lys Gly Gly Lys Gly Thr Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys Cys Cys Lys
 35 40 45
 Thr Thr Lys Ala Cys Lys Thr Thr Lys Gly Gly Lys Asn Asn Lys Gly
 50 55 60
 Ala Lys Ala Ala Lys Cys Ala Lys Asn Asn Lys Cys Ala Thr Thr Cys
 65 70 75 80
 Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr
 85

20

<210> 253
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> oligonucleotide

<400> 253

Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn
 1 5 10 15
 Asn Lys Ala Ala Lys Thr Thr Lys Ala Ala Lys Cys Cys Lys Cys Thr
 20 25 30
 Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys Cys Thr Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys

40

<210>	254		10
<211>	15		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	oligonucleotide		
<400>	254		
cacagtgcac aggggt		15	
<210>	255		20
<211>	16		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	oligonucleotide		
<400>	255		
tgatctcgag agaatg		16	
<210>	256		30
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	oligonucleotide		
<400>	256		
gttagctcac tcattaggca c		21	

A-801B (PCT).ST25.txt

<210> 257

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide

<400> 257

gtaccgtaac actgagtttc g

21

10

<210> 258

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide

<400> 258

ttacacttta tgcttcg

18

20

<210> 259

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

30

<400> 259

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Pro Ile Arg Gln Glu Glu Cys
1 5 10 15

Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Trp Glu Val Leu Glu

40

20

A-801B (PCT).ST25.txt
25 30

<210> 260

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 260

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Asn Ile Gln Glu Glu Cys
1 5 10 15Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His Met Pro Gly Lys Leu Glu
20 25 30

20

<210> 261

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 261

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Tyr Glu Gln Asp Ala Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Ala Glu Val Leu Glu

40

20

A-801B (PCT).ST25.txt
25 30

<210> 262

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 262

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Asn Arg Leu Gln Glu Val Cys
1 5 10 15Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Glu Asn Val Leu Glu
20 25 30

20

<210> 263

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 263

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Ala Thr Gln Glu Glu Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Arg Ser Leu Glu

40

20

A-801B (PCT).ST25.txt
25 30

<210> 264

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 264

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Arg His Gln Glu Gly Cys
1 5 10 15Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Phe Asp Trp Leu Glu
20 25 30

20

<210> 265

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 265

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Pro Arg Gln Lys Asp Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Tyr Val Gly Leu Glu

40

20

A-801B (PCT).ST25.txt
25 30

<210> 266

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 266

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ser Ile Ser His Glu Glu Cys
1 5 10 15Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gln Val Gly Leu Glu
20 25 30

20

<210> 267

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 267

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Ala Ala Gln Glu Glu Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Arg Met Leu Glu

40

20

A-801B (PCT).ST25.txt
25 30

<210> 268

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 268

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Trp Pro Gln Asp Lys Cys
1 5 10 15Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Ser Thr Leu Glu
20 25 30

20

<210> 269

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 269

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly His Ser Gln Glu Glu Cys
1 5 10 15Gly Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Thr Ser Leu Glu
Page 110

40

20

A-801B (PCT).ST25.txt
25 30

<210> 270

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 270

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln His Trp Gln Glu Glu Cys
1 5 10 15Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His Met Pro Ser Lys Leu Glu
20 25 30

20

<210> 271

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 271

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Asn Val Arg Gln Glu Lys Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Val Arg Leu Glu

40

20 A-801B (PCT).ST25.txt 30
25

<210> 272

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 272

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Ser Gly Gln Val Glu Cys
1 5 10 15

Asn Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Arg Asn Leu Glu
20 25 30

20

<210> 273

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 273

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Lys Thr Gln Glu His Cys
1 5 10 15

Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Arg Glu Trp Leu Glu

40

20

A-801B (PCT).ST25.txt
25 30

<210> 274

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 274

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Trp Gly Gln Glu Gly Cys
1 5 10 15Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Leu Pro Met Leu Glu
20 25 30

20

<210> 275

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 275

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Pro Val Asn Gln Glu Asp Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Pro Met Leu Glu

40

20

A-801B (PCT).ST25.txt
25 30

<210> 276

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 276

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Arg Ala Pro Gln Glu Asp Cys
1 5 10 15Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Met Asp Ile Lys Leu Glu
20 25 30

20

<210> 277

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 277

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln His Gly Gln Asn Met Glu Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Phe Arg Tyr Leu Glu

40

20

A-801B (PCT).ST25.txt
25 30

<210> 278

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 278

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Pro Arg Leu Gln Glu Glu Cys
1 5 10 15Val Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Leu Arg Leu Glu
20 25 30

20

<210> 279

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 279

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Arg Thr Thr Gln Glu Lys Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Glu Ser Gln Leu Glu

40

A-801B (PCT).ST25.txt

20 25 30

<210> 280

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2 10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 280

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Thr Ser Gln Glu Asp Cys
 1 5 10 15

Val Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His Met Val Ser Ser Leu Glu
 20 25 30 20

<210> 281

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2 30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 281

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Val Ile Gly Arg Pro Cys
 1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Leu Glu Gly Leu Leu Glu 40

20

A-801B (PCT).ST25.txt
25 30

<210> 282

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 282

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Ala Gln Gln Glu Glu Cys
1 5 10 15Ala Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His Met Val Gly Leu Leu Glu
20 25 30

20

<210> 283

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 283

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Pro Gly Gln Glu Asp Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Val Arg Ser Leu Glu

40

20

A-801B (PCT).ST25.txt
25 30

<210> 284

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> xaa = Fc

<400> 284

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Pro Met Asn Gln Val Glu Cys
1 5 10 15Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Arg Ser Leu Glu
20 25 30

20

<210> 285

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> xaa = Fc

<400> 285

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Phe Gly Trp Ser His Gly Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Ser Thr Leu Glu

40

20

A-801B (PCT).ST25.txt
25 30

<210> 286

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 286

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Ser Thr Gln Asp Asp Cys
1 5 10 15Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Val Gly Pro Leu Glu
20 25 30

20

<210> 287

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 287

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Pro Arg Ile Ser Thr Cys
1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Asp Gln Leu Leu Glu

40

20

A-801B (PCT).ST25.txt
25 30

<210> 288

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 288

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ser Thr Ile Gly Asp Met Cys
1 5 10 15Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Met Gln Val Asp Leu Glu
20 25 30

20

<210> 289

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 289

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Leu Gly Gly Gln Gly Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu

40

20

A-801B (PCT).ST25.txt
25 30

<210> 290

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 290

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Leu Gly Gly Gln Gly Cys
1 5 10 15Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His Leu Glu Asp Gly Leu Glu
20 25 30

20

<210> 291

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 291

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Met Gln Gly Gly Leu Glu

40

20

A-801B (PCT).ST25.txt
25 30

<210> 292

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 292

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Lys Gly Lys Ser Val Cys
1 5 10 15Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His Met Gln Ser Gly Leu Glu
20 25 30

20

<210> 293

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 293

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys
1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Met Gln Gly Gly Leu Glu

40

20

A-801B (PCT).ST25.txt
25 30

<210> 294

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 294

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Val Asn Glu Val Val Cys
1 5 10 15Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asn His Trp Asp Thr Pro Leu Glu
20 25 30

20

<210> 295

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 295

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Val Gln Val Gly Met Cys
1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Lys His Met Arg Leu Gln Leu Glu

40

20

A-801B (PCT).ST25.txt
25 30

<210> 296

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 296

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Val Gly Ser Gln Thr Cys
1 5 10 15Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Leu Val Glu Val Leu Glu
20 25 30

20

<210> 297

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 297

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Gly Met Lys Met Phe Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Ile Val Tyr Arg Leu Glu

40

20

A-801B (PCT).ST25.txt
25 30

<210> 298

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 298

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys
1 5 10 15Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gln Gly Gly Leu Glu
20 25 30

20

<210> 299

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 299

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Ser Gln Arg Val Gly Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln His Leu Thr Tyr Thr Leu Glu

40

20

A-801B (PCT).ST25.txt
25 30

<210> 300

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 300

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Trp Ser Trp Pro Pro Cys
1 5 10 15Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln Thr Val Trp Pro Ser Leu Glu
20 25 30

20

<210> 301

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 301

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Thr Ser Pro Ser Phe Cys
1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His Met Val Gln Gly Leu Glu

40

20

A-801B (PCT).ST25.txt
25 30

<210> 302

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 302

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Gln Gly Leu His Gln Cys
1 5 10 15Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Lys Val Leu Trp Pro Ser Leu Glu
20 25 30

20

<210> 303

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 303

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Trp Arg Ser Gln Val Cys
1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asn Leu Gly Gly Asp Trp Leu Glu

40

20

A-801B (PCT).ST25.txt
25 30

<210> 304

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 304

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Asp Lys Ile Leu Glu Glu Cys
1 5 10 15Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln Phe Phe Tyr Gly Ala Leu Glu
20 25 30

20

<210> 305

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 305

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Thr Phe Ala Arg Gln Cys
1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala Leu Gly Gly Asn Trp Leu Glu

40

20 A-801B (PCT).ST25.txt 30
25

<210> 306

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 306

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Pro Ala Gln Glu Glu Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu Pro Leu Pro Leu Met Leu Glu
20 25 30

20

<210> 307

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 307

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Arg Pro Glu Asp Met Cys Ser
1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Trp His Leu Gln Gly Tyr Cys Leu Glu

40

20
 A-801B (PCT).ST25.txt 25 30

<210> 308
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Peptibodies capable of binding to Ang-2 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

<400> 308
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Trp Gln Leu Ala Val Cys
 1 5 10 15
 Gln Trp Asp Pro Gln Thr Cys Asp His Met Gly Ala Leu Leu Glu 20
 20 25 30

<210> 309
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Peptibodies capable of binding to Ang-2 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

<400> 309
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Gln Leu Val Ser Leu Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Asp Gly Trp Leu Glu 40

20

A-801B (PCT).ST25.txt
25 30

<210> 310

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 310

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Met Gly Gly Ala Gly Arg Cys
1 5 10 15Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu
20 25 30

20

<210> 311

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 311

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Met Phe Leu Pro Asn Glu Cys
1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser Asn Leu Pro Glu Ala Leu Glu

40

20

A-801B (PCT).ST25.txt
25 30

<210> 312

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 312

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

20

<210> 313

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 313

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Pro Gln Thr Glu Gly Cys
1 5 10 15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu His Gly Trp Leu Glu

40

20

A-801B (PCT).ST25.txt
25 30

<210> 314

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 314

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Pro Asp Thr Arg Gln Gly Cys
1 5 10 15Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Tyr Gly Met Trp Leu Glu
20 25 30

20

<210> 315

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 315

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Trp Pro Gln Asp Lys Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu

40

20

A-801B (PCT).ST25.txt
25 30

<210> 316

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 316

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Asp Lys Ile Leu Glu Glu Cys
1 5 10 15Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu
20 25 30

20

<210> 317

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 317

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Ala Thr Gln Glu Glu Cys
1 5 10 15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu

40

20 A-801B (PCT).ST25.txt 30
25

<210> 318
<211> 34
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2 10
<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(34)
<223> Xaa = Fc

<400> 318
Met Gly Ala Gln Thr Asn Phe Met Pro Met Asp Asp Leu Glu Gln Arg
1 5 10 15
Leu Tyr Glu Gln Phe Ile Leu Gln Gln Gly Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20 25 30 20
Gly Xaa

<210> 319
<211> 34
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220> 30
<223> peptibodies capable of binding to Ang-2
<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(34)
<223> Xaa = Fc

<400> 319
Met Gly Ala Gln Thr Asn Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Ala Thr 40

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<223> Xaa = FC

<400> 321

Met Gly Ala Gln Leu Asn Phe Thr Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr
1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln Gln Ser Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Xaa

10

<210> 322

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

<220>

20

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = FC

<400> 322

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

Leu Tyr Glu Gln Phe Met Leu Gln Gln Ala Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Xaa

30

<210> 323

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 323

Met Gly Ala Gln Gln Glu Tyr Glu Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Thr
 1 5 10 15

10

Leu Tyr Asn Gln Trp Met Phe His Gln Arg Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

<210> 324

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 324

30

Met Gly Ala Gln Val Lys Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Ile
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Gln Thr Phe Gln Glu Arg Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

<210> 325

<211> 34

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

10

<223> Xaa = Fc

<400> 325

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

Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln Gln Arg Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Xaa

20

<210> 326

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

30

<223> Xaa = Fc

<400> 326

Met Gly Ala Gln Thr Asn Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Gln Thr
1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln Gln Arg Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20 25 30

A-801B (PCT).ST25.txt

Gly Xaa

<210> 327

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<220>

<221> 'misc_feature

<222> (34)..(34)

20

<223> Xaa = Fc

<400> 327

Met Gly Ala Gln Gln Asn Phe Lys Pro Met Asp Glu Leu Glu Asp Thr
 1 5 10 15

Leu Tyr Lys Gln Phe Leu Phe Gln His Ser Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

30

<210> 328

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

<220>

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 328

Met Gly Ala Gln Val Lys Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Trp
1 5 10 15

Leu Tyr His Gln Phe Thr Leu His His Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20 25 30

10

Gly Xaa

<210> 329

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 329

Met Gly Ala Gln Tyr Lys Phe Thr Pro Leu Asp Asp Leu Glu Gln Thr
1 5 10 15

30

Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln His Val Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Xaa

<210> 330

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

10

<400> 330

Met Gly Ala Gln Gln Asn Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Ala Thr
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu His Phe Ile Phe His Tyr Thr Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

<210> 331

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

30

<400> 331

Met Gly Ala Gln Val Lys Phe Lys Pro Leu Asp Ala Leu Glu Gln Thr
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu His Trp Met Phe Gln Gln Ala Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

A-801B (PCT).ST25.txt

<210> 332

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

<220>

10

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 332

Met Gly Ala Gln Glu Asp Tyr Met Pro Leu Asp Ala Leu Asp Ala Gln
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Phe Ile Leu Leu His Gly Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

20

Gly Xaa

<210> 333

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

<220>

30

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 333

Met Gly Ala Gln Tyr Lys Phe Asn Pro Met Asp Glu Leu Glu Gln Thr
 1 5 10 15

A-801B (PCT).ST25.txt

Leu Tyr Glu Glu Phe Leu Phe Gln His Ala Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

<210> 334

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220> .

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 334

20

Met Gly Ala Gln Ser Asn Phe Met Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Phe Met Leu Gln His Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

<210> 335

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<400> 335

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

Leu Tyr Lys Gln Trp Thr Leu Gln Gln Arg Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Xaa

10

<210> 336

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

20

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 336

Met Gly Ala Gln Gln Lys Phe Met Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Ile
1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Phe Met Phe Gln Gln Ser Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Xaa

30

<210> 337

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 337

Met Gly Ala Gln Thr Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr
1 5 10 15

10

Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln His Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Xaa

<210> 338

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 338

Met Gly Ala Gln His Thr Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr
1 5 10 15

30

Leu Tyr Tyr Gln Trp Leu Tyr Asp Gln Leu Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Xaa

<210> 339

<211> 34

<212> PRT

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

10

<400> 339

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

Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln Gln Arg Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

<210> 340

20

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

30

<400> 340

Met Gly Ala Gln Gln Thr Phe Gln Pro Leu Asp Asp Leu Glu Glu Tyr
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Trp Ile Arg Arg Tyr His Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Xaa

40

A-801B (PCT).ST25.txt

<210> 341

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 341

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

Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln His Ala Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20 25 30

20

Gly Xaa

<210> 342

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 342

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ser Gly Gln Leu Arg Pro Cys

40

A-801B (PCT).ST25.txt

1	5	10	15											
Glu	Glu	Ile	Phe	Gly	Cys	Gly	Thr	Gln	Asn	Leu	Ala	Leu	Leu	Glu
			20					25					30	

<210> 343

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 343

Met	xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	Ala	Gly	Gly	Met	Arg	Pro	Tyr
1				5					10					15	

Asp	Gly	Met	Leu	Gly	Trp	Pro	Asn	Tyr	Asp	Val	Gln	Ala	Leu	Glu
			20					25					30	

<210> 344

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 344

Met	xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gln	Gly	Gln	Asp	Leu	Arg	Pro	Cys
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1 5 A-801B (PCT).ST25.txt 10 15
 Glu Asp Met Phe Gly Cys Gly Thr Lys Asp Trp Tyr Gly Leu Glu
 20 25 30

<210> 345
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10

<220>
 <223> Peptibodies capable of binding to Ang-2
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

<400> 345
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Pro Gly Gln Arg Pro Tyr
 1 5 10 15

20

Asp Gly Met Leu Gly Trp Pro Thr Tyr Gln Arg Ile Val Leu Glu
 20 25 30

<210> 346
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

30

<220>
 <223> Peptibodies capable of binding to Ang-2
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

<400> 346
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Thr Trp Asp Asp Pro Cys

40

1 5 A-801B (PCT).ST25.txt 10 15

Met His Ile Leu Gly Pro Val Thr Trp Arg Arg Cys Ile Leu Glu
 20 25 30

<210> 347
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Peptibodies capable of binding to Ang-2
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

<400> 347

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Phe Gly Asp Lys Arg Pro Leu
 1 5 10 15

Glu Cys Met Phe Gly Gly Pro Ile Gln Leu Cys Pro Arg Leu Glu
 20 25 30

<210> 348
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Peptibodies capable of binding to Ang-2
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

<400> 348

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Arg Pro Cys Glu Glu Ile

10

20

30

40

1 5 A-801B (PCT).ST25.txt 10 15

Phe Gly Gly Cys Thr Tyr Gln Leu Glu
20 25

<210> 349

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 349

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Gln Glu Trp Cys Glu Gly
1 5 10 15

20

Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Lys Gln Arg Leu Glu
20 25 30

<210> 350

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 350

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Met Leu Asp Tyr Cys Glu Gly

40

1 5 A-801B (PCT).ST25.txt 10 15

Met Asp Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Asp Lys Gln Met Leu Glu
20 25 30

<210> 351
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2
<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Fc

<400> 351

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln His Gln Glu Tyr Cys Glu Gly
1 5 10 15

Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Tyr Gln Gly Leu Glu
20 25 30

<210> 352
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2
<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Fc

<400> 352

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Gln Asp Tyr Cys Glu Gly

10

20

30

40

1 5 A-801B (PCT).ST25.txt 10 15

Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Asn Gln Arg Leu Glu
20 25 30

<210> 353
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2
<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Fc

<400> 353

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Leu Asp Tyr Cys Glu Gly
1 5 10 15

Val Gln Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Asn Leu Asp Leu Glu
20 25 30

<210> 354
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2
<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Fc

<400> 354

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Phe Glu Tyr Cys Asp Gly

10

20

30

40

1 5 A-801B (PCT).ST25.txt 10 15

Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Asp Lys Gln Thr Leu Glu
20 25 30

<210> 355
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2
<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Fc

<400> 355

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Gln Asp Tyr Cys Glu Gly
1 5 10 15

Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Met Gln Lys Leu Glu
20 25 30

<210> 356
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptibodies capable of binding to Ang-2
<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Fc

<400> 356

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Gln Asp Tyr Cys Glu Gly

10

20

30

40

A-801B (PCT).ST25.txt

1 5 10 15

Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Lys Gln Arg Leu Glu
 20 25 30

<210> 357
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10

<220>
 <223> Peptibodies capable of binding to Ang-2
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

<400> 357

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Leu Glu Tyr Cys Asp Gly
 1 5 10 15

20

Met Glu Asp Pro Phe Thr Gln Gly Cys Asp Asn Gln Ser Leu Glu
 20 25 30

<210> 358
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

30

<220>
 <223> Peptibodies capable of binding to Ang-2
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

<400> 358

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Phe Asp Tyr Cys Glu Gly Val

40

1

5

A-801B (PCT).ST25.txt

10

15

Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Asp Asn His Leu Glu
20 25

<210> 359

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide capable of binding to Ang-2

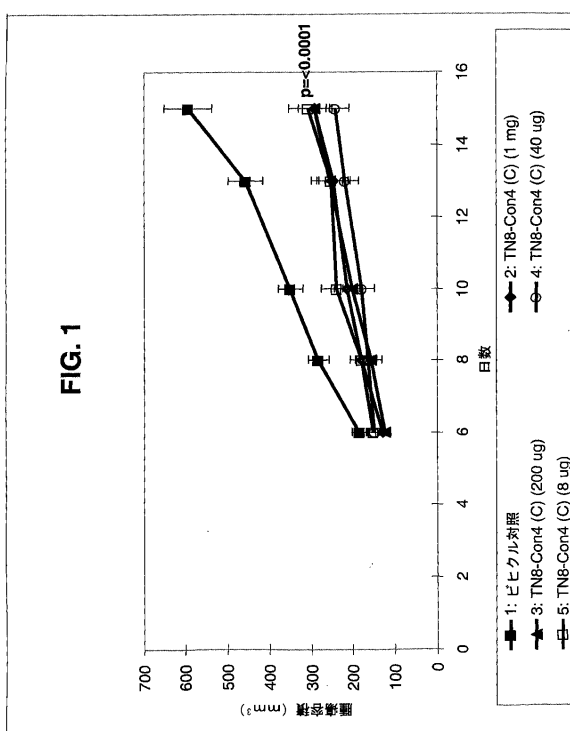
<400> 359

Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Asn Phe Met Pro Met Asp Asp
1 5 10 15

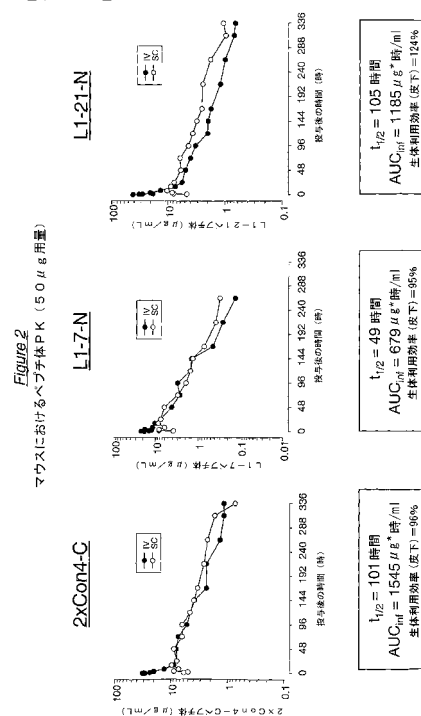
Leu Glu Gln Arg Leu Tyr Glu Gln Phe Ile Leu Gln Gln Gly Leu Glu
20 25 30

10

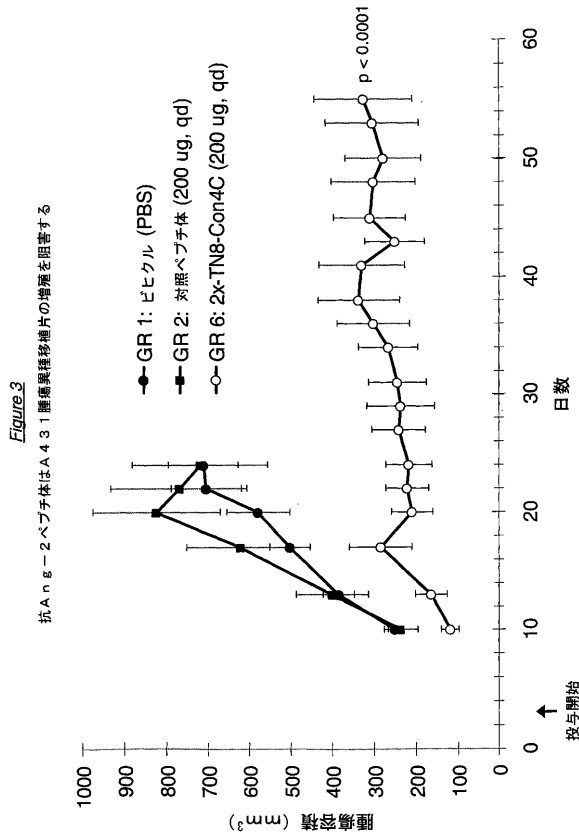
【図 1】



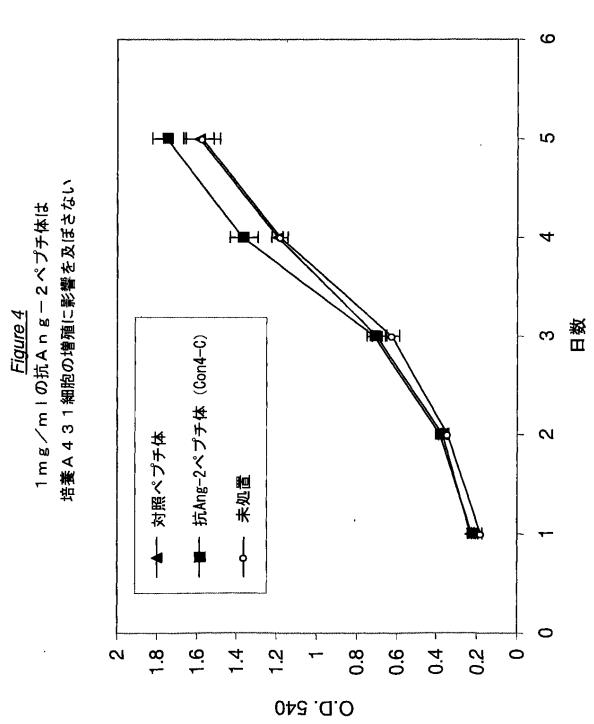
【図 2】



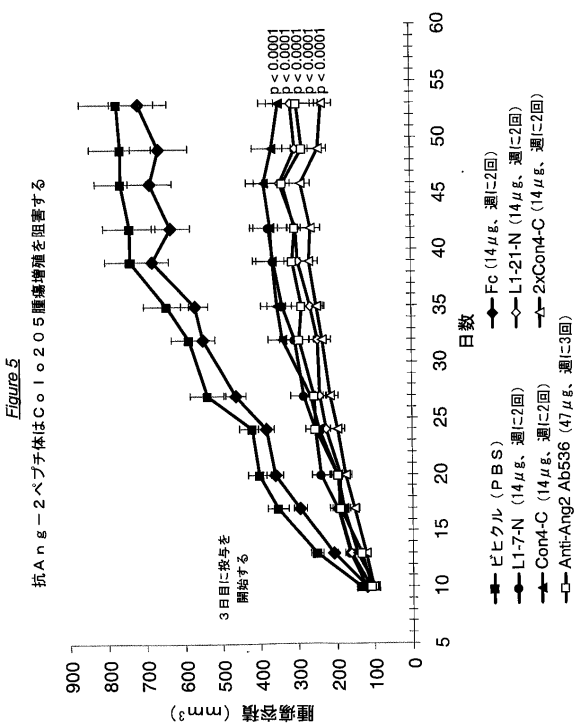
【図 3】



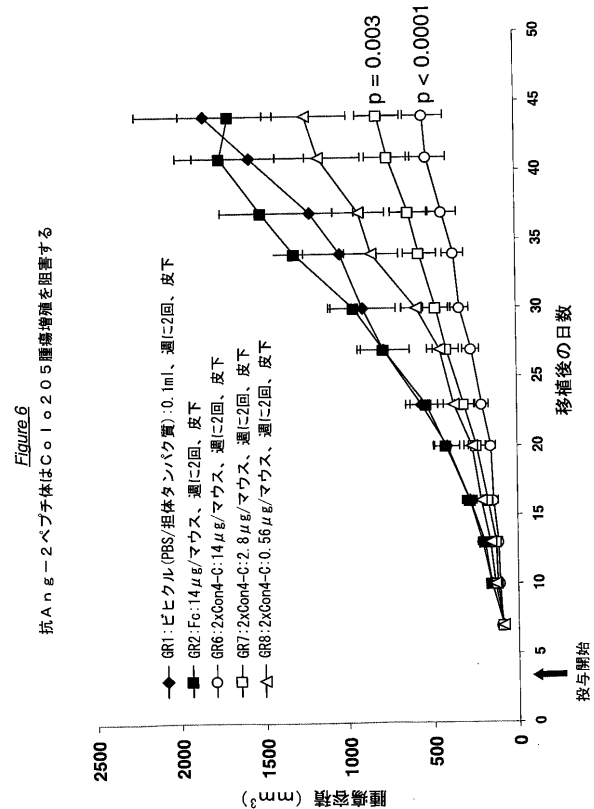
【図 4】



【図 5】



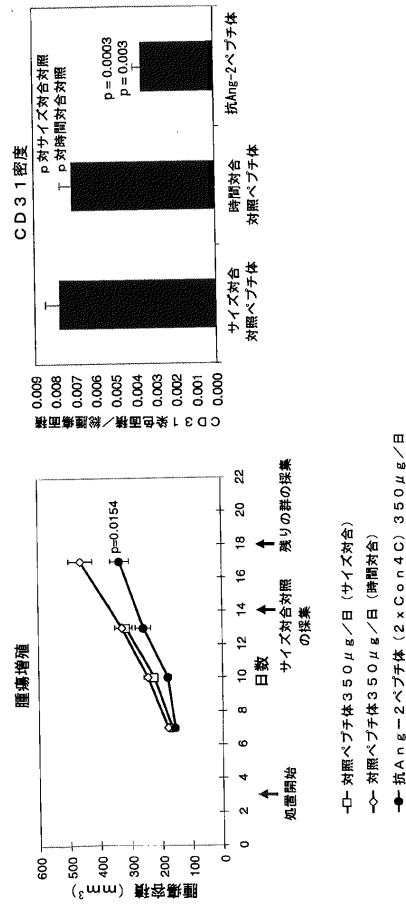
【図 6】



【図 7】

Figure 7

抗Ang-2ペプチド治療はColo205腫瘍異種移植片のCD31染色密度を低下させる



【図 9】

Figure 9
長期投与試験における完全応答速度

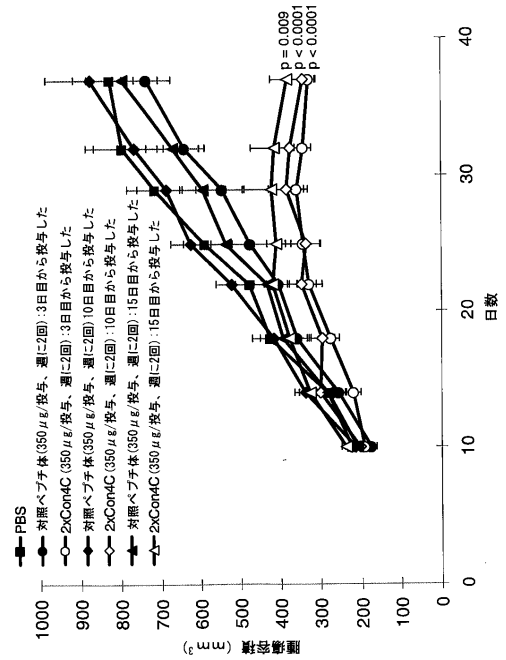
試験	腫瘍 モデル	治療	投与 スケジュール*	投与期間 (週)	完全应答 %
082801	A431	Ab 536	46.7 ug, 3x/wk	10	60**
100201	A431	Ab 536	46.7 ug, 3x/wk	11	40**
100201	A431	2xCon4-C	200 ug/day	11	30**
100201	A431	2xCon4-C	40 ug/day	11	0
100201	A431	2xCon4-C	8 ug/day	11	20
012902	Colo205	Ab 536	46.7 ug, 3x/wk	12	10
012902	Colo205	2xCon4-C	140 ug/wk	12	0
031802	Colo205	2xCon4-C	350 ug, 2x/wk	10	20
1111901	Colo205	Ab 536	46.7 ug, 3x/wk	21	20
042602	Colo205	2xCon4-C	14 ug, 2x/wk	11	21

* すべての試験において、3日目から投与を開始した。

** 完全な赤が達成された後薬剤を中止し、腫瘍の再増殖は認められなかった。平均フォローアップ期間は15.3週間（6-27週間の範囲）。

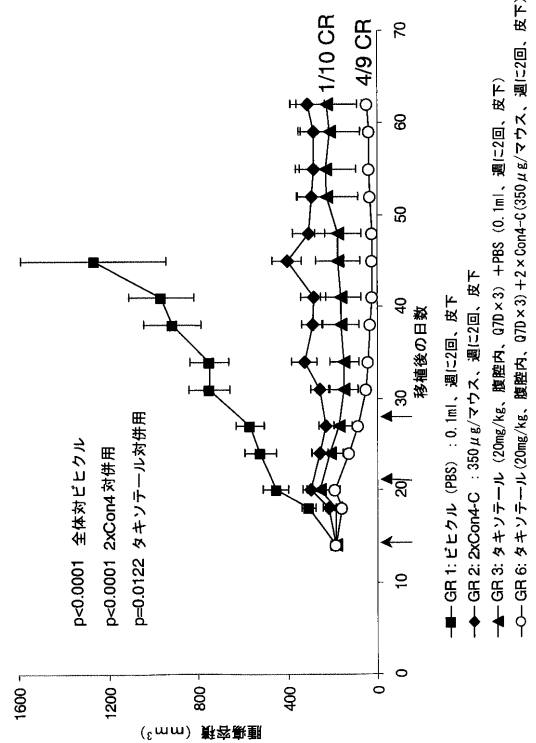
【図 8】

Figure 8

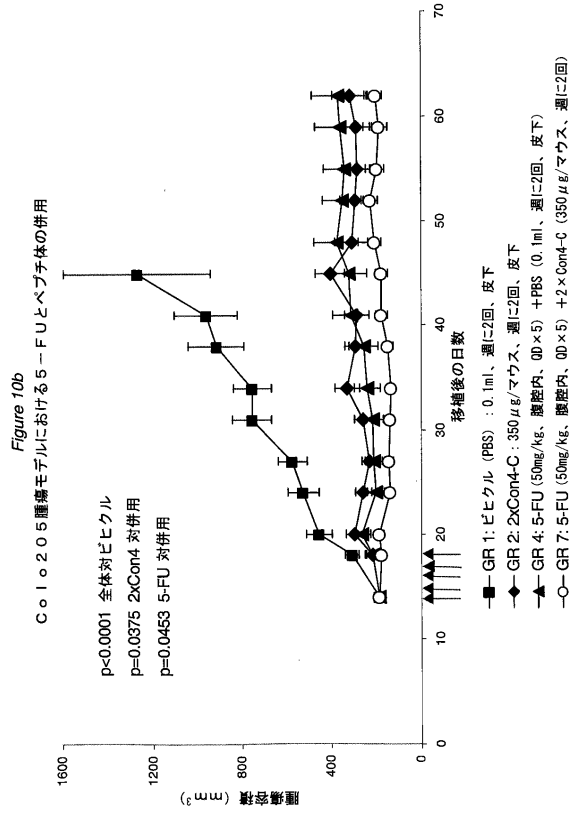


【図 10 A】

Figure 10a

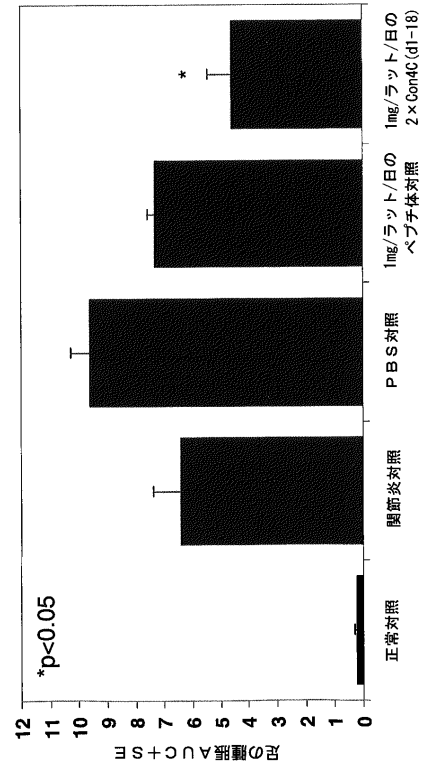


【図 10 B】

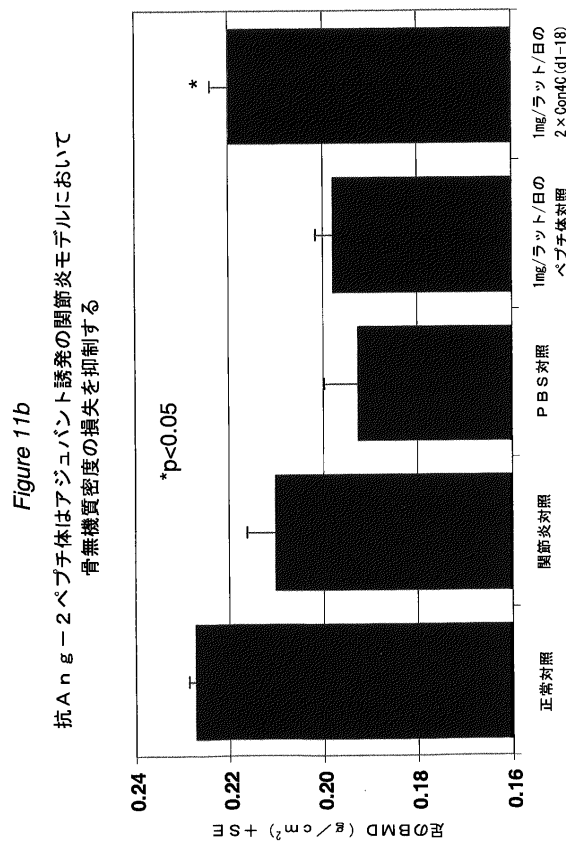


【図 11 A】

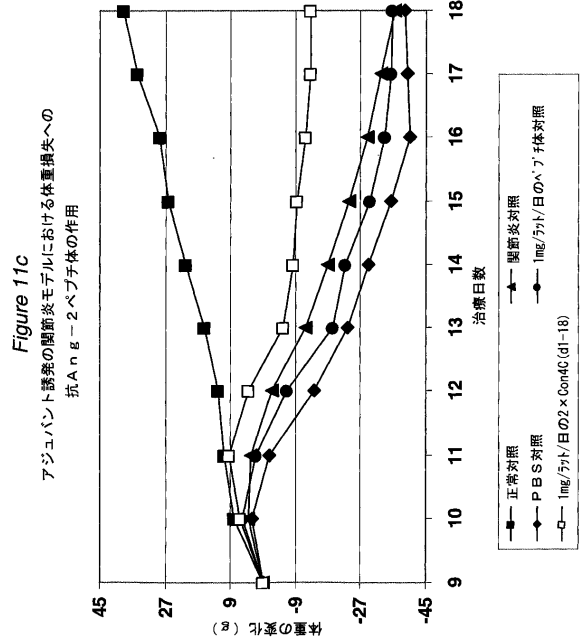
抗Ang-2ペプチ体はアジュバント誘発の関節炎モデルにおいて足の腫脹を抑制する



【図 11 B】

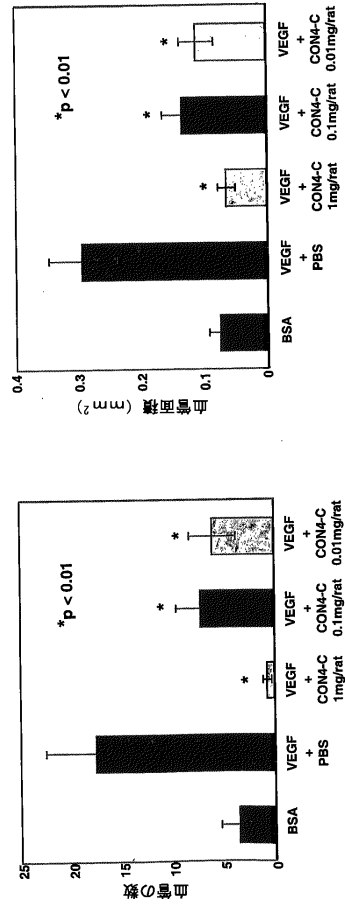


【図 11 C】



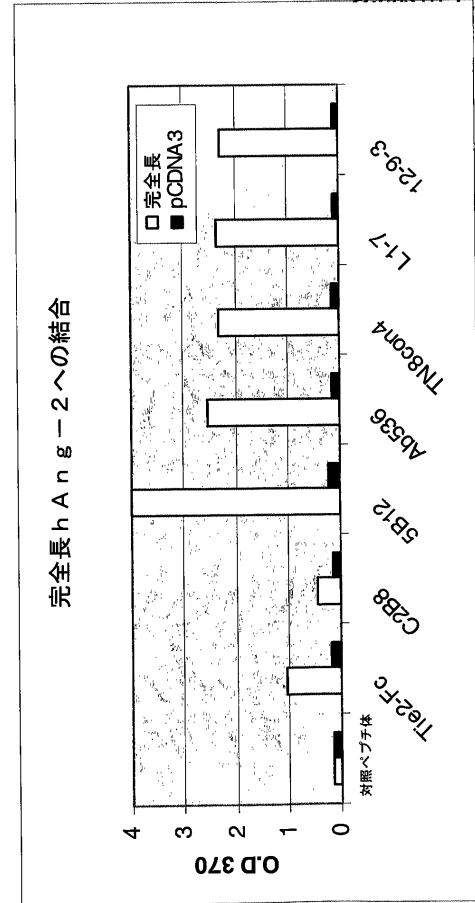
【図 1 2】

Figure 12
CON4-CペプチドはVEGF誘発の
角膜血管新生を阻止する



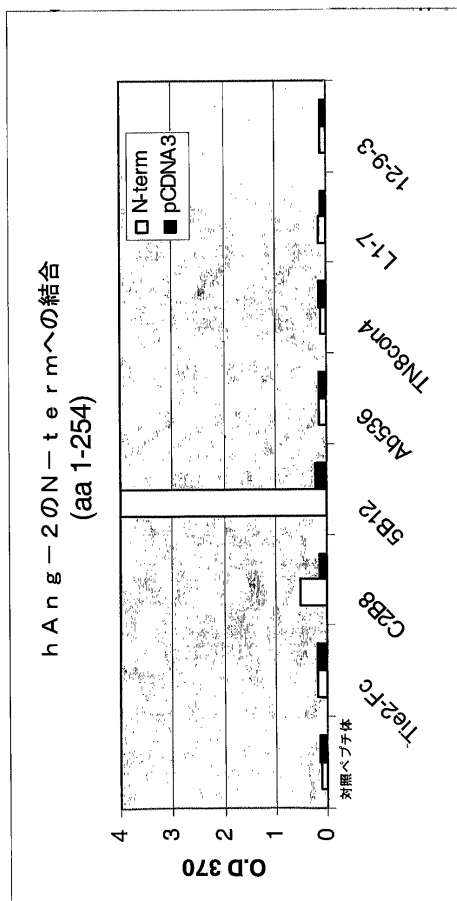
【図 1 3 A】

Figure 13a
エピトープマッピング



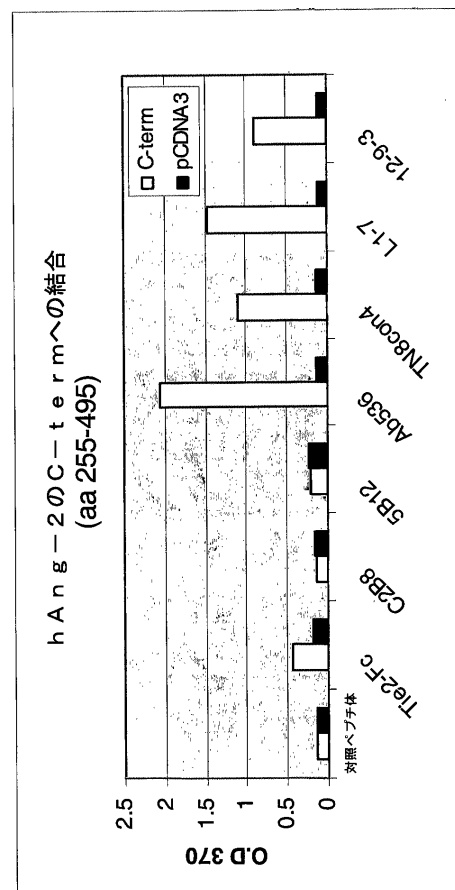
【図 1 3 B】

Figure 13b
エピトープマッピング

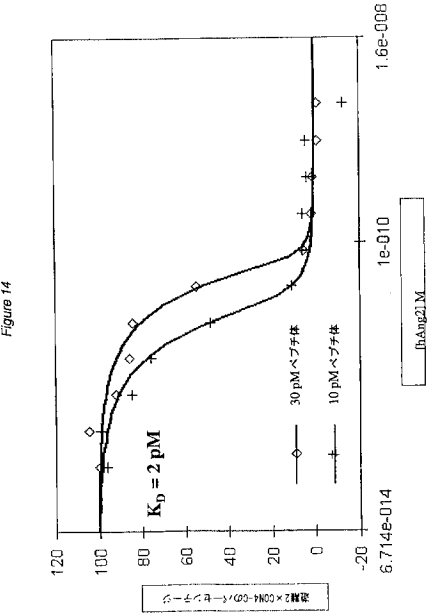


【図 1 3 C】

Figure 13c
エピトープマッピング



【図 14】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 N 5/00 1 0 1
A 6 1 K 31/337 (2006.01)		A 6 1 K 31/337
A 6 1 K 31/4745 (2006.01)		A 6 1 K 31/4745
A 6 1 K 31/513 (2006.01)		A 6 1 K 31/513
A 6 1 K 45/00 (2006.01)		A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 17/06 (2006.01)		A 6 1 P 17/06
A 6 1 P 19/00 (2006.01)		A 6 1 P 19/00
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00

(31)優先権主張番号 10/269,695

(32)優先日 平成14年10月10日(2002.10.10)

(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 オリナー, ジョナサン・ダニエル

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 1 3 2 0、ニューベリー・パーク、ゴールデン・クレスト・
アベニュー・9 5 9

(72)発明者 ミン, ホスン

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 1 3 2 0、ニューベリー・パーク、コナー・コート・3 8 7
5

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 国際公開第00/075323 (WO, A1)

国際公開第00/057901 (WO, A1)

国際公開第96/031598 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

C07K 1/00-19/00

MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/WPIDS(STN)

REGISTRY(STN)

UniProt/GeneSeq