



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1596266 B

(45) 授权公告日 2010.04.28

(21) 申请号 02824651.9 *A61K 38/16* (2006.01)
(22) 申请日 2002.10.11 *A61P 3/04* (2006.01)
(30) 优先权数据 *A61P 7/04* (2006.01)
60/328,624 2001.10.11 US *A61P 9/10* (2006.01)
60/414,155 2002.09.27 US *A61P 9/14* (2006.01)
10/269,695 2002.10.10 US *A61P 27/02* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(85) PCT申请进入国家阶段日
2004.06.10
(86) PCT申请的申请数据
PCT/US2002/032657 2002.10.11
(87) PCT申请的公布数据
W02003/057134 EN 2003.07.17
(73) 专利权人 安姆根有限公司
地址 美国加利福尼亚州
(72) 发明人 J·D·奥利纳 H·棉
(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001
代理人 李波 徐雁漪
(51) Int. Cl.
C07K 7/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
A61K 38/03 (2006.01)

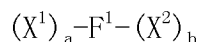
(56) 对比文件
W0 0057901 A1, 2000.10.05, 全文.
W0 9631598 A1, 1996.10.10, 全文.
审查员 马岚

权利要求书 2 页 说明书 233 页 附图 19 页

(54) 发明名称
人血管生成素-2 的特异结合剂

(57) 摘要
本发明公开了结合 Ang-2 的肽。还公开了包
括所述肽的肽抗体,制备这样的肽和肽抗体的方
法,用这样的肽和肽抗体治疗的方法。

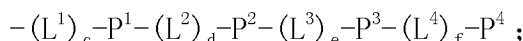
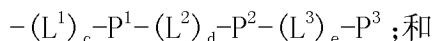
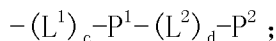
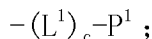
1. 下式代表的物质成分,或其生理可接受盐:



其中:

F^1 是 Fc 结构域;

X^1 和 X^2 各自独立地选自



其中 P^1 , P^2 , P^3 , 和 P^4 中的一个或多个各自独立地为选自以下的多肽:

(a) 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:65:WDPWT 的多肽,其中所述多肽长度是 10-25 个氨基酸;

(b) 氨基酸序列 SEQ ID NO:66:WDPWTC;

(c) 氨基酸序列 SEQ ID NO:67:Cz²WDPWT,

(d) 氨基酸序列 SEQ ID NO:68:Cz²WDPWTC, 和

(e) SEQ ID NO:2 的多肽;

其中 z^2 是酸性或中性极性氨基酸残基;

L^1 , L^2 , L^3 , 和 L^4 各自独立地是连接体;并且

a, b, c, d, e, 和 f 各自独立地是 0 或 1,前提是 a 和 b 中至少一个是 1。

2. 权利要求 1 的物质成分,其中 z^2 是 A, V, G, Q, N, D, 或 E。

3. 权利要求 1 的物质成分,其中 P^1 , P^2 , P^3 , 和 P^4 的一个或多个各自独立地为选自 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:76 至 SEQ ID NO:118 的多肽。

4. 权利要求 1 的物质成分,其组成式为:

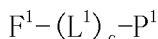


或



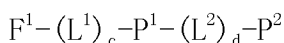
或其生理可接受盐。

5. 下式的权利要求 1 的物质成分:



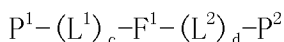
或其生理可接受盐。

6. 下式的权利要求 1 的物质成分:



或其生理可接受盐。

7. 下式的权利要求 1 的物质成分:



或其生理可接受盐。

8. 权利要求 1 的物质成分,其中 F^1 为 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列。

9. SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 所示序列的多肽,其中所述多肽能够结合 Ang-2,或其生理可接受盐。

10. 权利要求 1 的成分在制备抑制哺乳动物不期望的血管发生的药物中的用途。
11. 权利要求 1 的成分在制备治疗受试者血管发生的药物中的用途。
12. 权利要求 1 的成分在制备抑制哺乳动物中以不期望的血管发生为特征的肿瘤生长的药物中的用途。
13. 权利要求 1 的成分和化疗药物在制备治疗哺乳动物癌症的药物中的用途。
14. 权利要求 13 的用途,其中所述化疗药物是 5-FU, CPT-11, 和脱乙酰基紫杉醇中的至少一种。
15. 权利要求 1 的成分在制备治疗哺乳动物的至少一种下述疾病的药物中的用途: 眼新血管病, 成血管瘤, 血管瘤, 炎性疾病, 子宫内膜异位, 肿瘤性疾病, 或者牛皮癣。

人血管生成素 -2 的特异结合剂

[0001] 本申请要求 2001 年 10 月 11 日申请的美国临时申请登记号 No. 60/328,624 的利益,该专利在此全文引作参考。

发明领域

[0002] 本发明涉及识别血管生成素 -2 (Ang-2) 并且与之结合的特异结合剂。更具体地说,本发明涉及特异性结合 Ang-2 的所述特异结合剂及其片段的制备,诊断用途,和治疗用途。

[0003] 发明背景

[0004] 血管发生,从存在的血管生成新的血管,对于很多生理和病理过程都是必需的。一般来说,血管发生由血管生成因子原和抗血管生成因子严格调节,但是在象癌症,眼新血管病,关节炎,和牛皮癣这样的疾病的情况下,该过程可能错误进行。Folkman, J., Nat. Med., 1:27-31 (1995)。

[0005] 有很多种疾病已知与不受调节的或者不期望的血管发生相关。这样的疾病包括但不限于,眼新血管形成,例如视网膜病(包括糖尿病视网膜病),与年龄有关的黄斑变性,牛皮癣,成血管瘤(hemangioblastoma),血管瘤,动脉硬化,炎症疾病,例如类风湿性或风湿性炎症,尤其是关节炎(包括类风湿性关节炎),或者其他慢性炎症,例如慢性哮喘,动脉粥样硬化或者移植后动脉粥样硬化,子宫内膜异位,和瘤,例如所谓的实体瘤和液体(或血液)肿瘤(例如白血病和淋巴瘤)。与不期望的血管发生相关的其他疾病对于那些本领域技术人员是显而易见的。

[0006] 虽然很多信号转导系统在血管发生的调节中涉及,但是表征得最充分并且最具内皮细胞选择性系统之一涉及 Tie-2 受体酪氨酸激酶(称作" Tie-2" 或" Tie-2R" (也称作" ORK");鼠 Tie-2 也称作" tek")及其配体,血管生成素(Gale, N.W. 和 Yancopoulos, G.D., GenesDev. 13:1055-1066[1999])。有四种已知的血管生成素;血管生成素 -1(" Ang-1")至血管生成素 -4(" Ang-4")。这些血管生成素也称作" Tie-2 配体"。(Davis, S., 等, Cell, 87:1161-1169[1996]; Grosios, K., 等, Cytogenet Cell Genet, 84:118-120[1999]; Holash, J., 等, Investigative Ophthalmology&Visual Science, 42:1617-1625[1999]; Koblizek, T.I., 等, Current Biology, 8:529-532[1998]; Lin, P., 等, Proc Natl Acad Sci USA, 95:8829-8834[1998]; Maisonpierre, P.C., 等, Science, 277:55-60[1997]; Papapetropoulos, A., 等, Lab Invest, 79:213-223[1999]; Sato, T.N., 等, Nature, 375:70-74[1998]; Shyu, K.G., 等, Circulation, 98:2081-2087[1998]; Suri, C., 等, Cell, 87:1171-1180[1996]; Suri, C., 等, Science, 282:468-471[1998]; Valenzuela, D.M., 等, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 96:1904-1909[1999]; Witzenbichler, B., 等, J Biol Chem, 273:18514-18521[1998])。Ang-1 与 Tie-2 结合刺激培养的内皮细胞中的受体磷酸化作用,发现 Ang-2 刺激和拮抗 Tie-2 受体磷酸化作用(Davis, S., 等, [1996], 上文; Maisonpierre, P.C., 等, [1997], 上文; Kim, I., J.H. Kim, 等, Oncogene 19(39):4549-4552(2000); Teichert-Kuliszewska,

K., P. C. Maisonpierre, 等, Cardiovascular Research 49(3):659-70(2001))。

[0007] 小鼠 Tie-2 和 Ang-1 敲除物的表型是类似的并且提示 Ang-1- 刺激的 Tie-2 磷酸化作用通过保持内皮细胞-支持细胞附着而介导子宫中发育血管的改变和稳定 (Dumont, D. J., 等, Genes&Development, 8:1897-1909[1994]; Sato, T. N., 等, Nature, 376:70-74[1995]; Suri, C., 等, [1996], 上文)。认为 Ang-1 在血管稳定中的作用在成年人中是保守的, 而且广泛而基本性表达 (Hanahan, D., Science, 277:48-50[1997]; Zagzag, D., 等, ExperimentalNeurology, 159:391-400[1999])。相反, Ang-2 表达主要限于血管改造部位, 认为在那里阻断 Ang-1 功能, 从而诱导有益于血管发生的血管可塑性状态 (Hanahan, D., [1997], 上文; Holash, J., 等, Science, 284:1994-1998[1999]; Maisonpierre, P. C., 等, [1997], 上文)。

[0008] 很多公开的研究支持证明病态血管-选择性 Ang-2 表达与血管发生有关。这些病理学情况包括, 例如, 牛皮癣, 黄斑变性, 和癌症 (Bunone, G., 等, American Journal of Pathology, 155:1967-1976[1999]; Etoh, T., 等, Cancer Research, 61:2145-2153[2001]; Hangai, M., 等, Investigative Ophthalmology&Visual Science, 42:1617-1625[2001]; Holash, J., 等, [1999] 上文; Kuroda, K., 等, Journal of Investigative Dermatology, 116:713-720[2001]; Otani, A., 等, Investigative Ophthalmology&VisualScience, 40:1912-1920[1999]; Stratmann, A., 等, AmericanJournal of Pathology, 153:1459-1466[1998]; Tanaka, S., 等, JClin Invest, 103:34-345[1999]; Yoshida, Y., 等, International Journal of Oncology, 15:1221-1225[1999]; Yuan, K., 等, Journal of Periodontal Research, 35:165-171[2000]; Zagzag, D., 等, [1999] 上文)。这些研究大多数聚焦在癌症上, 其中很多癌症类型表现出显示血管 Ang-2 表达。与在病理性血管发生中的表达相反, 正常组织中 Ang-2 表达十分有限 (Maisonpierre, P. C., 等, [1997], 上文; Mezquita, J., 等, Biochemical andBiophysical Research Communications, 260:492-498[1999])。在正常成年人体内血管发生的三个主要部位是卵巢, 胎盘, 和子宫; 这些是其中检测到 Ang-2mRNA 的正常 (即, 非癌) 组织中主要组织。

[0009] 一些功能研究提示 Ang-2 可能在肿瘤血管发生中涉及。Ahmad 等 (Cancer Res., 61:1255-1259[2001]) 描述 Ang-2 超量表达并且支持性证明这与小鼠异种移植模型中肿瘤生长增加有关。也参见 Etoh 等, 上文, 和 Tanaka 等, 上文, 其中给出支持 Ang-2 超量表达与肿瘤血管过多相关的数据。但是, 相反, Yu 等. (Am. J. Path., 158:563-570[2001]) 报道数据支持证明 Lewis 肺癌和 TA3 乳房癌细胞中 Ang-2 超量表达延长用相应的转染子注射的小鼠的存活。

[0010] 在过去的几年中, 很多出版物提出 Ang-1, Ang-2 和 / 或 Tie-2 可能是抗癌治疗的靶物。例如, 美国专利 Nos. 6, 166, 185, 5, 650, 490, 和 5, 814, 464 各自公开了抗-Tie-2 配体抗体和受体的概念。Lin 等 (Proc. Natl. Acad. Sci USA, 95:8829-8834[1998]) 对小鼠注射腺病毒表达可溶 Tie-2; 声称可溶 Tie-2 减小小鼠产生的肿瘤的数目和大小。在最近的研究中, Lin 等 (J. Clin. Invest., 100:2072-2078[1997]) 对大鼠注射可溶形式的 Tie-2; 声称这种化合物减小大鼠的肿瘤大小。Siemeister 等 (Cancer Res., 59:3185-3189[1999]) 制备出表达 Tie-2 胞外结构域的人黑素瘤细胞系, 对裸鼠注射这些细胞系, 得出结论: 声称可溶 Tie-2 导致肿瘤生长和肿瘤血管发生的“显著抑制”。从这个信息看, 并且已知 Ang-1

和 Ang-2 都结合 Tie-2, 从这些研究不能清楚地看出 i Ang-1, Ang-2, 或 Tie-2 会是抗癌治疗的有吸引力的靶物。

[0011] 提高这些分子的半寿期的一些肽与稳定的血浆蛋白例如 Ig 恒定区的融合体描述于, 例如, PCT 公开 WO 00/24782, 2000 年 5 月 4 日公开。

[0012] 先前描述过提高分子半寿期的一种蛋白质或者其片段与一种稳定的血浆蛋白质例如 Ig 恒定区的融合体 (例如, 实施例, 美国专利 No. 5, 480, 981; Zheng 等, J. Immunol., 154:5590-5600, (1995); Fisher 等, N. Engl. J. Med., 334:1697-1702, (1996); Van Zee, K. 等, J. Immunol., 156:2221-2230, (1996); 美国专利 No. 5, 808, 029, 1998 年 9 月 15 日公开; Capon 等, Nature, 337:525-531, (1989); Harvill 等, Immunotech., 1:95-105, (1995); WO97/23614, 1997 年 7 月 3 日公开; PCT/US97/23183, filed Dec. 11, 1997 年 12 月 11 日申请; Linsley, J. Exp. Med., 174:561-569, (1991); WO 95/21258, 1995 年 8 月 10 日公开)。

[0013] 有效的抗-Ang-2 疗法可能使大量的癌症患者受益, 因为大多数实体肿瘤需要新血管化生长直径超过 1-2 毫米。这样的疗法对其他与血管发生相关的疾病例如视网膜病, 关节炎和牛皮癣有广泛的应用。

[0014] 对于特异性识别并结合 Ang-2 的新的药物有着未开发的需求。这样的药物将有助于对与 Ang-2 活性相关的病态的诊断筛选和治疗干预。

[0015] 因此, 本发明的一个目的是提供调节 Ang-2 活性的 Ang-2 的特异结合剂。本发明这样的药物采取肽抗体 (peptibodies) 形式, 即, 与其他分子例如抗体的 Fc 结构域融合的肽, 其中肽部分特异性结合 Ang-2。

[0016] 本发明概述

[0017] 在一个实施方案中, 本发明涉及结合 Ang-2 的肽 (在这里也称作多肽)。本发明还包括这样的肽的变体和衍生物。

[0018] 在另一个实施方案中, 本发明的肽和其变体和衍生物与载体连接。

[0019] 在另一个实施方案中, 所述肽可以和 Fc 结构域融合, 从而提供肽抗体。任选地, 所述肽抗体包括例如 SEQ ID NO:3-SEQ ID NO:6, 或 SEQ ID NO:76-SEQ ID NO:157, 以及其变体和衍生物的至少一种肽。此外, 所述肽可以包括根据 SEQ ID NO:65-SEQ ID NO:75, 和 SEQ ID NO:158 所示的结构式的至少一种肽。

[0020] 在另一个实施方案中, 本发明提供编码特异结合剂, 和其变体和衍生物的核酸分子。

[0021] 在另一个实施方案中, 本发明提供编码肽抗体, 和其变体和衍生物的核酸分子。任选地, 所述核酸分子包括 SEQ ID NO:33-SEQ ID NO:53。

[0022] 在另一个实施方案中, 本发明提供通过对需要的受试者施用有效量的特异结合剂而减小肿瘤的方法。本发明还提供抑制受试者血管发生的方法, 包括对需要的受试者施用有效量的特异结合剂。本发明进一步提供治疗受试者癌症的方法, 包括对需要的受试者施用有效量的特异结合剂。

[0023] 本发明还涉及能结合 Ang-2 的多肽及其生理可接受盐, 其中所述多肽包括氨基酸序列 WDPWT (SEQ ID NO:65), 并且其中所述多肽长度 5-50 个氨基酸。所述多肽还包括氨基酸序列:

[0024] WDPWTC (SEQ ID NO:66)

[0025] 以及其生理可接受盐。另外,所述多肽可以包括氨基酸序列:

[0026] Cz²WDPWT (SEQ ID NO :67)

[0027] 其中 z² 是酸性或中性极性氨基酸残基,以及其生理可接受盐。所述多肽可以进一步包括氨基酸序列:

[0028] Cz²WDPWTC (SEQ ID NO :68)

[0029] 其中 z² 是酸性或中性极性氨基酸残基,以及其生理可接受盐。

[0030] 在另一个实施方案中,本发明涉及能结合 Ang-2 的多肽及其生理可接受盐,包括下式的氨基酸序列:

[0031] a¹a²a³Ca⁵WDPWTCa¹²a¹³a¹⁴ (SEQ ID NO :69)

[0032] 其中:

[0033] a¹, a², 和 a³ 各自独立地是氨基酸残基;

[0034] a⁵ 是氨基酸残基;

[0035] a¹² 不存在或者是氨基酸残基;

[0036] a¹³ 不存在或者是中性疏水性,中性极性的,或者碱性氨基酸残基;

[0037] a¹⁴ 是中性疏水性或中性极性氨基酸残基。在优选的实施方案中:

[0038] a¹ 是 V, I, P, W, G, S, Q, N, E, K, R, 或 H;

[0039] a² 是 V, P, M, G, S, Q, D, E, K, R, 或 H;

[0040] a³ 是 A, V, P, M, F, T, G, D, E, K, 或 H;

[0041] a⁸ 是 A, V, G, Q, N, D, 或 E;

[0042] a¹² 是 S, Q, N, D, E, K, 或 R;

[0043] a¹³ 是 L, T, 或 H;和

[0044] a¹⁴ 是 V, L, I, W, 或 M。

[0045] 在更优选的实施方案中, a¹ 是 Q; a² 是 E; a³ 是 E; a⁵ 是 D 或 E; a¹² 是 D 或 E; a¹³ 是 H; 和 a¹⁴ 是 M。

[0046] 要明白在这里使用带有角注的小写字母(例如 a¹ 和 b¹)意在鉴别氨基酸位置,不是意指给定氨基酸的单字母缩写。在这里用大写字母表示单字母氨基酸缩写。

[0047] 本发明进一步涉及能结合 Ang-2 的包括下式氨基酸序列的多肽及其生理可接受盐:

[0048] b¹b²b³b⁴b⁵b⁶Cb⁸WDPWTCb¹⁵b¹⁶b¹⁷b¹⁸b¹⁹b²⁰ (SEQ ID NO :70) 其中:

[0049] b¹ 不存在或者是氨基酸残基;

[0050] b² 不存在或者是中性疏水的,中性极性的,或者碱性氨基酸残基;

[0051] b³, b⁴, b⁵, 和 b⁶ 各自独立地不存在或者是氨基酸残基;

[0052] b⁸ 是氨基酸残基;

[0053] b¹⁵ 不存在或者是氨基酸残基;

[0054] b¹⁶ 不存在或者是中性疏水的,中性极性的,或者碱性氨基酸残基;

[0055] b¹⁷ 不存在或者是中性疏水的或中性极性氨基酸残基;

[0056] b¹⁸, b¹⁹, 和 b²⁰ 各自独立地不存在或者是氨基酸残基。在优选的实施方案中:

[0057] b¹ 不存在,或者是 A, V, L, P, W, F, T, G, S, Q, N, K, R, 或 H;

[0058] b² 不存在,或者是 A, V, L, I, P, W, M, T, G, S, Y, N, K, R, 或 H;

[0059] b^3 不存在,或者是 A, L, I, P, W, M, T, G, S, Q, N, E, R, 或 H;

[0060] b^4 是 V, I, P, W, G, S, Q, N, E, K, R, 或 H;

[0061] b^5 是 V, P, M, G, S, Q, D, E, K, R, 或 H;

[0062] b^6 是 A, V, P, M, F, T, G, D, E, K, 或 H;

[0063] b^8 是 A, V, G, Q, N, D, 或 E;

[0064] b^{15} 是 S, Q, N, D, E, K, 或 R;

[0065] b^{16} 是 L, T, 或 H;

[0066] b^{17} 是 V, L, I, W, 或 M;

[0067] b^{18} 不存在,或者是 A, V, L, P, W, F, T, G, Y, Q, D, E, 或 R;

[0068] b^{19} 不存在,或者是 V, L, I, P, T, G, S, Y, Q, N, D, E, 或 R;并且

[0069] b^{20} 不存在,或者是 V, L, P, W, M, T, G, S, Y, Q, N, D, K, 或 R。

[0070] 在更优选的实施方案中, b^1 不存在,或者是 P, 或 T; b^2 不存在,或者是 I, 或 N; b^3 不存在,或者是 R, 或 I; b^4 是 Q; b^5 是 E; b^6 是 E; b^8 是 D 或 E; b^{15} 是 D 或 E; b^{16} 是 H; b^{17} 是 M; b^{18} 不存在,或 W, 或 P; b^{19} 不存在,或 G, 或 E;和 b^{20} 不存在,或 V, 或 K。

[0071] 还明白本发明优选涉及包括选自 SEQ ID NO:4, 和 SEQ ID NO:76 至 SEQ ID NO:118 的至少一种氨基酸序列的多肽以及其生理可接受盐,其中包含的多肽能结合 Ang-2。下面给出肽序列:

[0072] 表 1

[0073]

肽	SEQIDNO.	肽序列
Con4-44	76	PIRQEECDWDPWTCEHMWEV
Con4-40	77	TNIQEECEWDPWTCDHMPGK
Con4-4	78	WYEQDACEWDPWTCEHMAEV
Con4-31	79	NRLQEVCEWDPWTCEHMENV
Con4-C5	80	AATQEECEWDPWTCEHMPRS
Con4-42	81	LRHQEGCEWDPWTCEHMFWDW

肽	SEQIDNO.	肽序列
Con4-35	82	VPRQKDCEWDPWTCEHMYVG
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

肽	SEQIDNO.	肽序列
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
Con4-C1	108	TTIGSMCEWDPWTCAHMQGG

肽	SEQIDNO.	肽序列
Con4-21	109	TKGKSVCQWDPWTCSHMQSG
Con4-C2	110	TTIGSMCQWDPWTCAHMQGG
Con4-18	111	WVNEVVCEWDPWTCNHWDTF
Con4-19	112	VVQVGMQWDPWTCKHMLRQ
Con4-16	113	AVGSQTCEWDPWTCAHLVEV
Con4-11	114	QGMKMFCEWDPWTCAHI
Con4-C4	115	TTIGSMCQWDPWTCEHMQGG
Con4-23	116	TSQRVGCEWDPWTCQHLTYT
Con4-15	117	QWSWPPCEWDPWTCQTVWPS
Con4-9	118	GTSPSFCQWDPWTCSHMVQG
TN8-Con4*	4	QEECEWDPWTCEHM

[0074] *要明白一些肽和/或肽抗体可以包含前缀“TN”，“TN8”，或“TN12”，对于给定的肽抗体这个前缀可以存在或不存在。这样，例如，术语“TN8-Con4”和“Con4”在这里可互换使用。

[0075] 在另一个实施方案中本发明涉及具有下式的物质成分 (composition of matter) 及其多聚体：

[0076] $(X^1)_a-F^1-(X^2)_b$

[0077] 其中：

[0078] F^1 是载体；

[0079] X^1 和 X^2 各自独立地选自

[0080] $-(L^1)_c-P^1$ ；

[0081] $-(L^1)_c-P^1-(L^2)_d-P^2$ ；

[0082] $-(L^1)_c-P^1-(L^2)_d-P^2-(L^3)_e-P^3$; 和

[0083] $-(L^1)_c-P^1-(L^2)_d-P^2-(L^3)_e-P^3-(L^4)_f-P^4$;

[0084] 其中 P^1, P^2, P^3 , 和 P^4 的一个或多个各自独立地包括这里描述的多肽。例如, 在优选的实施方案中, P^1, P^2, P^3 , 和 P^4 能各自独立地包括 SEQ ID NO:3 至 SEQ ID NO:6, 和 / 或 SEQ ID NO:76 至 SEQ ID NO:157 的多肽。

[0085] 在另一个优选的实施方案中, 物质成分是下式:

[0086] X^1-F^1

[0087] 或

[0088] F^1-X^2

[0089] 及其生理可接受盐, 其中 X^1, F^1 , 和 X^2 如这里所定义。在另一个实施方案中, 物质成分是下式:

[0090] $F^1-(L^1)_c-P^1$

[0091] 及其生理可接受盐, 其中 L^1, F^1 , 和 P^1 如这里所定义。在另一个实施方案中, 物质成分是下式:

[0092] $F^1-(L^1)_c-P^1-(L^2)_d-P^2$

[0093] 及其生理可接受盐, 其中 L^1, F^1, P^1, P^2 , 和 c 和 d 如这里所定义。在另一个实施方案中, 物质成分是下式:

[0094] $F^1-(L^1)_c-F^1-(L^2)_d-P^2$

[0095] 及其生理可接受盐。在优选的实施方案中, F^1 是其片段的 Fc 结构域。

[0096] 本发明进一步涉及能结合 Ang-2 的包括下式氨基酸序列的多肽及其生理可接受盐:

[0097] $Pc^2Dc^4Lc^6c^7c^8LY$ (SEQ ID NO:71)

[0098] 其中

[0099] c^2 是中性疏水氨基酸残基

[0100] c^4 是 A, D, 或 E

[0101] c^6 是酸性氨基酸残基

[0102] c^7 是酸性氨基酸残基; 并且

[0103] c^8 是中性疏水, 中性极性, 或碱性氨基酸残基。在优选实施方案中, c^2 是 L 或 M。在另一个优选实施方案中, c^6 是 D 或 E。

[0104] 本发明进一步涉及能结合 Ang-2 的包括下式氨基酸序列的多肽及其生理可接受盐:

[0105] $d^1d^2d^3d^4Pd^6Dd^8Ld^{10}d^{11}d^{12}LY d^{15}d^{16}d^{17}d^{18}d^{19}d^{20}d^{21}d^{22}$

[0106] (SEQ ID NO:72)

[0107] 其中,

[0108] d^1 不存在, 或者是氨基酸残基;

[0109] d^2 不存在, 或者是中性极性, 酸性, 或碱性氨基酸残基;

[0110] d^3 不存在, 或者是中性疏水性或中性极性氨基酸残基;

[0111] d^4 不存在, 或者是氨基酸残基;

[0112] d^6 是中性疏水氨基酸残基;

- [0113] d^8 是 A, D, 或 E ;
- [0114] d^{10} 是酸性氨基酸残基 ;
- [0115] d^{11} 是氨基酸残基 ;
- [0116] d^{12} 是中性疏水, 中性极性, 或碱性氨基酸残基 ;
- [0117] d^{15} 不存在, 或者是中性极性, 酸性, 或碱性氨基酸残基 ;
- [0118] d^{16} 不存在, 或者是中性极性, 酸性, 或碱性氨基酸残基 ;
- [0119] d^{17} 不存在, 或者是中性疏水, 或中性极性氨基酸残基 ;
- [0120] d^{18} 不存在, 或者是中性疏水, 或中性极性氨基酸残基 ;
- [0121] d^{19} 不存在, 或者是中性疏水, 中性极性, 或碱性氨基酸残基 ;
- [0122] d^{20} 不存在, 或者是氨基酸残基 ;
- [0123] d^{21} 不存在, 或者是中性疏水, 酸性, 或碱性氨基酸残基 ;
- [0124] d^{22} 不存在, 或者是中性疏水, 中性极性, 或碱性氨基酸残基。在优选的实施方案中 :
- [0125] d^1 是 T, S, Q, R, 或 H ;
- [0126] d^2 是 T, Q, N, 或 K ;
- [0127] d^3 是 F ;
- [0128] d^4 是 M, Q, E, 或 K ;
- [0129] d^6 是 L 或 M ;
- [0130] d^8 是 D 或 E ;
- [0131] d^{10} 是 E ;
- [0132] d^{11} 是 Q 或 E ;
- [0133] d^{12} 是 T 或 R ;
- [0134] d^{15} 是 Y, D, E, 或 K ;
- [0135] d^{16} 是 Q ;
- [0136] d^{17} 是 W 或 F ;
- [0137] d^{18} 是 L, I, M, 或 T ;
- [0138] d^{19} 是 L, F, 或 Y ;
- [0139] d^{20} 是 Q, D, 或 E ;
- [0140] d^{21} 不存在, 或者是 Q, 或 H ;
- [0141] d^{22} 不存在, 或者是 A, L, G, S, 或 R.
- [0142] 在优选的实施方案中, 下面给出包括选自 SEQ ID NO :6, 和 SEQ IDNO :119 至 SEQ ID NO :142 的至少一种氨基酸序列的多肽, 其中包含的多肽能结合 Ang-2, 以及其生理可接受盐。下面给出 SEQ ID NO :6, 和 SEQ ID NO :119-142 :

[0143]

肽	SEQIDNO.	肽序列
L1-1	119	QNYKPLDELDATLYEHFIFHYT

肽	SEQIDNO.	肽序列
L1-2	120	LNFTPLDELEQTLYEQWTLQQS
L1-3	121	TKFNPLDELEQTLYEQWTLQHQ
L1-4	122	VKFKPLDALEQTLYEHWMFQQA
L1-5	123	VKYKPLDELDEILYEQQTFQER
L1-7	124	TNFMDDLEQRLYEQFILQQG
L1-9	125	SKFKPLDELEQTLYEQWTLQHA
L1-10	126	QKFQPLDELEQTLYEQFQQA
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	TNYKPLDELDTLYEHWILQHS

肽	SEQIDNO.	肽序列
L1-C1	140	QKFKPLDELEQTLYEQWTLQQR
L1-C2	141	TKFQPLDELDQTLYEQWTLQQR
L1-C3	142	TNFQPLDELDQTLYEQWTLQQR
L1	6	KFNPLDELEETLYEQFTFQQ

[0144] 本发明还涉及能结合 Ang-2 的包括下式氨基酸序列的多肽及其生理可接受盐：

[0145] $Rpe^3e^4e^5e^6e^7G$ (SEQ ID NO:73)

[0146] 其中

[0147] e^3 是中性极性氨基酸残基；

[0148] e^4 是酸性极性氨基酸残基；

[0149] e^5 是中性极性或酸性氨基酸残基；

[0150] e^6 是中性疏水氨基酸残基；

[0151] e^7 是中性疏水氨基酸残基。在优选的实施方案中， e^3 是 Y 或 C。在另一个优选的实施方案中， e^4 是 D 或 E。在另一个优选的实施方案中， e^6 是 I 或 M。

[0152] 本发明进一步涉及能结合 Ang-2 的包括下式氨基酸序列的多肽及其生理可接受盐：

[0153] $f^1f^2f^3f^4Rpf^7f^8f^9f^{10}f^{11}Gf^{13}f^{14}f^{15}f^{16}f^{17}f^{18}f^{19}f^{20}$ (SEQ ID NO:74) 其中，

[0154] f^1 是中性疏水或中性极性氨基酸残基；

[0155] f^2 是中性疏水或中性极性氨基酸残基；

[0156] f^3 是中性极性或酸性氨基酸残基；

[0157] f^4 是中性疏水或中性极性氨基酸残基；

[0158] f^7 是中性极性氨基酸残基；

[0159] f^8 是酸性氨基酸残基；

[0160] f^9 是中性极性或酸性氨基酸残基；

[0161] f^{10} 是中性疏水氨基酸残基；

[0162] f^{11} 是中性疏水氨基酸残基；

[0163] f^{13} 是中性疏水或中性极性氨基酸残基；

[0164] f^{14} 是中性疏水或中性极性氨基酸残基；

[0165] f^{15} 是中性极性氨基酸残基；

[0166] f^{16} 是中性极性氨基酸残基；

[0167] f^{17} 是中性极性或酸性氨基酸残基；

[0168] f^{18} 是中性疏水或碱性氨基酸残基；

[0169] f^{19} 是中性疏水或中性极性氨基酸残基；并且

[0170] f^{20} 是中性疏水或中性极性氨基酸残基。

[0171] 在优选的实施方案中：

- [0172] f^1 是 S, A, 或 G ;
[0173] f^2 是 G, Q, 或 P ;
[0174] f^3 是 Q, G, 或 D ;
[0175] f^4 是 L, M, 或 Q ;
[0176] f^7 是 C 或 Y ;
[0177] f^8 是 E 或 D ;
[0178] f^9 是 E, G, 或 D ;
[0179] f^{10} 是 I 或 M ;
[0180] f^{11} 是 F 或 L ;
[0181] f^{13} 是 C 或 W ;
[0182] f^{14} 是 G 或 P ;
[0183] f^{15} 是 T 或 N ;
[0184] f^{16} 是 Q, Y, 或 K ;
[0185] f^{17} 是 N, D, 或 Q ;
[0186] f^{18} 是 L, V, W, 或 R ;
[0187] f^{19} 是 A, Q, Y, 或 I ;并且
[0188] f^{20} 是 L, A, G, 或 V。

[0189] 在更优选的实施方案中,本发明涉及包括选自 SEQ ID NO :3,和 SEQ ID NO :143 至 SEQ ID NO :148 的至少一种氨基酸序列的多肽,及其生理可接受盐,其中所述多肽能结合 Ang-2。SEQ ID NO :3,和 SEQ ID NO :143 至 SEQ ID NO :148 如下。

[0190]

肽	SEQIDNO.	肽序列
Con1-1	143	AGGMRPYDGMLGWPNYDVQA
Con1-2	144	QTDWDDPCMHILGPVTWRRCI
Con1-3	145	APGQRPYDGMLGWPTYQRIV
Con1-4	146	SGQLRPCEEIFGCGTQNLAL
Con1-5	147	FGDKRPLECMFGGPIQLCPR
Con1-6	148	GQDLRPCEDMFGCGTKDWYG
Con1	3	KRPCEEIFGGCTYQ

[0191] 另一方面,本发明涉及能结合 Ang-2 的包括下式的氨基酸序列的多肽及其生理可接受盐:

[0192] $Cg^2Gg^4g^5DPFTg^{10}GCg^{13}$ (SEQ ID NO :75)

[0193] 其中

[0194] g^2 是酸性氨基酸残基;

[0195] g^4 是中性疏水氨基酸残基；

[0196] g^5 是 E, D, 或 Q；

[0197] g^{10} 是中性疏水或中性极性氨基酸残基；

[0198] g^{13} 是酸性残基。在优选的实施方案中, g^2 是 E 或 D。在另一个优选的实施方案中, g^4 是 V 或 M。在另一个优选的实施方案中, g^{10} 是 F 或 Q。在另一个实施方案中, g^{13} 是 D 或 E。

[0199] 本发明进一步涉及能结合 Ang-2 的包括下式氨基酸序列的多肽及其生理可接受盐：

[0200] $h^1h^2h^3h^4Ch^6Gh^8h^9DPFTh^{14}GCh^{17}h^{18}h^{19}h^{20}$ (SEQ ID NO :158) 其中,

[0201] h^1 不存在或者是中性疏水, 中性极性, 或碱性氨基酸残基；

[0202] h^2 是中性疏水或中性极性氨基酸残基；

[0203] h^3 是酸性氨基酸残基；

[0204] h^4 是中性疏水或中性极性氨基酸残基；

[0205] h^6 是酸性氨基酸残基；

[0206] h^8 是中性疏水氨基酸残基；

[0207] h^9 是 E, D, 或 Q；

[0208] h^{14} 是中性疏水或中性极性氨基酸残基；

[0209] h^{17} 是酸性氨基酸残基；

[0210] h^{18} 是中性疏水, 中性极性, 或碱性氨基酸残基；

[0211] h^{19} 是中性疏水或中性极性氨基酸残基；和

[0212] h^{20} 不存在或者是氨基酸残基。

[0213] 在优选的实施方案中,

[0214] h^1 不存在或者是 A, L, M, G, K, 或 H；

[0215] h^2 是 L, F, 或 Q；

[0216] h^3 是 D 或 E；

[0217] h^4 是 W 或 Y；

[0218] h^6 是 D 或 E；

[0219] h^8 是 V 或 M；

[0220] h^{14} 是 F 或 Q；

[0221] h^{17} 是 D 或 E；

[0222] h^{18} 是 M, Y, N, 或 K；

[0223] h^{19} 是 L 或 Q；和

[0224] h^{20} 不存在或者是 M, T, G, S, D, K, 或 R。

[0225] 在更优选的实施方案中, 本发明涉及包括选自 SEQ ID NO :5, 或 SEQ ID NO :149 至 SEQ ID NO :157 的至少一种氨基酸序列的多肽, 和其生理可接受盐, 其中所述多肽能结合 Ang-2。SEQ ID NO :5, 和 SEQ ID NO :149 至 SEQ ID NO :157 如下。

[0226]

肽	SEQIDNO.	肽序列
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

[0227] 在高度优选的实施方案中,本发明涉及具有下式的物质成分及其多聚体;及其生理可接受盐:

[0228] $(X^1)_q-F^1-(X^2)_r$

[0229] 其中:

[0230] F^1 是载体;

[0231] X^1 和 X^2 各自独立地选自

[0232] $-(L^1)_s-P^1$;

[0233] $-(L^1)_s-P^1-(L^2)_t-P^2$;

[0234] $-(L^1)_s-P^1-(L^2)_t-P^2-(L^3)_u-P^3$; 并且

[0235] $-(L^1)_s-P^1-(L^2)_t-P^2-(L^3)_u-P^3-(L^4)_v-P^4$;

[0236] 其中 P^1, P^2, P^3 , 和 P^4 中的一个或多个各自独立地包括选自下组的多肽:

[0237] (a) 氨基酸序列 WDPWT (SEQ ID NO:65), 其中所述多肽长度是 5-50 个氨基酸;

[0238] (b) 氨基酸序列 WDPWTC (SEQ ID NO:66);

[0239] (c) 氨基酸序列 Cz^2 WDPWT (SEQ ID NO:67), 其中 z^2 是酸性或中性极性氨基酸残基;

[0240] (d) 氨基酸序列 Cz^2 WDPWTC (SEQ ID NO:68), 其中 z^2 是酸性或中性极性氨基酸残基;

[0241] (e) 氨基酸序列 $Pc^2Dc^4Lc^6c^7c^8LY$ (SEQ ID NO:71), 其中 c^2 是中性疏水氨基酸残基;
 c^4 是 A, D, 或 E; c^6 是酸性氨基酸残基; c^7 是氨基酸残基; c^8 是中性疏水, 中性极性, 或碱性氨

氨基酸残基；

[0242] (f) 氨基酸序列 Rpe³e⁴e⁵e⁶e⁷G (SEQ ID NO:73), 其中 e³ 是中性极性氨基酸残基；e⁴ 是酸性氨基酸残基；e⁵ 是中性极性或酸性氨基酸残基；e⁶ 是中性疏水氨基酸残基；e⁷ 是中性疏水氨基酸残基；

[0243] (g) 氨基酸序列 Cg²Gg⁴g⁵DPFTg¹⁰GCg¹³ (SEQ ID NO:75), 其中 g² 是酸性氨基酸残基；g⁴ 是中性疏水氨基酸残基；g⁵ 是中性极性或酸性氨基酸残基；g¹⁰ 是中性疏水或中性极性氨基酸残基和；g¹³ 是酸性残基；

[0244] (h) SEQ ID NO:1 的多肽；

[0245] (i) SEQ ID NO:2 的多肽；并且

[0246] (j) SEQ ID NO:7 的多肽；

[0247] 其中 L¹, L², L³, 和 L⁴ 各自独立地是连接体；并且 q, r, s, t, u, 和 v 各自独立地是 0 或 1, 前提是 q 和 r 中至少一个是。

[0248] 可以明白本发明进一步涉及包括这里描述的至少一种肽和载体的融合多肽, 及其生理可接受盐, 其中所述融合多肽能结合 Ang-2。在融合多肽中, 载体优选是至少一个 Fc 结构域, 聚乙二醇, 脂质, 胆固醇基团, 糖类, 和寡糖。本领域技术人员明白其他合适的载体, 例如白蛋白等, 都包括在本发明的范围内。

[0249] 本领域技术人员认识到能将各种各样的分子插入特异结合剂结构中。因此, 给定的分子能被插入, 例如, 肽和特异结合剂的载体部分之间, 或者插入到肽本身部分中, 同时保持特异结合剂的期望的活性。人们能够容易地插入例如象下面的分子, 例如 Fc 结构域或者其片段, 聚乙二醇或其他相关的分子, 例如葡聚糖, 脂肪酸, 脂质, 胆固醇, 小的碳水化合物, 肽, 细胞毒性物质, 化学治疗药物, 这里描述的可检测部分 (包括荧光剂, 放射标记例如放射性同位素), 寡糖, 寡核苷酸, 多核苷酸, 干涉 (或其他) RNA, 酶, 激素, 或者类似物。本领域技术人员明白适合在这种形式中插入的其他分子, 并且包括在本发明的范围内。这包括例如在两个连接的氨基酸之间插入期望的分子, 任意地连接合适的连接体。作为例子, 在 Con4 (C) 肽抗体序列中：

[0250] M-Fc-GGGGGAQQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:23)

[0251] 本领域技术人员容易例如在两个相邻谷氨酰胺 ("QQ") 残基之间插入期望的分子来实现期望的结构和 / 或功能, 同时保留肽结合 Ang-2 的能力。因此, 这个序列可以如下进行修饰：

[0252] M-Fc-GGGGGAQ-[分子]-QEECEWDPWTCEHMLE

[0253] 如果期望, 能加入合适的连接体分子。进一步明白在分子的很多位置能插入分子, 包括在合适的侧链上, 如下在载体和肽序列之间：

[0254] M-Fc-[分子]-GGGGGAQQEECEWDPWTCEHMLE

[0255] 或者在本领域技术人员期望的任何其他位置中插入。其他合适的实施方案对于本领域技术人员是显而易见的。

[0256] 在另一个实施方案中, 本发明涉及这里描述的编码本发明的特异结合剂 (包括但不限于肽和 / 或肽抗体) 的多核苷酸。本领域技术人员明白在氨基酸序列已知的情况下, 应用公知技术能容易地测定相应的核苷酸序列。参见, 例如 Suzuki, D., An Introduction to Genetic Analysis, W. H. Freeman Pub. Co. (1986)。下面给出编码本发明的肽的举例的核

苷酸序列。本领域技术人员认识到多于一个的密码子能编码给定氨基酸,因此本发明涉及编码本发明的肽和 / 或肽抗体的任何核苷酸序列。

[0257]

肽	序列 鉴定 号	肽序列	举例的 DNA 序列
Con4-44	76	PIRQEECDWDPWTCEHWEV	cggatccgtcaggaagaatgcga ctgggaccctggacctgcgaac acatgtgggaagtt (SEQID NO :159)
Con4-40	77	TNIQEECEWDPWTCDHMPGK	accaacatccaggaagaatgcga atgggaccctggacctgcgacc acatgccgggtaaa (SEQID NO :160)
Con4-4	78	WYEQDACEWDPWTCEHMAEV	tggtagaacaggacgcttgca atgggaccctggacctgcgaac acatggctgaagtt (SEQID NO :161)
Con4-31	79	NRLQEVCEWDPWTCEHMENV	aaccgtctgcaggaagtttgcga tgggaccctggacctgcgaaca catggaaaacgtt (SEQID NO :162)
Con4- C5	80	AATQEECEWDPWTCEHMPRS	gctgctaccaggaagaatgcga atgggaccctggacctgcgaac acatgccgcgttcc (SEQID NO :163)
Con4-42	81	LRHQEGCEWDPWTCEHMFWD	ctgcgtcaccaggaaggttgca atgggaccctggacctgcgaac acatgttcgactgg (SEQID NO :164)
Con4-35	82	VPRQKDCEWDPWTCEHMYVG	gttcgcgtcagaaagactgcga atgggaccctggacctgcgaac acatgtacgttggt (SEQID NO :165)

肽	序列 鉴定 号	肽序列	举例的 DNA 序列
Con4-43	83	SISHEECEWDPWTCEHMQVG	tccatctcccacgaagaatgcgaa tgggaccctggacctgcgaaca catgcaggttggt (SEQID NO :360)
Con4-49	84	WAAQEECEWDPWTCEHMGRM	tgggctgctcaggaagaatgcga atgggatccgtggacctgcgaaca catgggtcgatg (SEQID NO :166)
Con4-27	85	TWPQDKCEWDPWTCEHMGST	acttggccgcaggacaaatgcga atgggatccgtggacctgcgaaca catgggttctact (SEQID NO :167)
Con4-48	86	GHSQEECGWDPWTCEHMGTS	ggtcactcccaggaagaatgcgg ttgggaccctggacctgcgaac acatgggtacgtcc (SEQID NO :168)
Con4-46	87	QHWQEECEWDPWTCDHMPK	cagcactggcaggaagaatgcga atgggaccctggacctgcgacc acatgccgtccaaa (SEQID NO :169)
Con4-41	88	NVRQEKCEWDPWTCEHMPVR	aacgttcgtcaggaataatgcgaa tgggaccctggacctgcgaaca catgccggttcgt (SEQID NO :170)
Con4-36	89	KSGQVECNWDPWTCEHMPRN	aaatccggtcaggttgaatgcaac tgggaccctggacctgcgaaca catgccgcgtaac (SEQID NO :171)
Con4-34	90	VKTQEHCDWDPWTCEHM	gttaaaaccaggaacactgcga ctgggaccctggacctgcgaac acatgcgtgaatgg (SEQID NO :172)

肽	序列 鉴定 号	肽序列	举例的 DNA 序列
Con4-28	91	AWGQEGCDWDPWTCEHMLPM	gcttgggggtcaggaaggttgca ctgggacccgtggacctgcgaac acatgctgccgatg (SEQID NO :173)
Con4-39	92	PVNQEDCEWDPWTCEHMPPM	ccggttaaccaggaagactgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatgccgccgatg (SEQID NO :174)
Con4-25	93	RAPQEDCEWDPWTCAHMDIK	cgtgctccgcaggaagactgcga atgggacccgtggacctgcgctc acatggacatcaaa (SEQID NO :175)
Con4-50	94	HGQNMECEWDPWTCEHMFY	cacggtcagaacatggaatgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatgttccgttac (SEQID NO :176)
Con4-38	95	PRLQEECVWDPWTCEHMPLR	ccgcgtctgcaggaagaatgcgtt tgggacccgtggacctgcgaaca catgccgctgcgt (SEQID NO :177)
Con4-29	96	RTTQEKCEWDPWTCEHMESQ	cgtaccaccaggaataatgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatggaatcccag (SEQID NO :178)
Con4-47	97	QTSQEDCVWDPWTCDHMVSS	cagacctcccaggaagactgcgtt tgggacccgtggacctgcgacca catggtttcctcc (SEQID NO :179)
Con4-20	98	QVIGRPCEWDPWTCEHLEGL	caggttatcggtcgctccgtgcgaa tgggacccgtggacctgcgaaca cctggaaggtctg (SEQID NO :180)

肽	序列 鉴定 号	肽序列	举例的 DNA 序列
Con4-45	99	WAQQEECAWDPWTCDHMVGL	tgggctcagcaggaagaatgcgc ttgggacccgtggacctgcgacc acatggttggtctg (SEQID NO :181)
Con4-37	100	LPGQEDCEWDPWTCEHMVRS	ctgccgggtcaggaagactgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatggttcgttcc (SEQID NO :182)
Con4-33	101	PMNQVECDWDPWTCEHMPRS	cggatgaaccagggttgaatgcga ctgggacccgtggacctgcgaac acatgccgcgttcc (SEQID NO :183)
AC2- Con4	102	FGWSHGCEWDPWTCEHMGST	ttcggttggtctcacggttgcgaat gggatccgtggacttgcgaacac atgggttctacc (SEQID NO :184)
Con4-32	103	KSTQDDCDWDPWTCEHMGVP	aaatccaccaggacgactgcga ctgggacccgtggacctgcgaac acatggttggtccg (SEQID NO :185)
Con4-17	104	GPRISTCQWDPWTCEHMDQL	ggtccgcgtatctccacctgccag tgggacccgtggacctgcgaaca catggaccagctg (SEQID NO :186)
Con4-8	105	STIGDMCEWDPWTCAHMQVD	tccaccatcggtgacatgtgcgaa tgggacccgtggacctgcgctca catgcaggttgac (SEQID NO :187)
AC4- Con4	106	VLGGQGCEWDPWTCRLLQGW	gttctgggtggtcagggttgcgaa tgggacccgtggacctgccgtctg ctgcagggttg (SEQID NO :188)

肽	序列 鉴定 号	肽序列	举例的 DNA 序列
Con4-1	107	VLGGQGCQWDPWTCSHLEDG	gtttctgggtgggtcagggttgccag tgggaccctggacctgctccca cctggaagacggt (SEQID NO :189)
Con4- C1	108	TTIGSMCEWDPWTCAHMQGG	accaccatcggttccatgtgcgaa tgggaccctggacctgcgctca catgcagggtggt (SEQID NO :190)
Con4-21	109	TKGKSVCQWDPWTCSHMQSG	accaaaggtaaatccgtttgccag tgggaccctggacctgctccca catgcagtcggt (SEQID NO :191)
Con4- C2	110	TTIGSMCQWDPWTCAHMQGG	accaccatcggttccatgtgccag tgggaccctggacctgcgctca catgcagggtggt (SEQID NO :192)
Con4-18	111	WVNEVCEWDPWTCNHWDTP	tgggttaacgaagtgtttgcgaat gggaccctggacctgcaaccac tgggacaccccg (SEQID NO :193)
Con4-19	112	VVQVGMQWDPWTCKHMLQ	gttggtcaggttggtatgtgccagt gggaccctggacctgcaaacac atgcgtctgcag (SEQID NO :194)
Con4-16	113	AVGSQTCEWDPWTCAHLVEV	gctgttggttcccagacctgcgaat gggaccctggacctgcgctcac ctggttgaagtt (SEQID NO :195)
Con4-11	114	QGMKMFCEWDPWTCAHIVYR	cagggtatgaaaatgtttctgcgaat gggaccctggacctgcgctcac atcgtttaccgt (SEQID NO :196)

肽	序列 鉴定 号	肽序列	举例的 DNA 序列
Con4- C4	115	TTIGSMCQWDPWTCEHMQGG	accaccatcggttccatgtgccag tgggaccctggacctgcgaaca catgcagggtggt (SEQID NO :197)
Con4-23	116	TSQRVGCEWDPWTCQHLYT	acctcccagcgtgttggttgcgaat gggaccctggacctgccagcac ctgacctacacc (SEQID NO :198)
Con4-15	117	QWSWPPCEWDPWTCQTVWPS	cagtggctcctggccgctgcga atgggaccctggacctgccaga ccgtttggcgtcc (SEQID NO :199)
Con4-9	118	GTSPSFCQWDPWTCSHMVQG	ggtacctccccgtcttctgccagt gggaccctggacctgtccac atggttcagggt (SEQID NO :200)
TN8- Con4	4	QEECEWDPWTCEHM	caggaagaatgcgaatgggaccc atggacttgcaacacatg (SEQIDNO :201)
L1-1	119	QNYKPLDELDATLYEHFIFHYT	cagaactacaaaccgctggacga actggacgtaccctgtacgaaca cttcatttccactacacc (SEQ IDNO :202)
L1-2	120	LNFTPLDELEQTLYEQWTLQQS	ctgaacttcacccgctggacgaa ctggaacagaccctgtacgaaca gtggaccctgcagcagtc (SEQIDNO :203)
L1-3	121	TKFNPLDELEQTLYEQWTLQHQ	accaaattcaaccgctggacga actggaacagaccctgtacgaac agtggaccctgcagcaccag (SEQIDNO :204)

肽	序列 鉴定 号	肽序列	举例的 DNA 序列
L1-4	122	VKFKPLDALEQTLYEHWMFQQA	gttaaattcaaaccgctggacgct ctggaacagaccctgtacgaaca ctggatgttccagcaggct (SEQIDNO :205)
L1-5	123	VKYKPLDELDEILYEQQTFQER	gttaaatacaaaccgctggacgaa ctggacgaaatcctgtacgaacag cagaccttcaggaaacgt (SEQ IDNO :206)
L1-7	124	TNFMPMDDLEQRLYEQFILQQG	accaacttcatgccgatggacgac ctggaacagcgtctgtacgaaca gttcacctcgcagcagggt (SEQIDNO :207)
L1-9	125	SKFKPLDELEQTLYEQWTLQHA	tccaaattcaaaccgctggacgaa ctggaacagaccctgtacgaaca gtggaccctgcagcacgct (SEQIDNO :208)
L1-10	126	QKFQPLDELEQTLYEQFMLQQA	cagaaattccagccgctggacga actggaacagaccctgtacgaac agtccatgtcgcagcaggct (SEQIDNO :209)
L1-11	127	QNFKPMDELEDTLKQFLFQHS	cagaacttcaaaccgatggacga attggaagacaccctgtacaaaca gttcctgttccagcactcc (SEQ IDNO :210)
L1-12	128	YKFTPLDDLEQTLYEQWTLQHV	tacaaattcaccccgctggacgac ctggaacagaccctgtacgaaca gtggaccctgcagcacgtt (SEQIDNO :211)
L1-13	129	QEYEPLDELDLTYNQWMFHQR	caggaatacgaaccgctggacga actggacgaaaccctgtacaacc agtggatgttccaccagcgt (SEQIDNO :212)

肽	序列 鉴定 号	肽序列	举例的 DNA 序列
L1-14	130	SNFMPLDELEQTLYEQFMLQHQ	tccaacttcattgcegtggacgaa ctggaacagaccctgtacgaaca gttcattgctgcagcaccag (SEQIDNO :213)
L1-15	131	QKYQPLDELDKTLYDQFMLQQG	cagaaataccagccgtggacga actggacaaaaccctgtacgatca gttcattgctgcagcagggt (SEQIDNO :214)
L1-16	132	QKFQPLDELEETLYKQWTLQQR	cagaaattccagccgtggacga actggaagaaccctgtacaaac agtggaccctgcagcagcgt (SEQIDNO :215)
L1-17	133	VKYKPLDELDEWLYHQFTLHHQ	gttaaatacaaacgtggacgaa ctggacgaatggctgtaccacca gttcaccctgcaccaccag (SEQIDNO :216)
L1-18	134	QKFMPLDELDEILYEQFMFQQS	cagaaattcattgcegtggacgaa ctggacgaaatcctgtacgaacag ttcattgtccagcagtcct (SEQ IDNO :217)
L1-19	135	QTFQPLDDLEELYEQWIRRYH	cagaccttcagccgtggacga cctggaagaatactgtacgaaca gtggatccgtcgttaccac (SEQIDNO :218)
L1-20	136	EDYMPLDALDAQLYEQFILLHG	gaagactacattgcegtggacgc tctggacgtcagctgtacgaaca gttcattcctgctgcacgggt (SEQ IDNO :219)
L1-21	137	HTFQPLDELEETLYYQWLYDQL	cacaccttcagccgtggacga actggaagaaccctgtactacca gtggctgtacgaccagctg (SEQIDNO :220)

肽	序列 鉴定 号	肽序列	举例的 DNA 序列
L1-22	138	YKFNPMDELEQTLYEFLFQHA	tacaaattcaaccgatggacgaa ctggaacagaccctgtacgaaga attcctgttccagcacgct (SEQ IDNO :221)
AC6-L1	139	TNYKPLDELDATLYEHWILQHS	accaactacaaaaccgctggacga actggacgctaccctgtacgaaca ctggatcctgcagcactcc (SEQIDNO :222)
L1-C1	140	QKFKPLDELEQTLYEQWTLQQR	cagaaattcaaaccgctggacga actggaacagaccctgtacgaac agtggaccctgcagcagcgt (SEQIDNO :223)
L1-C2	141	TKFQPLDELDQTLYEQWTLQQR	accaaattccagccgctggacga actggaccagaccctgtacgaac agtggaccctgcagcagcgt (SEQIDNO :224)
L1-C3	142	TNFQPLDELDQTLYEQWTLQQR	accaacttccagccgctggacga actggaccagaccctgtacgaac agtggaccctgcagcagcgt (SEQIDNO :225)
L1	6	KFNPLDELEETLYEQFTFQQ	aaattcaaccgctggacgagctg gaagagactctgtacgaacagttt acttttcaacag (SEQID NO :226)
Con1-1	143	AGGMRPYDGMLGWPNYDVQA	gctggtggtatgcgtccgtacgac ggtatgctgggttgccgaactac gacgttcaggt (SEQID NO :227)
Con1-2	144	QTWDDPCMHLGPVTWRRCI	cagacttgggacgatccgtgcatg cacattctgggtccggttacttggc gtcgttgcatc (SEQIDNO : 228)

肽	序列 鉴定 号	肽序列	举例的 DNA 序列
Con1-3	145	APGQRPYDGM LGWPTYQRIV	gctccgggtcagcgtccgtacga cgggtatgctgggttgccgaccta ccagcgtatcggt (SEQID NO :229)
Con1-4	146	SGQLRPC EEIFGCGTQNLAL	tccggtcagctgcgtccgtcgaa gaaatcttcggttgccgtaccag aacctggctctg (SEQID NO :230)
Con1-5	147	FGDKRPLECMFGGPIQLCPR	ttcggtgacaaacgtccgtggaa tgcattgttcggttgccgtaccag ctgtgcccgcgt (SEQID NO :231)
Con1-6	148	GQDLRPCEDMFGCGTKDWYG	ggtcaggacctgcgtccgtcgaa agacattgttcggttgccgtaccag agactggtagcgt (SEQID NO :232)
12-9-1	149	GFEYCDGMEDPFTFGCDKQT	ggtttcgaatactgcgacggtag gaagaccggttcaccttcggttgc gacaaacagacc (SEQID NO :233)
12-9-2	150	KLEYCDGMEDPFTQGCDNQS	aaactggaatactgcgacggtag gaagaccggttcacccagggttg cgacaaccagtc (SEQID NO :234)
12-9-3	151	LQEWCEGVDPFTFGCEKQR	ctgcaggaatgggtcggaagggtgtt
			gaagaccggttcaccttcggttgc gaaaaacagcgt (SEQID NO :235)

肽	序列 鉴定 号	肽序列	举例的 DNA 序列
12-9-4	152	AQDYCEGMEDPFTFGCEMQK	gctcaggactactgccaaggtatg gaagaccggttcaccttcggttgc gaaatgcagaaa (SEQID NO :236)
12-9-5	153	LLDYCEGVQDPFTFGCENLD	ctgctggactactgccaaggtgtt caggaccggttcaccttcggttgc gaaaacctggac (SEQID NO :237)
12-9-6	154	HQEYCEGMEDPFTFGCEYQG	caccaggaatactgccaaggtat ggaagaccggttcaccttcggttg cgaataccagggt (SEQID NO :238)
12-9-7	155	MLDYCEGMDDPFTFGCDKQM	atgctggactactgccaaggtatg gacgaccggttcaccttcggttgc gacaaacagatg (SEQID NO :239)
12-9-C2	156	LQDYCEGVDPFTFGCENQR	ctgcaggactactgccaaggtgtt gaagaccggttcaccttcggttgc gaaaaccagcgt (SEQID NO :240)
12-9-C1	157	LQDYCEGVDPFTFGCEKQR	ctgcaggactactgccaaggtgtt gaagaccggttcaccttcggttgc gaaaaacagcgt (SEQID NO :241)
12-9	5	FDYCEGVDPFTFGCDNH	ttcgactactgccaaggtgttgaa gaccggttcactttcggtgtgata accac (SEQIDNO :242)

[0258] 在另一个实施方案中,本发明涉及包括至少一个本发明的多核苷酸的表达载体。在另一个实施方案中,本发明涉及包括该表达载体的宿主细胞。明白宿主细胞优选是原核细胞(例如大肠杆菌细胞)或真核细胞。

[0259] 本发明还涉及含有与药学可接受载体混合的有效量的这里描述的成分的药物组合物。

[0260] 本发明还涉及抑制哺乳动物不期望的血管发生的方法,包括施用治疗有效量的这

里描述的多肽或组合物。本发明还涉及调节哺乳动物血管发生的方法,包括施用治疗有效量的这里描述的多肽或组合物。本发明还涉及抑制哺乳动物不期望的血管发生为特征的肿瘤生长的方法,包括施用治疗有效量的这里描述的多肽或组合物。另外,本发明涉及治疗哺乳动物癌症的方法,包括施用治疗有效量的这里描述的多肽或组合物,和化疗药物。在优选的实施方案中,所述化疗药物至少是 5-FU, CPT-11, 和脱乙酰基紫杉醇 (Taxotere) 中的一种。但是要明白也能使用其他合适的化疗药物和其他癌症疗法。

[0261] 本发明还涉及调节哺乳动物血管渗透性或血浆渗漏中至少一项的方法,包括施用治疗有效量的这里描述的多肽或组合物。本发明进一步涉及治疗哺乳动物中以下病症中的至少一种的方法:眼新血管病,肥胖,成血管瘤,血管瘤,动脉硬化,炎性疾病,炎性紊乱,动脉粥样硬化,子宫内膜异位,肿瘤性疾病,骨相关疾病,或者牛皮癣,包括施用治疗有效量的这里描述的多肽或组合物。

[0262] 可以明白本发明的特异结合剂能被用来治疗与失去调节的或不期望的血管发生相关的多种疾病。这样的疾病包括但不限于,眼新血管化,例如视网膜病(包括糖尿病视网膜病和与年龄相关的黄斑变性),牛皮癣,成血管瘤,血管瘤,动脉硬化,炎性疾病,例如类风湿性或风湿性炎症,特别是关节炎(包括类风湿性关节炎),或者其他慢性炎性紊乱,例如慢性哮喘,动脉或移植后动脉粥样硬化,子宫内膜异位,和肿瘤性疾病,例如所谓实体瘤和液体瘤(例如白血病)。通过施用特异结合剂能治疗的另外的疾病对于本领域技术人员是显而易见的。这样的另外的疾病包括但不限于肥胖,血管渗透,血浆渗漏,骨相关疾病,包括骨质疏松。因此,本发明进一步涉及治疗这些与失去控制或不期望的血管发生相关的疾病的方法。

[0263] 本发明的其他实施方案通过这里提供的公开内容容易变成显而易见的。

[0264] 附图的简要说明

[0265] 图 1 描述用本发明的肽抗体 TN8-Con4-C, 或者用磷酸缓冲盐水 (PBS) 治疗的携带 A-431 肿瘤的小鼠肿瘤体积 (y-轴) 对时间 (x-轴) 的曲线图。实施例中描述了详细情况。

[0266] 图 2 描述用 50 微克剂量的 2*Con4-C, L1-7-N, 或 L1-21-N 肽抗体处理过的野生小鼠的肽抗体浓度 (y-轴) 对给药后时间 (x-轴) 的曲线图。实施例中描述了详细情况。

[0267] 图 3 描述用根据本发明的肽抗体 2*Con4-C, 或者用磷酸缓冲盐水 (PBS) 或对照肽抗体处理过的携带 A431 肿瘤的小鼠肿瘤体积 (y-轴) 对时间 (x-轴) 的曲线图。实施例中描述了详细情况。

[0268] 图 4 描述代表用根据本发明的肽抗体 Con4-C, 对照肽抗体处理过的, 或者未处理的培养的 A431 细胞的体外生长的曲线图。实施例中描述了详细情况。

[0269] 图 5 描述用根据本发明的肽抗体 Con4-C, 肽抗体 L1-7-N, 肽抗体 L1-21-N, 或肽抗体 2*Con4-C, 或者用磷酸缓冲盐水 (PBS), 抗 -Ang-2 抗体 (Ab536), 或 Fc 处理过的 Colo205 肿瘤细胞的肿瘤体积 (y-轴) 对时间 (x-轴) 的曲线图。实施例中描述了详细情况。

[0270] 图 6 描述用不同剂量的根据本发明的肽抗体 2*Con4-C, 或者用磷酸缓冲盐水 (PBS), 或 Fc 处理过的携带 Colo205 异种移植肿瘤小鼠肿瘤体积 (y-轴) 对时间 (x-轴) 的曲线图。实施例中描述了详细情况。

[0271] 图 7 描述用根据本发明的肽抗体 2*Con4-C, 或者用对照肽抗体处理过的携带 Colo205 异种移植肿瘤小鼠肿瘤体积 (y-轴) 对时间 (x-轴) 的曲线图。图 7 还描述 CD31

染色面积 / 这些肽抗体总的肿瘤面积的曲线图。实施例中描述了详细情况。

[0272] 图 8 描述用根据本发明的肽抗体 2*Con4-C, 或者用磷酸缓冲盐水 (PBS), 或对照肽抗体处理过的携带 Co1o205 异种移植肿瘤小鼠肿瘤体积 (y- 轴) 对时间 (x- 轴) 的曲线图。实施例中描述了详细情况。该曲线图表明与何时开始给药无关, 抗 -Ang-2 肽抗体能抑制 Co1o205 肿瘤生长。

[0273] 图 9 描述对 A431 和 Co1o-205 异种移植模型, 使用抗体 Ab536 或者用肽抗体 2*Con4-C, 从雌性裸鼠获得的完全反应 (CR) 率的总结。实施例中描述了详细情况。

[0274] 图 10A 描述用根据本发明的肽抗体 2*Con4-C, 2*Con4-C 和脱乙酰基紫杉醇的组合, 或者用磷酸缓冲盐水 (PBS), 或用 PBS 加脱乙酰基紫杉醇处理过的携带 Co1o205 异种移植肿瘤小鼠肿瘤体积 (y- 轴) 对时间 (x- 轴) 的曲线图。实施例中描述了详细情况。

[0275] 图 10B 描述用根据本发明的肽抗体 2*Con4-C, 2*Con4-C 和 5-FU 的组合, 或者用磷酸缓冲盐水 (PBS), 或用 PBS 加 5-FU 处理过的携带 Co1o205 异种移植肿瘤小鼠肿瘤体积 (y- 轴) 对时间 (x- 轴) 的曲线图。实施例中描述了详细情况。

[0276] 图 11A 描述用根据本发明的肽抗体 2*Con4-C, 或者用磷酸缓冲盐水 (PBS), 或用对照肽抗体处理过的大鼠佐剂诱导的关节炎模型, 或者正常或关节炎对照物的爪肿胀水平 (AUC+SE) 曲线图。实施例中描述了详细情况。

[0277] 图 11B 描述用根据本发明的肽抗体 2*Con4-C, 或者用磷酸缓冲盐水 (PBS), 或用对照肽抗体处理过的大鼠佐剂诱导的关节炎模型, 或者正常或关节炎对照物的爪骨矿物质密度 (BMD) 曲线图。实施例中描述了详细情况。

[0278] 图 11C 描述用根据本发明的肽抗体 2*Con4-C, 或者用磷酸缓冲盐水 (PBS), 或用对照肽抗体处理过的大鼠佐剂诱导的关节炎模型, 或者正常或关节炎对照物的体重变化曲线图。实施例中描述了详细情况。

[0279] 图 12 描述说明 VEGF- 诱导的大鼠角模血管发生的抑制作用的两个图。第一个图描述对用牛血清白蛋白 (BSA), VEGF 加磷酸缓冲盐水 (PBS), 或 VEGF 加本发明的肽抗体 Con4-C 处理过的大鼠测定的血管数目。第二个图说明用 BSA, VEGF 加磷酸缓冲盐水 (PBS), 或 VEGF 加本发明的肽抗体 Con4-C 处理过的大鼠的血管面积。实施例中描述了详细情况。

[0280] 图 13A, 13B, 和 13C 描述分别在全长人 Ang-2 (hAng-2), hAng-2 的 N- 末端, 和 hAng-2 的 C- 末端, 对于根据本发明的肽抗体 TN8-Con4-C, L1-7-N, 和 12-9-3-C, 以及对于对照肽抗体, Tie2-Fc, C2B8, 或 5B12 的表位定位数据。实施例中描述了详细情况。

[0281] 图 14 描述利用 Sapidyne KinExA 分析测定的根据本发明的 2*Con-4-C 肽抗体的结合亲和力 (KD)。

[0282] 本发明的详细描述

[0283] 这里使用这部分的标题只是为了组织的目的, 而不是为了在任何方面限制描述的主题。

[0284] 对于重组 DNA 分子, 蛋白质, 和抗体制备, 以及对于组织培养和细胞转化可以应用标准技术。酶促反应和纯化技术一般根据厂商说明进行或者根据现有技术通常公开的使用常规方法进行, 例如 Sambrook 等 (分子克隆: 实验室手册 “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” 冷泉港实验室出版社, 冷泉港, N. Y. [1989]) 中给出的那些, 或者根据这里描述的。除非提供具体的定义, 这里描述的相关术语, 试验方法和分析化学, 合成有机化

学,药学和药剂化学技术是本领域公知的和常规使用的。标准技术可以用于化学合成,化学分析,药物制备,制剂,和送递,和对患者的治疗。

[0285] 定义

[0286] 除非另外具体说明,贯穿说明书使用的术语如下定义。

[0287] 术语“Ang-2”指美国专利 No. 6, 166, 185 的图 6 中给出的多肽(“Tie-2 配体-2”)或者其片段以及相关的多肽,包括等位变体,剪接变体,衍生物,取代,缺失,和/或插入变体,融合肽和多肽,和种间同系物或者其片段。Ang-2 多肽可以包括或可以不包括另外的末端残基,例如,前导序列,引导序列,氨基末端甲硫氨酸,和赖氨酸残基,和/或标记或融合蛋白序列,取决于制备它的方法。

[0288] 术语“生物活性”当与 Ang-2 或 Ang-2 特异性结合剂相关联使用时指具有 Ang-2 或 Ang-2 特异性结合剂的至少一种活性特征的肽或多肽。Ang-2 的特异性结合剂就 Ang-2 的至少一种生物活性来说可以具有激动剂,拮抗剂,或中和或阻断活性。

[0289] 术语“特异性结合剂”指一种分子,优选蛋白质分子,其特异结合 Ang-2,及这里定义的其变体和衍生物。一种特异性结合剂可以是一种蛋白质,肽,核酸,碳水化合物,脂质,或者优先与 Ang-2 结合的小分子量化合物。在优选的实施方案中,根据本发明的特异性结合剂是肽或肽抗体,以及其片段,变体或衍生物,或者单独地或者与其他氨基酸序列组合,是公知技术提供的。这样的技术包括但并不限于酶促裂解,化学裂解,肽合成或重组技术。本发明的抗-Ang-2 特异性结合剂能结合 Ang-2 的部分,调节,例如,抑制或促进,Ang-2 的生物活性和/或其他 Ang-2- 相关活性。

[0290] 这里使用的术语“变体”包括其中天然存在的(至少一种公知的)结合剂的氨基酸序列中的氨基酸残基被插入,缺失和/或取代的那些肽或多肽。本发明的变体包括如下所述的融合蛋白。

[0291] “衍生物”包括以不同于插入,缺失或取代的变体的一些方式化学修饰的那些结合剂。

[0292] “特异性结合 Ang-2”指本发明的特异性结合剂(例如肽抗体,或者其肽部分)识别并结合成熟的,全长或部分长度的人 Ang-2 多肽或者其直向同源物的能力,这样其亲和力(根据例如这里描述的亲和力 ELISA 或 BIAcore 分析测定)或者其中和能力(根据这里描述的例如,中和作用 ELISA 分析或类似分析来测定)至少是相同的任何其他血管生成素或其他肽或多肽的亲和力或中和能力的大小的 10 倍,但是任意地是 50 倍,100,250 或 500 倍,或者甚至至少 1000 倍,其中肽抗体的肽部分第一次与人 Fc 部分融合用于在这样的分析中评价。

[0293] 术语“表位”指在一个或多个结合剂的抗原结合区能被特异性结合剂例如肽抗体识别和结合的任何分子的部分。表位通常由化学活性表面分子基团例如氨基酸或糖基侧链组成,并且具有特异三维结构特征以及特异电荷特征。这里使用的表位可以是连续或不连续的。

[0294] 术语“抑制和/或中和表位”是一种表位,当被特异结合剂例如肽抗体结合时,它导致体内,体外,或者原位包含这样的表位的分子,细胞,或生物体的生物活性的丧失(或者至少降低)。在本发明的上下文中,中和表位位于 Ang-2 的生物活性区或者与 Ang-2 的生物活性区有关。或者,术语“活性表位”是一种表位,当被本发明的特异结合剂例如抗

体结合时,导致 Ang-2 的生物活性构象激活,或者至少维持。

[0295] 术语“肽抗体片段”指肽或多肽,其包括完全完整肽抗体的部分。

[0296] 当与象核酸分子,多肽,宿主细胞等这样的生物材料相关使用时,术语“天然存在的”指在自然界发现的没有被人改变的那些。

[0297] 术语“分离的”当与 Ang-2 相关或与 Ang-2 的特异性结合剂相关的使用时,指没有至少一种其天然环境中发现的污染多肽或化合物的化合物,优选基本上没有会干扰其治疗或诊断用途的污染哺乳动物多肽。

[0298] 术语“成熟”当与 Ang-2 肽抗体或者其片段相关使用时,或者与 Ang-2 的其他蛋白质特异性结合剂相关使用时,指没有前导序列或信号序列的肽或多肽。在例如在原核宿主细胞中表达本发明的结合剂时,“成熟”肽或多肽还可以包括另外的氨基酸残基(但是仍然没有前导序列),例如氨基末端甲硫氨酸,或者一个或多个甲硫氨酸和赖氨酸残基。可以使用用这种方法制备的肽或多肽,这些另外的氨基酸残基已经被去除或者没有被去除。

[0299] 术语“有效量”和“治疗有效量”与 Ang-2 的特异性结合剂相关使用时,指对于支持 Ang-2 的一种或几种生物活性水平可观察变化是有用的或必需的量。所述变化可以是 Ang-2 活性水平的提高或降低。优选地,所述变化是 Ang-2 活性水平的降低。

[0300] 术语“肽抗体”指包括与至少一种肽连接的抗体 Fc 结构域的分子。2000 年 5 月 4 日公开的 PCT 公开 WO 00/24782 中一般性描述了肽抗体的制备。

[0301] 这里使用的术语“变体”包括例如肽或肽-载体化合物的那些分子,例如其中这样的分子的氨基酸序列中氨基酸残基被插入,缺失和/或取代的本发明的肽抗体。具有插入的一个或多个氨基酸的变体包括下面描述的融合蛋白。

[0302] “衍生物”包括象以不同于插入,缺失或取代变体的一些方式化学修饰的肽抗体这样的那些肽和/或肽-载体化合物。

[0303] 术语“片段”指包括小于这样的肽和/或肽-载体化合物全长氨基酸序列的部分的肽和/或肽-载体化合物。这样的片段例如可以从所述肽或肽-载体化合物的氨基酸序列的氨基末端截短,羧基末端截短,和/或中间缺失一个残基而得到。从供选择的 RNA 剪接或者从体内或体外蛋白酶活性可以得到片段。通过化学肽合成方法,或者通过修饰编码肽,肽-载体化合物,或者肽抗体的 Fc 部分和/或肽部分的多核苷酸也可以构建这样的片段。

[0304] 术语“Fc”指本发明载体的一种类型,并且包括整个单体的蛋白分解消化得到的抗体的非抗原结合片段的序列,不管是单体形式还是多聚体形式。本发明中 Fc 来源优选是全人 Fc,并且可以是任何免疫球蛋白,但是 IgG1 和 IgG2 是优选的。但是,这里也包括部分人 Fc 分子,或者从非人物种获得的 Fc 分子。Fc's 由单体多肽构成,单体多肽可以通过共价键(即,二硫键)和非共价键连接成二聚体或多聚体形式。根据类别(例如, IgG, IgA, IgE)或亚类(例如, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgA2),天然 Fc 分子的单体亚基之间分子内二硫键的数目范围是 1-4。天然 Fc 的一个例子是从 IgG 的木瓜蛋白酶消化得到的二硫键键合的二聚体[参见 Ellison 等(1982), Nucl. Acids. Res. 10 :4071-9]。这里使用的术语“天然 Fc”一般是单体,二聚体,和多聚体。

[0305] 术语“Fc 结构域”包括天然 Fc 和如上定义的 Fc 变体分子和序列。关于 Fc 变体和天然 Fc's,术语“Fc 结构域”包括单体或多聚体形式的分子,不管是从整个抗体消化而来还是其他方法制备的。

[0306] 术语“多聚体”对于Fc结构域或者包括Fc结构域的分子使用时,指具有共价,非共价,或者通过共价和非共价相互作用结合的两条或几条多肽链的分子。IgG分子典型地形成二聚体;IgM,五聚体;IgD,二聚体;和IgA,单体,二聚体,三聚体,或四聚体。通过开发序列并且得到Fc天然Ig源活性或者通过将这样的天然Fc衍生化(如下定义)可以形成多聚体。

[0307] 术语“二聚体”对于Fc结构域或者包括Fc结构域的分子使用时,指具有共价或非共价结合的两条多肽链的分子。

[0308] 术语“载体”指防止治疗蛋白质降解和/或提高治疗蛋白质半寿期,降低毒性,降低免疫原性,或者提高其生物活性的分子。载体的例子包括Fc结构域以及线性聚合物(例如,聚乙二醇(PEG),多熔素,葡聚糖,等);支链聚合物(参见,例如,Denkenwalter等人的美国专利No. 4, 289, 872, 15, 1981年9月15日公布;Tam的美国专利No. 5, 229, 490, 20, 1993年7月20日公布;Frechet等的WO 93/21259, 1993年10月28日公开);脂质;胆固醇基团(例如类固醇);碳水化合物或寡糖;或者与补救受体结合的任何天然或合成蛋白质,多肽或肽。下文进一步描述载体。

[0309] 术语“衍生”和“衍生物”或“衍生化”分别包括方法和得到的产物,其中(1)化合物具有环状部分;例如,化合物中半胱氨酰残基之间的交联;(2)化合物被交联或者具有交联位点;例如,化合物具有半胱氨酰残基,因此培养物中或者体内形成交联二聚体;(3)非肽基键置换一个或多个肽基键;(4)N-末端被下面的基团置换:-NRR1, NRC(O)R1, -NRC(O)OR1, -NRS(O)2R1, -NHC(O)NHR,琥珀酰亚胺基团,或者取代的或未取代的苄氧羰基-NH-,其中R和R1和环取代基如下文定义;(5)C-末端被-C(O)R2或-NR3R4置换,其中R2,R3和R4如下文定义;和(6)通过用能与选择的侧链或末端残基反应的试剂处理而修饰其中各氨基酸部分的化合物。下文进一步描述衍生物。

[0310] 术语“肽”指大约3至大约75个氨基酸的分子,优选大约5至50个氨基酸的分子,8至40个氨基酸的分子更优选,大约10至25个氨基酸的那些分子最优选。肽可以是天然存在的或人工的(即,非天然存在的)氨基酸序列。举例的肽可以通过这里提出的任何方法制备,例如肽文库中包含的(例如,噬菌体展示文库),通过化合合成制备,通过蛋白质消化衍生,或者利用重组DNA技术制备。

[0311] 术语“药活性”指测得如此描述的物质具有影响药学参数(例如血压,血细胞量,胆固醇水平)或疾病状态(例如癌症,自身免疫失调等)的活性。

[0312] 术语“拮抗剂肽”或“抑制剂肽”指阻断或者一定程度干扰感兴趣的相关蛋白质的生物活性,或者具有与感兴趣的相关蛋白质的已知的拮抗剂或抑制剂相比的生物活性的肽。因此,术语“Ang-2-拮抗剂肽”包括鉴定为或衍生为具有Ang-2-拮抗剂特征的肽。

[0313] 另外地,这里也包括本发明的化合物的生理可接受盐。所谓“生理可接受盐”意指已知或者后来发现是药学可接受的任何盐。一些具体的例子是:乙酸盐,三氟乙酸盐,氢卤化物,例如盐酸盐和氢溴化物;硫酸烟;柠檬酸盐;酒石酸盐;乙醇酸盐;和草酸盐,甲磺酸盐,和磷酸盐。

[0314] 肽抗体

[0315] 本发明的一个方面涉及开发Ang-2肽抗体。蛋白质配体和它的受体的相互作用经常在相对大的界面发生。但是,根据对人生长激素及其受体所证明的,只有界面处几个关键

残基是大部分结合能的致因。Clackson 等, *Science* 267:383-6(1995)。大多数蛋白质配体只是展示正确拓扑学中的结合表位或者发挥与结合不相关的功能。因此,只有“肽”长度(一般 2-40 个氨基酸)的分子能结合给定大的蛋白质配体的受体蛋白质。这样的肽可以模拟大蛋白配体的生物活性(“肽激动剂”),或者,通过竞争结合,抑制大蛋白配体的生物活性(“肽拮抗剂”)。

[0316] 噬菌体展示技术是鉴定这样的肽激动剂和拮抗剂中的有力方法。参见,例如,Scott 等, *Science* 249:386(1990);Devlin 等, *Science* 249:404(1990);美国专利 No. 5, 223, 409, 1993 年 6 月 29 日;美国专利 No. 5, 733, 731, 1998 年 3 月 31 日;美国专利 No. 5, 498, 530, 1996 年 3 月 12 日;美国专利 No. 5, 432, 018, issued Jul. 11, 1995 年 7 月 11 日;美国专利 No. 5, 338, 665, 1994 年 8 月 16 日;美国专利 No. 5, 922, 545, 1999 年 7 月 13 日;WO 96/40987, 1996 年 12 月 19 日公开;和 WO 98/15833, 1998 年 4 月 16 日(这些文献在此引作参考)。在肽噬菌体展示文库中,通过与丝状噬菌体的外被蛋白融合能展示随机肽序列。如果期望,展示的肽能相对抗体-固定的受体的胞外结构域被亲和力洗脱。通过连续几轮亲和力纯化和反复持续培养可以富集保留的噬菌体。对最好的结合肽测序,鉴定肽的一个或多个结构相关家族中的关键残基。参见,例如,Cwirla 等, *Science* 276:1696-9(1997),其中鉴定了两个不同的家族。可以提出肽序列,其残基通过丙氨酸扫描或者通过 DNA 水平诱变可以被安全置换。可以制备诱变文库并且筛选,进一步优化最佳结合剂的序列。Lowman, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26:401-24(1997)。

[0317] 可以利用蛋白质-蛋白质相互作用的结构分析提出模拟大蛋白配体结合活性的肽。在这样的分析中,晶体结构可以提示从中可以设计肽的大蛋白配体的决定性残基的身份和相对取向。参加,例如,Takasaki 等, *Nature Biotech* 15:1266-70(1997)。也可以使用这些分析方法来研究受体蛋白质和噬菌体展示筛选的肽之间的相互作用,可以提出对肽的进一步修饰来提高结合亲和力。

[0318] 肽研究中有与噬菌体展示相竞争的其他方法。肽文库可以与 lac 阻抑蛋白的羧基末端融合并且在大肠杆菌中表达。另一个以大肠杆菌为基础的方法通过与肽聚糖-结合脂蛋白(PAL)融合在胞外膜上展示。下文中,这些和相关的方法通称为“E. Coli 展示”。在另一个方法中,在核糖体释放之前随机 RNA 的翻译停止,产生多肽文库,它们相关的 RNA 仍然连接着。在下文中,这种以及相关的方法通称为“核糖体展示”。其他方法利用肽与 RNA 的化学键合。参见,例如,Roberts 和 Szostak, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:12297-303(1997)。在下文中,这种以及相关的方法通称为“RNA-肽筛选”。开发化学衍生的肽文库,其中肽固定在稳定的非生物材料上,例如聚乙烯棒或溶剂可渗透树脂。另一个化学衍生的肽文库使用光刻法扫描固定在载玻片上的肽。在下文中,这种以及相关的方法通称为“化学-肽扫描”。化学-肽扫描的优点在于它让使用 D-氨基酸和其他非天然类似物,以及非肽元件。生物和化学方法综述见 Welis 和 Lowman, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 3:355-62(1992)。

[0319] 概念上,人们利用噬菌体展示和提到的其他方法可以发现任何蛋白质的肽模拟物。这些方法已经被用于表位定位,用于鉴定蛋白质-蛋白质相互作用中决定性氨基酸,这引导发现新的治疗物质。参见,例如,Cortese 等, *Curr. Opin. Biotech.* 7:616-21(1996)。现在最经常在免疫学研究中使

10(13) :19-20(1996)。

[0320] 噬菌体展示文库筛选鉴定的肽被认为引导治疗药物的研发而不是作为治疗药物本身。和其他蛋白质和肽一样,它们在体内可能通过肾滤,通过网状内皮组织细胞清除机理,或者通过蛋白水解降解作用 [Francis, (上文)] 而被快速去除。结果,目前本领域使用肽验证药物靶物或者作为通过化学文库筛选可能不会容易地或快速地鉴定的有机化合物的设计平台 [Lowman, (上文); Kay 等, (上文)]。本领域从通过其方法这样的肽能更容易地获得抗血管发生治疗药物的方法中受益。

[0321] 肽抗体的结构

[0322] 在根据本发明制备的物质成分中,肽可以通过肽的 N-末端或 C-末端与载体连接。这样,本发明的载体-肽分子可以通过下面五个化学式及其多聚体描述:

[0323]

$(X_1)_a-F_1-(X_2)_b$	(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)

[0324] 其中:

[0325] F_1 是载体 (优选 Fc 结构域);

[0326] X_1 和 X_2 各自独立地选自 $-(L_1)_c-P_1$, $-(L_1)_c-P_1-(L_2)_d-P_2$, $-(L_1)_c-P_1-(L_2)_d-P_2-(L_3)_e-P_3$, 和 $-(L_1)_c-P_1-(L_2)_d-P_2-(L_3)_e-P_3-(L_4)_f-P_4$

[0327] P_1 , P_2 , P_3 , 和 P_4 各自独立地是这里描述的药学活性肽的序列;

[0328] L_1 , L_2 , L_3 , 和 L_4 各自独立地是连接体;和

[0329] "a", "b", "c", "d", "e", 和 "f" 各自独立地是 0 或 1, 前提是 "a" 和 "b" 至少一个是 1。

[0330] 肽

[0331] 本发明涉及选择性结合或特异性结合 Ang-2 的肽。与本发明结合可以使用任何数目的这种肽,噬菌体展示,特别地,用于产生在本发明中使用的肽,已经证明对随机肽文库进行亲和力筛选能用来鉴定任何基因产物的任何位点的肽配体。Dedman 等, J. Biol. Chem. 268 :23025-30(1993)。

[0332] 通过本领域公知的任何方法可以制备本发明的肽。使用单字母氨基酸缩写。在任何序列中 (贯穿说明书始终,除非在特殊情况下另外具体说明), "X" 意思是可以存在 20 种天然存在的氨基酸残基或者非天然存在的氨基酸 (下文在提到 "变体" 时描述) 的任一种。这些肽的任一个可以串联连接 (即,顺序地),有或没有连接体,表中提供了串联连接的实施例。连接体列为 "L" 并且可以是这里描述的任何连接体。为了清楚起见,串联重复和连接体用短线隔开。任何含有半胱氨酰残基的肽可以与另一个含有 Cys- 的肽交联,其

中任一个或者两者可以与载体连接。具有一个以上 Cys 残基的任何肽还可以形成肽内二硫键。这些肽的任一个可以根据这里所述被衍生化。关于其中羧基末端可以被氨基带帽的衍生物,带帽氨基 $-NH_2$ 。对于其中氨基酸残基被氨基酸残基之外的部分取代的衍生物,S 表示取代作用,它表示 Bhatnagar 等, J. Med. Chem. 39 :3814-9 (1996), 和 Cuthbertson 等, J. Med. Chem. 40 :2876-82 (1997) 中描述的任何部分,这两篇文献被引作参考。除非另外注明,所有的肽都通过肽键连接。

[0333] 载体

[0334] 在一个实施方案中,本发明提供至少一种与至少一种载体 (F1, F2) 通过肽的一个氨基酸残基的 N- 末端, C- 末端或侧链连接。也可以使用多个载体;例如,各末端的几个 Fc 或一个末端的一个 Fc,和在另一个末端和侧链处的一个 PEG 基团。

[0335] Fc 结构域是一个优选的载体。Fc 结构域可以被用来与肽的 N- 末端或 C- 末端或者 N- 末端和 C- 末端融合。

[0336] 如上文所指出的, Fc 变体是本发明范围内合适的载体。天然 Fc 可以被广泛修饰形成根据本发明的 Fc 变体,前提是保持与救助受体结合。参见,例如 WO 97/34631 和 WO 96/32478。在这样的 Fc 变体中,人们可以去除提供本发明的融合分子不是必需的结构特征或功能活性的天然 Fc 的一个或多个位点。例如通过在所述位点取代或缺失残基,插入残基,或者截短含有所述位点的部分,人们可以去除这些位点。插入或取代的残基也可以是改变的氨基酸,例如肽模拟物或 D- 氨基酸。有很多原因使得 Fc 变体是所期望的,下面描述其中的几个。举例的 Fc 变体包括分子和序列,其中:

[0337] 1. 去除二硫键形成中涉及的位点。这样的去除可以避免与用来产生本发明的分子的宿主细胞中存在的其他含有半胱氨酸的蛋白质反应。为此目的, N- 末端含有半胱氨酸的片段可以被截短,或者半胱氨酸残基可以被缺失或者被其他氨基酸取代(例如,丙氨酰,丝氨酰)。即使当半胱氨酸残基被去除时,单链 Fc 结构域仍然能形成非共价连接在一起的二聚体 Fc 结构域。

[0338] 2. 修饰天然 Fc,使得它与选择的宿主细胞更相容。例如,人们可以去除典型天然 Fc 的 N- 末端附近的 PA 序列,它可以被大肠杆菌中的消化酶例如脯氨酸亚氨基肽酶识别。人们还可以加上一个 N- 末端甲硫氨酰残基,特别是当在细菌细胞例如大肠杆菌中重组表达该分子的时候。

[0339] 3. 去除天然 Fc 的 N- 末端的一部分,防止在选择的宿主细胞中表达时的 N- 末端不均匀性。为此目的,在 N- 末端可以缺失头 20 个氨基酸残基的任何氨基酸残基,特别是位置 1, 2, 3, 4 和 5 处的那些。

[0340] 4. 去除一个或多个糖基化位点。一般糖基化的残基(例如,天冬酰胺)可以带来细胞溶解反应。这样的残基可以被缺失或被没有糖基化的残基取代(例如,丙氨酸)。

[0341] 5. 去除与补体的相互作用中涉及的位点,例如 C1q 结合位点。例如,人们可以缺失或取代人 IgG1 的 EKK 序列。补体收集对于本发明的分子可能不是有利的,因此可以用这样一种 Fc 变体避免。

[0342] 6. 去除影响与补救受体之外的 Fc 受体结合的位点。天然 Fc 可以具有与对于本发明的融合分子不是必需的一些白细胞相互作用的位点,因此可以被去除。

[0343] 7. 去除 ADCC 位点。ADCC 位点是本领域公知的。有关 IgG1 中的 ADCC 位点,参见,

例如, Molec. Immunol. 29(5):633-9(1992)。这些位点也是对于本发明的融合分子不是必需的, 因此可以被去除。

[0344] 8. 当天然 Fc 是从非人抗体衍生的时, 天然 Fc 可以被来源化。典型地, 为了将天然 Fc 来源化, 人们可以用天然 Fc 正常发现的残基取代非人天然 Fc 中选择的残基。抗体来源化技术是本领域公知的。

[0345] 可供选择的载体可以是蛋白质, 多肽, 肽, 抗体, 抗体片段, 或者能与补救受体结合的小分子(例如, 肽模拟化合物)。例如, 热敏可以使用 Presta 等人的 1998 年 4 月 14 日公布的美国专利 No. 5, 739, 277 中描述的多肽作为载体。通过噬菌体展示也可以选择用于与 FcRn 补救受体结合的肽。这样的补救受体-结合化合物也包括在“载体”的意义中并且包括在本发明的范围内。应该对这样的载体选择延长的半寿期(例如, 通过避免蛋白酶识别的序列)和降低的免疫原性(例如, 通过抗体来源化中发现的有利的非免疫原性序列)。

[0346] 如上文指出的, 对于 F₁ 和 F₂ 也可以使用聚合物载体。现在可以获得连接用作载体的化学部分的各种方法, 参见, 例如, 专利合作条约(“PCT”)国际公开 No. WO 96/11953, 标题“N-末端化学修饰的蛋白质成分和方法”, 这里全文引作参考。该 PCT 公开其中公开了水溶性聚合物与蛋白质的 N-末端的选择性连接。

[0347] 优选的聚合物载体是聚乙二醇(PEG)。PEG 基团可以是任何常规分子量并且可以是支链或支链的。PEG 的重均分子量优选范围是大约 2 千道尔顿(“kDa”)至大约 100kDa, 更优选大约 5kDa 至大约 50kDa, 最优选大约 5 至大约 10kDa。PEG 基团一般通过 PEG 部分上的反应团(例如, 醛基, 氨基, 巯基, 或酯基)与本发明化合物上的反应团(例如, 醛基, 氨基, 或酯基)通过酰化作用或还原性烷基化作用而与本发明的化合物连接。

[0348] 合成肽的 PEG 化作用的优选策略包括, 通过在溶液中形成共轭键, 化和肽和 PEG 部分, 所述肽和 PEG 部分各自带有彼此相互反应的特定官能度。应用本领域公知的常规固相合成方法能容易地制备肽。预先在特定位置用合适的官能团将肽“预活化”在与 PEG 部分反应之前纯化母体并且完全表征。肽和 PEG 的连接通常在水相中发生并且能通过反相分析 HPLC 容易地监测。PEG 化肽能容易地通过制备 HPLC 纯化并且通过分析 HPLC, 氨基酸分析和激光解吸质谱表征。

[0349] 多糖聚合物是可以用于蛋白质修饰的水溶性聚合物的另一种类型。葡聚糖是由主要通过一个 1-6 键连接的葡萄糖的各个亚基构成的多糖聚合物。葡聚糖本身有很多分子量范围, 并且容易获得大约 1kDa 至大约 70kDa 的分子量。葡聚糖是在本发明中其本身或者与另一种载体(例如, Fc)联合用作载体的合适的水溶性聚合物。参见, 例如, WO96/11953 和 WO 96/05309。有人报道过与治疗性或诊断性免疫球蛋白偶联的葡聚糖的使用; 参见, 例如, 欧洲专利公开 No. 0315456, 在此引作参考。当将葡聚糖用作根据本发明的载体时, 大约 1kDa 至大约 20kDa 的葡聚糖是优选的。

[0350] 连接体

[0351] 所有的“连接体”是随意的。当存在时, 其化学结构不是关键的, 因为它主要作为间隔基团。连接体优选由肽键连接在一起的氨基酸制成。因此, 在优选的实施方案中, 连接体由肽键连接的 1-20 个氨基酸构成, 其中氨基酸选自 20 中天然存在的氨基酸。这些氨基酸中的一个或多个可以被糖基化, 这是本领域技术人员公知的。在更优选的实施方案中, 1-20 个氨基酸选自甘氨酸, 丙氨酸, 脯氨酸, 天冬酰胺, 谷氨酰胺, 和赖氨酸。更优选地, 连接

体由大多数无空间位阻的氨基酸例如甘氨酸和丙氨酸构成。因此,优选的连接体是聚甘氨酸(特别是 $(\text{Gly})_5$, $(\text{Gly})_8$),聚 (Gly-Ala) ,和聚丙氨酸。 Gly 和 Ala 的组合也是优选的,它是这里称作 K1 的连接体并且具有这里的实施例中提出的氨基酸序列。

[0352] 非肽连接体也是可能的。例如,能使用烷基连接体,例如 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_s-\text{C}(\text{O})-$,其中 $s = 2-20$ 。这些烷基连接体可以进一步被任何没有空间位阻的基团例如低级烷基(例如, C_1-C_6) 低级酰基,卤原子(例如, Cl , Br), CN , NH_2 , 苯基,等取代。一个举例的非肽连接体是 PEG 连接体,并且具有 100 至 5000kDa 的分子量,优选 100 至 500kDa。用和如上所述一样的方法可以改变肽连接体形成衍生物。

[0353] 变体和衍生物

[0354] 特异性结合剂的变体和衍生物包括在本发明的范围内。包括的变体是插入,缺失,和取代变体。明白本发明的特定特异性结合剂可以包含一种,两种,或所有三种类型的变体。插入和取代变体可以包含天然氨基酸,非常见氨基酸(如下文提出的),或者两者。

[0355] 在一个实施例中,提供插入变体,其中肽或肽抗体氨基酸序列中插入一个或多个氨基酸残基,或者是天然存在的或者是非常见氨基酸。插入可以位于蛋白质的一端或两端,或者可以位于肽抗体氨基酸序列的中间部分。在一个末端或者两个末端有附加残基的插入变体能包括,例如,包括氨基酸标记或标记的融合蛋白和蛋白质。插入变体包括肽和肽抗体,其中肽或肽抗体氨基酸序列或者其片段被加入一个或多个氨基酸残基。

[0356] 本发明的变体产物还包括成熟肽或肽抗体,其中去除了前导序列或信号序列,得到的蛋白质有附加的氨基末端残基,所述氨基酸可以是天然的或非天然的。包括氨基酸位置 -1 有附加的甲硫氨酰残基的特异性结合剂(例如肽抗体) (Met^{-1} -肽抗体),这些是在位置 -2 和 -1 有附加的甲硫氨酸和赖氨酸残基 (Met^{-2} - Lys^{-1} -) 的特异性结合剂。有附加的 Met , Met-Lys , Lys 残基(或一个或多个碱性残基,一般地)的变体特别用于在细菌宿主细胞中提高重组蛋白质生产。

[0357] 本发明还包括使用特异表达系统产生的具有附加的额氨基酸残基的特异性结合剂。例如,使用表达作为谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST) 融合产物的一部分的期望的多肽的商售载体提供从期望的多肽裂解 GST 成分之后在氨基酸位置 -1 具有附加的甘氨酸残基的期望的多肽。也包括在其他载体系统表达得到的变体,包括其中一般在序列的羧基和 / 或氨基末端向氨基酸序列中插入聚组氨酸标记的那些。

[0358] 插入变体还包括融合蛋白,其中肽或肽抗体的氨基和 / 或羧基末端与另一个多肽,其片段或者一般没有识别是任何特异蛋白质序列的一部分的氨基酸融合。这样的融合蛋白的例子是具有长循环半寿期的免疫原性多肽,蛋白质,例如免疫球蛋白恒定区,标记蛋白,有利于纯化期望的肽或肽抗体的蛋白质或多肽,和促进多聚体蛋白质形成的多肽序列(例如在二聚体形成 / 稳定性中有用的亮氨酸拉链结构基序)。

[0359] 这种类型的插入变体一般具有在 N- 或 C- 末端与第二多肽的全部或部分连接的天然分子的全部或大部分。例如,融合蛋白一般使用来自其他物种的前导序列以允许在异源宿主中重组表达蛋白质。另一种有用的融合蛋白包括免疫活性结构域例如抗体表位的加入,以有利于融合蛋白的纯化。融合连接处或附近裂解位点所包含的会有利于在纯化之后去除外来多肽。其他有用的融合物包括功能结构域的连接,例如来自酶的活性位点,糖基化结构域,细胞定向信号或跨膜区。

[0360] 有很多可以在本发明中使用的商售融合蛋白表达系统。特别有用的系统包括但不限于谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 系统 (Pharmacia), 麦芽糖结合蛋白系统 (NEB, Beverly, Mass.), FLAG 系统 (IBI, NewHaven, Conn.), 和 6xHis 系统 (Qiagen, Chatsworth, Calif.)。这些系统能产生只带有少数附加氨基酸的重组肽和 / 或肽抗体, 这少数附加氨基酸不可能显著影响肽或肽抗体的活性。例如, FLAG 系统和 6xHis 系统只加入短序列, 已知这两种系统免疫原性不好并且不会不利地影响多肽折叠成它的天然构象。另一种有用的 N-末端融合体是蛋白质或肽的 N-末端区 Met-Lys 二肽的融合体。这样的融合体可以产生蛋白质表达或活性的有利的提高。

[0361] 其他融合体系产生多肽杂合体, 其中期望从期望的肽或肽抗体切除融合配偶体。在一个实施方案中, 融合配偶体通过含有蛋白酶的特异识别序列的肽序列与重组肽抗体连接。合适的序列的例子是烟草 Etch 病毒蛋白酶 (Life Technologies, Gaithersburg, Md.) 或因因子 Xa (New England Biolabs, Beverly, Mass.) 识别的那些。

[0362] 本发明还提供了融合多肽, 其包括与截短的组织因子 (tTF) 组合的本发明的肽抗体或肽的全部或部分。TTF 是由作为肿瘤血管凝固剂发挥作用的人血凝固-诱导蛋白质的截短形式构成的血管靶向剂, 如美国专利 Nos. :5, 877, 289 ;6, 004, 555 ;6, 132, 729 ;6, 132, 730 ;6, 156, 321 ;和欧洲专利 No. EP 0988056 所述。TTF 与抗 -Ang-2 肽抗体或肽, 或者其片段的融合有利于抗 -Ang-2 向靶细胞的递送。

[0363] 另一方面, 本发明提供缺失变体, 其中肽或肽抗体中一个或多个氨基酸残基被去除。从肽抗体的一个或两个末端进行缺失, 或者在肽抗体氨基酸序列中去除一个或多个残基。缺失变体必须包括肽或肽抗体的所有的片段。

[0364] 另一方面, 本发明提供本发明的肽或肽抗体的取代变体。取代变体包括其中一个或多个氨基酸残基被去除或者被一个或多个供选择的氨基酸置换的那些肽和肽抗体, 其中所述氨基酸可以是天然存在的或非天然存在的。取代变体产生与原来肽或肽抗体“类似的”肽或肽抗体, 在于两个分子具有一定百分比的氨基酸是相同的。取代变体包括肽或肽抗体中 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 个氨基酸的取代作用, 其中取代的数目最多可以是肽或肽抗体的氨基酸的 10% 或更多。一方面, 取代作用性质是保守的, 但是本发明包括也是不保守的取代作用并且还包括非常规氨基酸。

[0365] 通过公知的方法能容易地计算相关的肽和肽抗体的同一性和相似性。这样的方法包括但不限于下面文献描述的那些 :Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., 编著, Oxford University Press, New York (1988) ;Biocomputing :Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., 编著, Academic Press, New York (1993) ;Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., 和 Griffin, H. G., 编著, Humana Press, New Jersey (1994) ;Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press (1987) ;Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 和 Devereux, J., 编著, M. Stockton Press, New York (1991) ;和 Carillo 等, SIAM J. Applied Math., 48 :1073 (1988)。

[0366] 设计测定两个肽或肽抗体, 或者多肽和肽的相关性或同一性百分比的优选方法, 得到测试序列之间的最大匹配。公众能够得到的计算机程序中描述了测定同一性的方法。测定两个序列之间的同一性的优选的计算机程序方法包括但不限于, GCG 程序包, 包括 GAP (Devereux 等, Nucl. Acid. Res., 12 :387 (1984) ;Genetics Computer Group, University

of Wisconsin, Madison, WI, BLASTP, BLASTN, 和 FASTA (Altschul 等, J. Mol. Biol., 215 : 403-410 (1990))。公众从 the National Center for Biotechnology Information (NCBI) 和其他来源 (BLAST Manual, Altschul 等 NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894 ; Altschul 等, 上文 (1990)) 能获得 BLASTX 程序。也可以使用公知的 Smith Waterman 算法来测定同一性。

[0367] 用于将两个氨基酸序列比对的一些比对方案可以导致两个序列只有一个短的区匹配, 这个小的比对区可以具有非常高的序列同一性, 即使两个全长序列之间没有显著相关性。因此, 在一些实施方案中, 选择的比对方法 (GAP 程序) 可以导致跨距至少是比较的靶多肽全长的 10% 对齐, 即, 比较至少 400 个氨基酸序列时至少 40 个连续的氨基酸, 比较至少 300 至大约 400 个氨基酸序列时至少 30 个连续的氨基酸, 比较至少 300 至大约 400 个氨基酸序列时至少 30 个连续的氨基酸, 比较 200 至大约 300 个氨基酸序列时至少 20 个连续的氨基酸, 比较大 100 至 200 个氨基酸序列时至少 10 个连续的氨基酸。

[0368] 例如, 利用计算机算法 GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), 将要测定序列同一性百分比的两个多肽对它们各个氨基酸进行最佳匹配比对 ("匹配跨度", 根据算法确定)。在一些实施方案中, 空位罚分 (一般计算为 3X 平均对角线; "平均对角线" 是使用的比较矩阵的对角线的平均值; "对角线" 是特定比较矩阵分配给每一个完全氨基酸匹配的分数或数目) 和空位长度罚分 (它通常是空位罚分的 1/10 倍), 并且与算法联合使用象 PAM250 或 BLOSUM 62 这样的比较矩阵。在一些实施方案中, 算法还使用标准比较矩阵 (关于 PAM 250 比较矩阵, 参见 Dayhoff 等, Atlas of Protein Sequence and Structure, 5(3) (1978) ; 关于 BLOSUM 62 比较矩阵, 参见 Henikoff 等, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89 : 10915-10919 (1992))。

[0369] 在一些实施方案中, 多肽序列比较参数包括如下:

[0370] 算法: Needleman 等, J. Mol. Biol., 48 : 443-453 (1970) ;

[0371] 比较矩阵: 上文 Henikoff 等 (1992) 的 BLOSUM 62 ;

[0372] 空位罚分: 12

[0373] 空位长度罚分: 4

[0374] 相似性阈值: 0

[0375] 使用上述参数的 GAP 程序是有用的。在一些实施方案中, 使用 GAP 算法, 上述参数对于多肽比较是默认参数 (对于末端空位没有罚分)。

[0376] 在一些实施方案中, 对于多核苷酸分子序列 (与氨基酸序列相对应) 的参数包括如下:

[0377] 算法: Needleman 等, 上文 (1970) ;

[0378] 比较矩阵: 匹配 = +10, 错配 = 0

[0379] 空位罚分: 50

[0380] 空位长度罚分: 3

[0381] 使用上述参数的 GAP 程序也是有用的。上述参数对于多核苷酸分子比较是默认参数。

[0382] 其他例举的算法, 空位罚分, 空位长度罚分, 比较矩阵, 相似性阈值等也可以使用 Program Manual, Wisconsin Package, 第 9 版, 1997 年 9 月中提出的那些。进行的具体选择对于本领域技术人员来说是显而易见的并且取决于要进行的具体比较, 例如 DNA- 与 -DNA,

蛋白质-与-蛋白质,蛋白质-与-DNA;另外,比较是否在给定序列对之间(其中一般优选 GAP 或 BestFit)或者在一个序列和一个序列的大数据库之间(其中 FASTA 或 BLASTA 是优选的)。

[0383] 如这里使用的,按常规使用 20 种常见氨基酸和它们的缩写。参见 Immunology-A Synthesis(第二版, E. S. Golub 和 D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)),这里为了所有的目的引作参考。

[0384] 氨基酸可以具有 L 或 D 立体化学(除了 Gly 之外,其即不是 L 也不是 D),并且本发明的多肽和成分可以包括立体化学的混合物。但是, L 立体化性是优选的。本发明还提供了反向分子,其中氨基酸的氨基末端至羧基末端序列是反向的。例如,具有正常序列 $X_1-X_2-X_3$ 的分子的反向应该是 $X_3-X_2-X_1$ 。本发明还提供了逆-反向分子,其中,如上所述,氨基酸的氨基末端至羧基末端序列是反向的,并且一般的“L”对映异构体的残基被改变为“D”立体异构型。

[0385] 二十种常见氨基酸的立体异构体(例如, D-氨基酸),非天然氨基酸,例如 $[\alpha]$ -, $[\alpha]$ -二取代氨基酸, N-烷基氨基酸,乳酸,和其他非常见氨基酸也是本发明的多肽的合适的成分。非常见氨基酸的例子包括但不限于:氨基脂肪酸, β -丙氨酸, β -氨基丙酸,氨基丁酸,哌啶酸,氨基癸酸,氨基庚酸,氨基异丁酸,氨基庚二酸,二氨基丁酸,锁链素,二氨基庚二酸,二氨基丙酸, N-乙基甘氨酸, N-乙基天冬酰胺,羟基赖氨酸,异-羟基赖氨酸,羟脯氨酸,异锁链素,异-异亮氨酸, N-甲基甘氨酸,肌氨酸, N-甲基异亮氨酸, N-甲基缬氨酸,新缬氨酸,正亮氨酸,鸟氨酸, 4-羟基脯氨酸, $[\gamma]$ -羧基谷氨酸, $[\epsilon]$ -N, N, N-三甲基赖氨酸, $[\epsilon]$ -N-乙酰基赖氨酸, O-磷酸丝氨酸, N-乙酰基丝氨酸, N-甲酰基甲硫氨酸, 3-甲基组氨酸, 5-羟基赖氨酸, $[\sigma]$ -N-甲基精氨酸,和其他相似氨基酸和氨基酸(例如, 4-羟基脯氨酸)。

[0386] 类似地,除非具体说明,单链多核苷酸序列的左手端是 5' 端;双链多核苷酸序列的左手方向指为 5' 方向。初始 RNA 转录本的 5' 至 3' 加入方向称作转录方向;和 RNA 具有相同序列并且是 RNA 转录本的 5' 至 5' 端的 DNA 链上的序列区称作“上游序列”;和 RNA 具有相同序列并且是 RNA 转录本的 3' 至 3' 端的 DNA 链上的序列区称作“下游序列”。

[0387] 明白氨基酸残基可以根据它们共同的侧链性质分为几类:

[0388] 1. 中性疏水:丙氨酸 (Ala ;A),缬氨酸 (Val ;V),亮氨酸 (Leu ;L),异亮氨酸 (Ile ;I),脯氨酸 (Pro ;P),色氨酸 (Trp ;W),苯丙氨酸 (Phe ;F),和蛋氨酸 (Met, M)。

[0389] 2. 中性极性:甘氨酸 (Gly ;G);丝氨酸 (Ser ;S),苏氨酸 (Thr ;T),酪氨酸 (Tyr ;Y),半胱氨酸 (Cys ;C),谷氨酰胺 (Glu ;Q),天冬酰胺 (Asn ;N),和正亮氨酸。

[0390] 3. 酸性:天冬氨酸 (Asp ;D),谷氨酸 (Glu ;E);

[0391] 4) 碱性:赖氨酸 (Lys ;K),精氨酸 (Arg ;R),组氨酸 (His ;H)。

[0392] 参见 Lewin, B., Genes V, Oxford University Press(1994), p. 11。

[0393] 保守性氨基酸取代可以包括非常见氨基酸残基,它一般是通过化学肽合成而不是通过生物系统合成而插入的。这些包括但不限于,肽模拟物和其他氨基酸部分的逆反或颠倒形式。非保守性取代可以包括将这些类中的一个变化为另一类中的一个。

[0394] 根据一些实施方案,进行这样的变化时,可以考虑氨基酸的亲水指数 (hydropathic index)。以氨基酸的疏水性和电荷特征为基础对各种氨基酸指派亲水指

数。它们是：异亮氨酸 (+4.5)；缬氨酸 (+4.2)；亮氨酸 (+3.8)；苯丙氨酸 (+2.8)；半胱氨酸 / 胱氨酸 (+2.5)；蛋氨酸 (+1.9)；丙氨酸 (+1.8)；甘氨酸 (-0.4)；苏氨酸 (-0.7)；丝氨酸 (-0.8)；色氨酸 (-0.9)；酪氨酸 (-1.3)；脯氨酸 (-1.6)；组氨酸 (-3.2)；谷氨酸 (-3.5)；谷氨酰胺 (-3.5)；天冬氨酸 (-3.5)；天冬酰胺 (-3.5)；赖氨酸 (-3.9)；和精氨酸 (-4.5)。

[0395] 本领域知晓氨基酸亲水指数在对蛋白质带来相互影响的生物学功能中的重要性。Kyte 等, J. Mol. Biol., 157:105-131(1982)。已知某些氨基酸可以被具有相似亲水指数或分数的另外的氨基酸取代而仍然保留相似的生物活性。在根据亲水指数进行变化中, 在一些实施方案中, 包括亲水指数在 ± 2 之内的氨基酸取代。在一些实施方案中, 包括亲水指数在 ± 1 之内的那些, 在一些实施方案中, 包括亲水指数在 ± 0.5 之内的那些。

[0396] 本领域还知晓, 以亲水性为基础能有效地进行类似氨基酸的取代, 特别是在由此产生的生物功能肽抗体或肽是为了在免疫实施方案中应用的情况下, 本发明情况就是如此。在一些实施方案中, 蛋白质最大局部平均亲水性, 这由其相邻氨基酸的亲水性支配, 与它的免疫原性和抗原性相关, 即, 与蛋白质的生物学性质相关。

[0397] 对这些氨基酸残基指定下面的亲水性值：精氨酸 (+3.0)；赖氨酸 (+3.0)；天冬氨酸 (+3.0 ± 1)；谷氨酸 (+3.0 ± 1)；丝氨酸 (+0.3)；天冬氨酸 (+0.2)；谷氨酰胺 (+0.2)；甘氨酸 (0)；苏氨酸 (-0.4)；脯氨酸 (-0.5 ± 1)；丙氨酸 (-0.5)；组氨酸 (-0.5)；半胱氨酸 (-1.0)；蛋氨酸 (-1.3)；缬氨酸 (-1.5)；亮氨酸 (-1.8)；异亮氨酸 (-1.8)；酪氨酸 (-2.3)；苯丙氨酸 (-2.5) 和色氨酸 (-3.4) 在根据相似亲水性值进行改变中, 在一些实施方案中, 包括其亲水性值在 ± 2 之内的氨基酸取代。在一些实施方案中, 包括亲水性值在 ± 1 之内的那些, 在一些实施方案中, 包括亲水性值在 ± 0.5 之内的那些。人们以亲水性为基础还可以鉴定主要氨基酸序列中的表位。这些区也称作“表位核心区”。

[0398] 下面表 2 中给出例示的氨基酸取代作用。

[0399] 表 2

[0400] 氨基酸取代作用

[0401]

原残基	例示的取代作用	优选的取代作用
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

原残基	例示的取代作用	优选的取代作用
Glu	Asp, Gln, Asn	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, 正亮氨酸	Leu
Leu	正亮氨酸 Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 二氨基 - 丁酸 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, 正亮氨酸	Leu

[0402] 应用公知的技术,本领域技术人员能确定这里给出的多肽的合适的变体。在一些实施方案中,本领域技术人员通过定位据信对于活性不是重要的区而可以鉴定可以改变而不破坏活性的分子的合适的区。在一些实施方案中,人们能鉴定在相似肽或多肽中保守的分子的残基和部分。在一些实施方案中,即使对生物活性或者对结构是重要的区也可以进行保守性氨基酸取代而不破坏生物学活性或者不会不利地影响多肽结构。

[0403] 另外,本领域技术人员能进行对相似多肽鉴定对于活性或结构重要的残基的结构-功能研究。考虑这样的比较,人们能预测蛋白质中相应于相似蛋白质中对于活性或结

构重要的氨基酸残基的氨基酸残基的重要性。本领域技术人员可以选择对于这样预测的重要的氨基酸残基的化学类似氨基酸取代作用。

[0404] 本领域技术人员还能分析与相似多肽中的结构相关的三维结构和氨基酸序列。考虑这样的信息,本领域技术人员可以对抗体预测有关其三维结构的氨基酸残基比对。在一些实施方案中,既然这样的残基可能在与其它分子的重要的相互作用中涉及,本领域技术人员可以选择不对预测在蛋白质表面上的氨基酸残基产生根本变化。此外,本领域技术人员可以获得在各个期望的氨基酸残基处包含单一氨基酸取代的试验变体。然后利用本领域技术人员公知的活性测定能对变体进行筛选。这样的变体可以被用来收集有关合适的变体的信息。例如,如果有人发现对特定氨基酸残基的改变导致活性破坏,不期望的降低,或者不适活性,可以避免有这样改变的变体。换句话说,根据从这样的常规实验收集的信息,本领域技术人员能容易地确定应该单独地或与其它突变组合地避免进一步的取代作用的氨基酸。

[0405] 很多科学出版物致力于二级结构的判断。参见, Moulton J., Curr. Opin. Biotech., 7(4):422-427(1996), Chou 等, Biochemistry, 13(2):222-245(1974); Chou 等, Biochemistry, 113(2):211-222(1974); Chou 等, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47:45-148(1978); Chou 等, Ann. Rev. Biochem., 47:251-276 和 Chou 等, Biophys. J., 26:367-384(1979)。此外,目前可获得辅助判断二级结构的计算机程序。一种二级结构判断方法是以同源性模型为基础的。例如,具有大于 30% 序列同一性的,或者大于 40% 相似性的两个多肽或蛋白质常常具有相似的结构拓扑学。近来蛋白质结构数据的增长(PDB)为二级结构提供了提高的可预测性,包括多肽或蛋白质结构中可能的折叠数目。参见 Holm 等, Nucl. Acid. Res., 27(1):244-247(1999)。有人提出(Brenner 等, Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3):369-376(1997))一种给定多肽或蛋白质有有限数目的折叠,而且一旦明了关键的结构数目,结构预测将变得大大地更加精确。

[0406] 确定二级结构的另外的方法包括"threading"(Jones, D., Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3):377-87(1997); Sippl 等, Structure, 4(1):15-19(1996)), "曲线分析"(Bowie 等, Science, 253:164-170(1991); Gribskov 等, Meth. Enzym., 183:146-159(1990); Gribskov 等, Proc. Nat. Acad. Sci., 84(13):4355-4358(1987)), 和"改良键合"(参见 Holm, 上文(1999), 和 Brenner, 上文(1997))。

[0407] 在一些实施方案中,肽抗体变体包括糖基化变体,其中肽抗体中加入了一个或多个糖基化位点,例如 N-连接的糖基化位点。一种 N-连接的糖基化位点特征在于序列: Asn-X-Ser 或 Asn-X-Thr, 其中指定为 X 的氨基酸残基可以是除了脯氨酸之外的任何氨基酸残基。对构成该序列的氨基酸残基的取代或加入提供加入 N-连接的糖链的可能的新的位点。或者,可以去除该序列的取代作用会去除已有的 N-连接的糖链。还提供了 N-连接的糖链的重排,其中一个或多个 N-连接的糖基化位点(一般是天然存在的那些)被去除并且产生一个或多个新的 N-连接的位点。

[0408] 本发明还提供了"衍生物",包括带有除了氨基酸残基的加入,插入,缺失,或取代之外的修饰的肽抗体。优选地,修饰作用本质是共价的,并且包括例如,与聚合物,脂质,其他有机和无机部分的化学键合。可以制备提高肽抗体的循环半寿期的本发明的衍生物,或者可以设计提高肽抗体对期望的细胞,组织,或器官的定向能力的本发明的衍生物。

[0409] 举例的衍生物包括其中进行了下面修饰作用中的一个或多个的部分：

[0410] - 一个或多个肽基 $[-C(O)NR-]$ 键合（键）被非肽键置换，所述非肽键例如 $-CH_2-$ 氨基甲酸酯 $[-CH_2-OC(O)NR-]$ ；磷酸酯键； $-CH_2-$ 磺酰胺 $[-CH_2-S(O)_2NR-]$ 键；脲 $[-NHC(O)NH-]$ 键； $-CH_2-$ 仲胺键；或烷基化肽基键 $[-C(O)NR^6-]$ ，其中 R^6 是低级烷基；

[0411] - 其中 N- 末端被衍生化为下面的基团的肽： $-NRR^1$ ； $-NRC(O)R$ 基团； $-NRC(O)OR$ 基团； $-NRS(O)_2R$ 基团； $-NHC(O)NHR$ 基团，其中 R 和 R^1 是氢或低级烷基，前提是 R 和 R^1 两者不同时是氢；琥珀酰亚胺基团；苄氧羰基 $-NH-(CBZ-NH-)$ 基团；或者苯环上带有选自低级烷基，低级烷氧基，氯，和溴的 1-3 个取代基的苄氧羰基 $-NH-$ 基团；和

[0412] - 其中游离的 C- 末端被衍生化为下面基团的肽： $-C(O)R^2$ ，其中 R^2 选自低级烷基和 $-NR^3R^4$ ，其中 R^3 和 R^4 独立地选自氢和低级烷基。所谓“烷基”意思是具有 1-6 个碳原子的基团。

[0413] 另外，通过使肽的目标氨基酸残基与能与选择的侧链或末端残基反应的有机衍生化试剂反应，可以向本发明的多肽或成分引入各个氨基酸的修饰作用。下面是例子：

[0414] 赖氨酰和氨基末端残基可以与琥珀酸酐或其他羧酸酐反应。与这些试剂的衍生化作用具有改变赖氨酰残基电荷的作用。用于将含有 α -氨基残基衍生化的其他合适的试剂包括亚氨酸酯，例如吡啶亚氨酸甲酯；磷酸吡哆醛；吡哆醛；氯硼氢化物；三硝基苯磺酸；O- 甲基异脲；2,4- 戊二酮；和与乙醛酸酯的转氨酶催化的反应。

[0415] 精氨酰残基可以通过与一种或几种常规试剂的反应而被修饰，所述常规试剂其中包括苯甲酰甲醛，2,3- 丁二酮，1,2- 环己二酮，和水和茚三酮。精氨酸残基的衍生化作用要求在碱性条件下进行反应，因为胍官能团的高 pKa。此外，这些试剂可以与赖氨酸的基团以及精氨酸胍基反应。

[0416] 酪氨酰残基本身的特定修饰已经被充分研究，通过与芳香重氮化合物或四硝基甲烷反应对酪氨酰残基引入光谱标记特别令人感兴趣。最常见地，可以使用 N- 乙酰基咪唑和四硝基甲烷分别生成 O- 乙酰基酪氨酰物质和 3- 硝基衍生物。

[0417] 羧基侧基（天冬氨酰或谷氨酰）通过与碳化二亚胺（ $R'-N-C=N-R'$ ）的反应而被选择性修饰，例如 1- 环己基-3-(2- 吗啉基-(4- 乙基) 碳化二亚胺或 1- 乙基-3-(4- 氮阳离子-4,4- 二甲基戊基) 碳化二亚胺。此外，通过与铵离子反应可以将天冬氨酰和谷氨酰残基转化为天冬氨酰胺和谷氨酰胺残基。

[0418] 常常将天冬氨酰胺和谷氨酰胺残基去酰氨基得到相应的谷氨酰和天冬氨酰残基。或者，可以在温和的酸性条件下将这些残基去酰氨基。这两种残基形式都在本发明的范围内。

[0419] 使用双功能化试剂的衍生化作用使肽或者它们的功能衍生物与水不溶性载体基体或者与其他大分子载体交联。通常使用的交联剂包括，例如，1,1- 双（二偶氮乙酰基）-2- 苯乙烷，戊二醛，N- 羟基琥珀酰亚胺酯，例如，与 4- 叠氮基水杨酸的酯，均双功能亚氨酯，包括二琥珀酰亚胺酯，例如 3,3'- 二硫双（琥珀酰亚胺丙酸酯），和双功能马来酰亚胺，例如双-N- 马来酰亚胺-1,8- 辛烷。衍生化试剂例如甲基-3-[(p- 叠氮基苯基) 二硫] 丙酰亚氨酯得到在光照下能形成交联的光活性中间体。或者，对于蛋白质固定化作用可以使用反应性水不溶性基体，例如溴化氰-活化的碳水化合物和美国专利 Nos. 3,969,287；3,691,016；4,195,128；4,247,642；4,229,537；和 4,330,440 中描述的反应底物。

[0420] 其他可能的修饰作用包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化作用,丝氨酸或苏氨酸残基的羟基的磷酸化作用,Cys 中硫原子的氧化作用,赖氨酸,精氨酸,和组氨酸侧链的 α -氨基的甲基化作用 (Creighton, T.E., *Proteins: Structure and Molecule Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), N-末端胺的乙酰化作用,和,在某些情况下, C-末端羧基的酰胺化作用。

[0421] 这样的被衍生化的部分优选改善了一项或几项特征,包括化合物的抗-血管发生活性,溶解性,吸收性,生物学半寿期等。或者,被衍生化的部分可以产生与没有衍生化的化合物相同或基本上相同的特征和/或性质。或者所述部分可以消除或减轻化合物的不期望的副作用等。

[0422] 而且,本发明的化合物可以在 DNA 上加以改变。可以将本发明的任何部分的 DNA 序列变化为与选择的宿主细胞更加适合。关于大肠杆菌,它是优选的宿主细胞,优化密码子是本领域公知的。密码子可以被取代,去除限制位点或者使包括沉默限制位点,这有助于 DNA 在优选的宿主细胞中表达。可以对载体,连接体和肽 DNA 序列进行修饰,使包括上述任何序列变化。这样,这里讨论的所有的修饰,取代,衍生化作用等同样适用于本发明的所有方面,包括但不限于肽,肽二聚体和多聚体,连接体和载体。

[0423] 另外,本领域技术人员能分析鉴定对于活性或结构重要的相似肽中残基的结构-功能研究。考虑这样的比较,人们能预知相应于相似肽中对活性或结构重要的氨基酸残基的肽中氨基酸残基的重要性。本领域技术人员对于肽的这样的预知重要的氨基酸残基可以选择化学相似氨基酸取代。

[0424] 本领域技术人员还能分析与相似多肽中的结构相关的三维结构和氨基酸序列。考虑这样的信息,本领域技术人员可以对肽预测有关其三维结构的氨基酸残基比对。既然这样的残基可能与其他分子的重要的相互作用中涉及,本领域技术人员可以选择不对预测在蛋白质表面上的氨基酸残基产生根本变化。此外,本领域技术人员可以获得在各个期望的氨基酸残基处包含单一氨基酸取代的试验变体。然后利用本领域技术人员公知的活性测定能对变体进行筛选。这样的数据可以被用来收集有关合适的变体的信息。例如,如果有人发现对特定氨基酸残基的改变导致活性破坏,不期望的降低,或者不适活性,可以避免有这样改变的变体。换句话说,根据从这样的常规实验收集的信息,本领域技术人员能容易地确定应该单独地或与其他突变组合地避免进一步的取代作用的氨基酸。

[0425] 很多科学出版物致力于二级结构的判断。参见, Moulton J., *Curr. Op. Biotech.*, 7(4):422-427 (1996), Chou 等, *Biochemistry*, 13(2):222-245 (1974); Chou 等, *Biochemistry*, 113(2):211-222 (1974); Chou 等, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 47:45-148 (1978); Chou 等, *Ann. Rev. Biochem.*, 47:251-276 和 Chou 等, *Biophys. J.*, 26:367-384 (1979)。此外,目前可获得辅助判断二级结构的计算机程序。一种二级结构判断方法是以同源性模型为基础的。例如,具有大于 30% 序列同一性的,或者大于 40% 相似性的两个多肽或蛋白质常常具有相似的结构拓扑学。近来蛋白质结构数据的增长 (PDB) 为二级结构提供了提高的可预测性,包括多肽或蛋白质结构中可能的折叠数目。参见 Holm 等, *Nucl. Acid. Res.*, 27(1):244-247 (1999)。有人提出 (Brenner 等, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 7(3):369-376 (1997)) 一种给定多肽或蛋白质有有限数目的折叠,而且一旦明了关键的结构数目,结构预测将变得大大地更加精确。

[0426] 确定二级结构的另外的方法包括 "threading" (Jones, D., Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3):377-87(1997); Sippl 等, Structure, 4(1):15-19(1996)), "曲线分析" (Bowie 等, Science, 253:164-170(1991); Gribskov 等, Meth. Enzym., 183:146-159(1990); Gribskov 等, Proc. Nat. Acad. Sci., 84(13):4355-4358(1987)), 和 "改良键合" (参见 Holm, 上文 (1999), 和 Brenner, 上文 (1997))。

[0427] 本发明进一步包括衍生的特异性结合剂, 例如肽抗体, 被共价修饰包括一个或多个水溶性聚合物连接, 例如聚乙二醇, 聚氧乙二醇, 或聚丙二醇, 描述于美国专利 Nos.: 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192; 和 4,179,337。本领域公知的其他有用的聚合物包括一甲氧基-聚乙二醇, 葡聚糖, 纤维素或者其他以碳水化合物为基础的聚合物, 聚-(N-乙烯基吡咯烷酮)-聚乙二醇, 丙二醇均聚物, α -聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物, 聚氧乙基化多元醇 (例如, 甘油) 和聚乙烯醇, 以及这些聚合物的混合物。特别优选的是用聚乙二醇 (PEG) 亚基共价修饰的肽抗体。水溶性聚合物可以在特定位置例如在肽抗体的氨基末端键合, 或者与多肽的一个或多个侧链随机连接。2000 年 10 月 17 日公布的 Gonzales 等人的美国专利 No. 6,133,426 描述了用于提高对特异性结合剂例如肽抗体, 和对于人源化抗体的治疗能力的 PEG 的使用。

[0428] 本发明还包括将化合物的肽和/或载体部分衍生化。这样的衍生物可以提高化合物的溶解性, 吸收性, 生物学半寿期等。或者, 被衍生化的部分可以消除或减小化合物的任何不期望的副作用等。举例的衍生物包括化合物, 其中:

[0429] 1. 化合物或者不其某些部分是环状的。例如, 可以对肽部分进行修饰使得包含两个或多个 Cys 残基 (例如, 连接体), 其可以通过形成二硫键而环化。

[0430] 2. 化合物被交联或者使得能在分子之间交联。例如, 可以对肽部分修饰使包含一个 Cys 残基, 从而与相似分子能形成分子间二硫键。化合物还可以通过其 C-末端被交联。

[0431] 3. 一个或多个一个或多个肽基 $[-C(O)NR-]$ 键合 (键) 被非肽键置换。举例的非肽键是 $-CH_2-$ 氨基甲酸酯 $[-CH_2-OC(O)NR-]$; 磷酸酯键; $-CH_2-$ 磺酰胺 $[-CH_2-S(O)_2NR-]$ 键; 脲 $[-NHC(O)NH-]$ 键; $-CH_2-$ 仲胺键; 和烷基化肽 $[-C(O)NR^6-]$, 其中 R^6 是低级烷基;

[0432] 4. N-末端被衍生化。典型地, N-末端可以被酰基化或者被修饰成取代的胺。举例的 N-末端衍生化基团包括: $-NRR_1$ (不包括 $-NH_2$); $-NRC(O)R_1$; $-NRC(O)OR_1$; $-NRS(O)_2R_1$; $-NHC(O)NHR_1$, 琥珀酰亚胺, 或苄氧羰基 $-NH-(CBZ-NH-)$, 其中 R 和 R_1 各自独立地是氢或低级烷基, 并且其中苯环可以被选自 C_1-C_4 烷基, C_1-C_4 烷氧基, 氯, 和溴的 1-3 个取代基取代。

[0433] 5. 游离的 C-末端被衍生化。典型地, C-末端被酯化或酰胺化。例如, 人们可以应用现有技术描述的方法对本发明的化合物在 C-末端加上 $(NH-CH_2-CH_2-NH_2)_2$ 。同样, 人们可以应用现有技术描述的方法对本发明的化合物在 C-末端加上 $-NH_2$, 举例的 C-末端衍生基团包括, 例如, $-C(O)R_2$, 其中 R_2 是低级烷基或 $-NR_3R_4$, 其中 R_3 和 R_4 独立地是氢或 C_1-C_8 烷基 (优选 C_1-C_4 烷基)。

[0434] 6. 二硫键被另一个, 优选更稳定的, 交联部分 (例如亚烷基) 置换。参见, 例如, Bhatnagar (上文); Alberts 等, Thirteenth Am. Pep. Symp., 357-9(1993)。

[0435] 7. 一个或多个各氨基酸残基被修饰。已知不同的衍生化试剂与选择的侧链或末端残基特异反应, 如下面详细描述。

[0436] 赖氨酰和氨基末端残基可以与琥珀酸酐或其他羧酸酐反应,它改变赖氨酰残基的电荷。用于将含有 α -氨基残基衍生化的其他合适的试剂包括亚氨酸酯,例如吡啶亚氨酸甲酯;磷酸吡哆醛;吡哆醛;氯硼氢化物;三硝基苯磺酸;O-甲基异脲;2,4-戊二酮;和与乙醛酸酯的转氨酶催化的反应。

[0437] 精氨酰残基可以通过与一种或几种常规试剂的反应而被修饰,所述常规试剂其中包括苯甲酰甲醛,2,3-丁二酮,1,2-环己二酮,和水和茚三酮。精氨酸残基的衍生化作用要求在碱性条件下进行反应,因为胍官能团的高 pKa。此外,这些试剂可以与赖氨酸的基团以及精氨酸胍基反应。

[0438] 酪氨酰残基的特定修饰已经被充分研究,通过与芳香重氮化合物或四硝基甲烷反应对酪氨酰残基引入光谱标记特别令人感兴趣。最常见地,可以使用 N-乙酰基咪唑和四硝基甲烷分别生成 O-乙酰基酪氨酰物质和 3-硝基衍生物。

[0439] 羧基侧基(天冬氨酰或谷氨酰)通过与碳化二亚胺($R'-N-C=N-R'$)的反应而被选择性修饰,例如 1-环己基-3-(2-吗啉基-(4-乙基)碳化二亚胺或 1-乙基-3-(4-氮阳离子-4,4-二甲基戊基)碳化二亚胺。此外,通过与铵离子反应可以将天冬氨酰和谷氨酰残基转化为天冬氨酰胺和谷氨酰胺残基。

[0440] 将天冬氨酰胺和谷氨酰胺残基去酰氨基得到相应的谷氨酰和天冬氨酰残基。或者,可以在温和的酸性条件下将这些残基去酰氨基。这两种残基形式都在本发明的范围内。

[0441] 半胱氨酰残基能被氨基酸残基或者其他部分置换,以消除二硫键或者,相反地,稳定交联。参见,例如, Bhatnagar, (上文)。

[0442] 使用双功能化试剂的衍生化作用使肽或者它们的功能衍生物与水不溶性载体基体或者与其他大分子载体交联。通常使用的交联剂包括,例如,1,1-双(二偶氮乙酰基)-2-苯乙烷,戊二醛,N-羟基琥珀酰亚胺酯,例如,与 4-叠氮基水杨酸的酯,均双功能亚氨酸酯,包括二琥珀酰亚胺酯,例如 3,3'-二硫双(琥珀酰亚胺丙酸酯),和双功能马来酰亚胺,例如双-N-马来酰亚胺-1,8-辛烷。衍生化试剂例如甲基-3-[(p-叠氮基苯基)二硫]丙酰亚氨酸酯得到在光照下能形成交联的光活性中间体。或者,对于蛋白质固定化作用可以使用反应性水不溶性基体,例如溴化氰-活化的碳水化合物和美国专利 Nos. 3,969,287; 3,691,016;4,195,128;4,247,642;4,229,537;和 4,330,440 中描述的反应底物。

[0443] 碳水化合物(寡糖)基团可以方便地与已知的蛋白质中的糖基化位点连接。一般情况下,当它们是序列 Asn-X-Ser/Thr 的一部分,其中 X 可以是除了脯氨酸的任何氨基酸时, O-连接寡糖连接丝氨酸(Ser)或苏氨酸(Thr)残基,而 N-连接寡糖连接天冬酰胺(Asn)残基。X 优选是除了脯氨酸之外的 19 中天然存在的氨基酸中的一种。各种类型中发现的 N-连接和 O-连接寡糖和糖残基的结构是不同的。在这两者中都发现的一种类型的糖是 N-乙酰基神经氨酸(称作唾液酸)。唾液酸常常是 N-连接和 O-连接寡糖的末端残基,而且由于其负电荷,可以给糖基化化合物带来酸性性质。可以在本发明的化合物的连接体中插入这样的位点,并且优选在多肽化合物的重组产生过程中由细胞糖基化(例如,在哺乳动物细胞中,例如 CHO, BHK, COS)。但是,这样的位点可以被本领域公知的合成或半合成过程进一步糖基化。

[0444] 其他可能的修饰作用包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化,丝氨酰或苏氨酰残基的

羟基的磷酸化, Cys 中硫原子的氧化, 赖氨酸, 精氨酸, 和组氨酸侧链的 α -氨基的甲基化 [Creighton, Proteins: Structure and Molecule Properties (W.H. Freeman & Co., San Francisco), pp. 79-86 (1983)]。

[0445] 本发明的化合物可以在 DNA 水平上加以改变。可以将化合物的任何部分的 DNA 序列变化为与选择的宿主细胞更加适合。关于大肠杆菌, 它是优选的宿主细胞, 优化密码子是本领域公知的。密码子可以被取代, 去除限制位点或者使包括沉默限制位点, 这有助于 DNA 在优选的宿主细胞中表达。可以对载体, 连接体和肽 DNA 序列进行修饰, 使包括上述任何序列变化。

[0446] 亲和力成熟

[0447] 本发明的一个实施方案包括“亲和力成熟”肽和肽抗体。该方法包括利用噬菌体展示或者其他筛选技术提高本发明的肽和肽抗体的亲和力或生物活性。以共有序列为基础(为了收集相关的肽而产生), 能产生定向二级噬菌体展示文库, 其中“核心”氨基酸(从共有序列确定)保持不变或者出现频率有偏好。或者, 能使用各个肽序列产生有偏好的, 定向噬菌体展示文库。对这样的文库筛选能得到获得增强的与 Ang-2 的结合或者具有提高的生物活性的肽(其可以转化为肽抗体)。

[0448] 非肽类似物 / 蛋白质模拟物

[0449] 此外, 也包括提供稳定结构或减小生物降解性的肽的非肽类似物。在选择抑制肽的基础上通过非肽部分置换一个或多个残基能制备肽模拟物类似物。优选地, 非肽部分允许肽保留它的天然构象, 或者稳定一种优选的, 例如, 生物活性构象, 它保留识别和结合 Ang-2 的能力。一方面, 得到的类似物 / 模拟物显示对 Ang-2 的提高了的结合亲和力。Nachman 等, Regul. Pept. 57:359-370 (1995) 中描述了从肽制备非肽模拟物类似物的方法的一个例子。如果期望, 例如通过本发明肽的糖基化作用, 酰胺化作用, 羧酸化作用, 或磷酸化作用, 或者通过产生酸加成盐, 酰胺, 酯, 特别是 C-末端酯, 和 N-酰基衍生物, 能修饰本发明的肽。通过与其他部分形成共价或非共价复合物, 也可以对肽抗体加以修饰, 产生肽衍生物。通过在 N-或 C-末端使化学部分与包括肽抗体的氨基酸的侧链上的官能团连接能制备共价结合的复合物。

[0450] 特别地, 预见所述肽能与报道基团结合, 包括但不限于放射性标记, 荧光标记, 酶(例如, 催化测热反应或荧光反应), 底物, 固体基体, 载体(例如, 生物素或抗生物素蛋白)。因此, 本发明提供一种包括肽抗体的分子, 其中所述分子优选进一步包括选自放射性标记, 荧光标记, 酶, 底物, 固体基体, 载体的报道基团。这样的标记是本领域技术人员公知的, 例如, 特别包括生物素标记。这样的标记的应用是本领域技术人员公知的, 并且描述于, 例如, 美国专利 Nos. 3, 817, 837 ; 3, 850, 752 ; 3, 996, 345 ; 和 4, 277, 437。有用的其他标记包括但不限于放射性标记, 荧光标记和化学发光标记。涉及使用这样的标记物的美国专利包括, 例如美国专利 Nos. 3, 817, 837 ; 3, 850, 752 ; 3, 939, 350 ; 和 3, 996, 345。本发明的任何肽抗体可以包括任何这些标记的一个, 两个, 或多个。

[0451] 制备肽的方法

[0452] 应用各种各样的本领域公知的技术能制备本发明的肽。例如, 根据常规技术可以在溶液中或者在固相载体上合成这样的肽。各种各样的自动合成仪是商业上可获得的并且可以根据公知的方法使用。参见, 例如, Stewart 和 Young (上文); Tam 等, J. Am. Chem. Soc.,

105:6442, (1983); Merrifield, Science 232:341-347 (1986); Barany 和 Merrifield, The Peptides, Gross and Meienhofer, 编著, Academic Press, New York, 1-284; Barany 等, Int. J. Pep. Protein Res., 30:705-739 (1987); 和美国专利 No. 5, 424, 398, 各篇文献在此引作参考。

[0453] 固相肽合成方法使用共聚(苯乙烯-二乙烯基苯), 含有 0.1-1.0mM 胺/克聚合物。这些肽合成方法使用丁基氧羰基(t-BOC)或 9-芴基甲氧羰基(FMOC)保护 α -氨基。两种方法都涉及分步合成, 从肽的 C-末端开始每一步加上一个氨基酸(参见, Coligan 等, Curr. Prot. Immunol., Wiley Interscience, 1991, 第 9 单元)。完成化学合成时, 可以将合成肽去保护, 去除 t-BOC 或 FMOC 氨基保护基团并且降低的温度下用酸处理从聚合物上裂解下来(例如, 液体 HF-10% 茴香醚在 0°C 下处理大约 0.25 至大约 1 小时)。蒸发溶剂之后, 用 1% 乙酸溶液从聚合物萃取出肽, 然后冻干, 得到粗产物。一般通过象在 Sephadex G-15 上使用 5% 乙酸作为溶剂进行凝胶过滤这样的技术进行纯化。将过柱的合适的级分冻干得到同质肽或肽衍生物, 然后用标准技术进行表征, 象氨基酸分析, 薄层色谱法, 高效液相色谱法, 紫外吸收光谱法, 摩尔旋光, 溶解性, 并且通过固相埃德曼降解定量测定。

[0454] 其他方法, 列从噬菌体展示文库选择肽, 也是可行的。可以从这里描述的数组氨基酸制备文库。噬菌体展示在鉴定根据本发明有用的肽中是特别有效的。简要地说, 制备一个噬菌体文库(使用例如 ml 13, fd, 或 λ 噬菌体), 展示 4 至大约 80 个氨基酸残基的插入片段。插入片段可以代表, 例如完全简并的或偏好排列。然后人们能选择与期望的抗原结合的噬菌体带有的插入片段。该方法通过与期望的抗原结合的噬菌体的几轮反复筛选能重复进行。重复几轮导致带有特定序列的噬菌体的富集。能进行 DNA 序列分子来鉴定表达肽的序列。能测定与期望的抗原结合的序列的最小线性部分。人们使用包含包含最小线性部分的部分或全部加一个或多个另外的其上游或下游简并残基的插入片段的偏好文库(biased library)能重复该方法。这些技术可以鉴定具有比其中已经鉴定的试剂大的结合亲和力的本发明的肽。

[0455] 不管制备肽的方法, 应用标准重组 DNA 方法能制备编码各种肽和肽抗体的核酸分子。适当操作这样的 DNA 分子的核苷酸序列, 不改变它们编码的氨基酸序列, 解释核酸密码子的简并性并且解释特定宿主细胞中密码子偏好。

[0456] 重组 DNA 技术是制备本发明的全长肽抗体和其他蛋白质特异性结合剂或者其片段的常规方法。可以将编码肽抗体或片段的 DNA 分子插入表达载体, 其接着可以被插入宿主细胞产生抗体或片段。

[0457] 一般情况下, 应用这里实施例中描述的方法能获得编码肽或肽抗体的 DNA 分子。探针和典型的杂交条件是 Ausubel 等 (Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols Press [1994]) 中提出的那些。杂交之后, 根据象探针大小, 克隆的探针的期望的同源性, 筛选的文库的类型, 和筛选的克隆的数目这样的因素, 在合适的严谨度下洗涤探针印迹。高严谨度筛选的例子是在 50-65°C 之间的温度下, 0.1XSSC, 和 0.1% SDS。

[0458] 也可以应用酵母二次杂交筛选来鉴定与 Ang-2 结合的本发明的肽。因此, 可以使用抗原或者其片段来筛选肽文库, 包括噬菌体展示文库, 来鉴定和筛选 Ang-2 结合剂, 例如本发明的肽抗体。

[0459] 或者, 可以使用各种各样的表达载体/宿主系统使包含和表达本发明的肽。这些

系统包括但不限于微生物,例如重组噬菌体,质粒或粘粒 DNA 表达载体转化的细菌;酵母表达载体转化的酵母;病毒表达载体(例如,杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒,CaMV;烟草花叶病毒,TMV)转染的或者细菌表达载体(例如,Ti 或 pBR322 质粒)转化的植物细胞体系;或者动物细胞体系。重组蛋白质生产中有用的哺乳动物细胞包括但不限于 VERO 细胞,HeLa 细胞,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系,COS 细胞(例如 COS-7),W138,BHK,HepG2,3T3,RIN,MDCK,A549,PC12,K562 和 293 细胞。下文描述重组表达肽的例示方法。

[0460] 术语“表达载体”指用于 DNA(RNA) 序列表达多肽的质粒,噬菌体,病毒或载体。一个表达载体包括转录单元,包括下面结构的组装(1)遗传元件或者在基因表达中具有调节作用的元件,例如启动子或增强子,(2)被转录到 mRNA 中并且翻译成蛋白质的编码结合剂的结构或序列,和(3)合适的转录起始和终止序列。要在酵母或真核表达系统中使用的结构单元优选包括使宿主细胞分泌翻译的蛋白质的前导序列。或者,没有前导序列或转运序列表达重组蛋白质的情况下,可以包括氨基末端甲硫氨酰残基。这种残基可以或不接着从表达的重组蛋白裂解,提供肽终产物。

[0461] 例如,使用商售表达系统,例如 Pichia 表达系统(Invitrogen, San Diego, Calif.),根据生产商的说明,可以在酵母中重组表达肽。这种系统还依赖指导分泌的前-原- α 序列,但是甲醇诱导时醇氧化酶(AOX1)启动子驱动插入片段的转录。

[0462] 通过,例如,用来从细菌和哺乳动物细胞上清液纯化肽的方法,从酵母培养基纯化分泌的肽。

[0463] 或者,可以将编码肽的 cDNA 克隆到杆状病毒表达载体 pVL1393(PharMingen, San Diego, Calif.)中。可以根据生产商说明(PharMingen)使用这种载体在没有 sF9 蛋白质的培养基中感染 *Spodoptera frugiperda* 细胞,产生重组蛋白。使用肝素-琼脂糖凝胶柱(Pharmacia)纯化并浓缩重组蛋白。

[0464] 或者,在昆虫系统中表达肽。用于蛋白质表达的昆虫系统是本领域技术人员公知的。在一个这样的系统中,苜蓿银纹夜蛾核型内多角体病毒(AcNPV)能被用作在草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞或粉纹夜蛾(*Trichoplusia*)幼虫中表达外源基因的载体。可以将肽编码序列克隆到病毒的不重要的区,例如多角体蛋白基因,并且置于多角体蛋白启动子的控制下。成功插入肽会使得多角体蛋白基因失活,并且产生没有外被蛋白外壳的重组蛋白。可以使用重组病毒感染草地夜蛾细胞或粉纹夜蛾幼虫,表达肽。Smith 等, J. Virol. 46:584(1983);Engelhard 等, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 91:3224-7(1994)。

[0465] 在另一个实施例中,通过 PCR 能扩增编码肽的 DNA 序列,并且克隆到合适的载体中,例如, pGEX-3X(Pharmacia)。设计 pGEX 载体产生包括谷胱甘肽-S-转移酶(GST)的载体编码的融合蛋白,和通过插入到载体克隆位点中的 DNA 片段编码的蛋白质。能制备包括例如一个合适的酶切位点的 PCR 引物。仅使用有利于表达的融合部分或者另外不期望与感兴趣的肽连接,然后从融合蛋白的 GST 部分切割下来重组融合蛋白。pGEX-3X/ 特异结合剂肽构建体被转化到大肠杆菌 XL-1 Blue 细胞(Stratagene, La Jolla Calif.)中,并且分离各个转化体并且培养。纯化各个转化体的质粒 DNA,并且使用自动测序仪部分测序,证实以合适的反向编码核酸插入片段的期望的特异性结合剂的存在。

[0466] 本发明的一些肽成分是其肽抗体与任何抗肿瘤肽例如肿瘤坏死因子(TNF)偶

合的那些。在特别优选的方法中, TNF- 特异性结合剂肽嵌合体被制备成在读框内编码肽的序列与 TNF (Novagen, Madison, Wis.) 编码序列融合的重组融合体。肽 -TNF cDNA 可以被克隆到 pET-11b 在 (Novagen) 中, 并且根据 pET11b 生产商的说明能诱导 TNF- 肽在 BL21 大肠杆菌中表达。通过硫酸铵沉淀法, 在 Phenyl-Sepharose6Fast Flow 上进行的疏水性相互作用色谱法, 在 DEAE-SepharoseFast Flow 上进行的离子交换色谱法, 和在 Sephacryl-S-300HR 上进行的凝胶过滤色谱法, 能从细菌溶胞产物纯化可溶性 TNF- 肽。

[0467] 可以如下纯化融合蛋白, 所述融合蛋白被制备成细菌中的不溶性胞涵物。离心破坏宿主细胞; 在 0.15M NaCl, 10mM Tris, pH 8, 1mM EDTA 中洗涤; 并且在室温下用 0.1 毫克/毫升溶菌酶 (Sigma, St. Louis, Mo.) 处理 15 分钟。超声处理澄清溶胞产物, 并且通过以 12,000Xg 离心 10 分钟沉积细胞碎屑。将含有融合蛋白的沉淀重新悬浮于 50mM Tris, pH8, 和 10mM EDTA, 用 50% 甘油分层, 并且以 6,000Xg 离心 30 分钟。将沉淀重新悬浮于没有 Mg⁺⁺ 和 Ca⁺⁺ 的标准盐酸缓冲盐溶液 (PBS) 中。通过将重新悬浮的沉淀在变性 SDS-PAGE (Sambrook 等, 上文) 中分级分离而进一步纯化。凝胶在 0.4M KCl 中浸透, 显现蛋白质, 将其切下并且在没有 SDS 的凝胶展开缓冲液中电洗脱。如果在细菌中产生的 GST/ 融合蛋白是可溶蛋白, 可以利用 GSTPurification Module (Pharmacia) 将其纯化。

[0468] 可以对融合蛋白进行消化, 从本发明的肽切割 GST。0.5ml PBS 中的消化反应 (20-40mg 融合蛋白, 20-30 单位的人凝血酶 (4000U/mg, Sigma) 可以在室温下温育 16-48 小时并且加载到变性 SDS-PAGE 凝胶上, 有利于将反应产物分级分离。凝胶在 0.4M KCl 中浸透, 显现蛋白质泳带。通过使用自动测序仪 (Applied Biosystems Model 473A, Foster City, Calif.) 通过氨基酸序列分析能证实相应于期望的肽分子量的蛋白质泳带的特性。或者, 通过对肽进行 HPLC 和 / 或质谱能证实蛋白质泳带的特性。

[0469] 或者, 将编码肽的 DNA 序列克隆到含有期望的启动子和, 任选地, 前导序列的质粒中 [Better 等, Science 240:1041-43 (1988)]。通过自动测序能证实这种构建体的序列。然后利用对细菌的 CaCl₂ 温育和热刺激应用标准方法将质粒转化到大肠杆菌菌株 MC1061 中 (Sambrook 等, 上文)。在补充有羧苄青霉素的 LB 培养基中培养转化的细菌, 通过用合适的培养基培养能诱导产生表达的蛋白质。如果存在, 前导序列能影响肽的分泌并且在分泌过程中被切割。

[0470] 通过下面描述的方法能从细菌培养基中纯化分泌的重组蛋白。

[0471] 用于重组蛋白表达的哺乳动物宿主系统是本领域技术人员公知的。对于加工表达蛋白或者产生某些翻译后修饰的特定能力选择宿主细胞菌株, 所述修饰在提供蛋白质活性中有用。这样的蛋白质修饰作用包括但不限于乙酰化作用, 羧化作用, 糖基化作用, 磷酸化作用, 脂质化作用和酰化作用。与象 CHO 这样的宿主细胞不同, HeLa, MDCK, 293, W138 等具有这样的翻译后活性的特定细胞机构和特征机理, 并且可以选择来确保引入的外来蛋白质的正确修饰和加工。

[0472] 优选使用时间长, 蛋白质生产产率高的转化细胞, 因为期望这样稳定的表达。包含可选择标记以及期望的表达盒的载体一旦将这样的细胞转化, 可以让细胞在富集的培养基中培养 1-2 天, 然后换成选择性培养基。设计可选择标记给选择带来抗性, 并且其存在使得成功表达引入的序列的细胞生长和回收。利用对细胞合适的组织培养技术增殖稳定转化细胞的抗性簇。

[0473] 可以利用很多种筛选系统来回收已经被转化重组产生蛋白质的细胞。这样的选择系统包括但不限于 HSV 胸腺嘧啶核苷激酶, 次黄嘌呤 - 鸟嘌呤磷酸核糖转移酶和腺嘌呤磷酸核糖转移酶基因, 分别在 tk-, hgprt- 或 aprt- 细胞中。还有, 抗 - 代谢物抗性被用作下面筛选的基础: DHFR, 它带来甲氨喋呤抗性; gpt, 它带来霉酚酸抗性; neo, 它带来氨基苷 G418 抗性并带来绿黄隆抗性; 和 hygromycin, 它带来潮霉素抗性。可以使用的其他可选择基因包括 trpB, 它使得细胞利用吡啶代替色氨酸, 或 hisD, 它使得细胞利用 histidinol 代替组氨酸。给出用于鉴定转化体的可视指征的标记包括花色素苷, β -葡萄糖醛酸酶及其底物, GUS, 和荧光素酶及其底物, 荧光素。

[0474] 特异性结合剂的纯化和重折叠

[0475] 在某些情况下, 本发明的特异性结合剂为了有生物活性可能需要“重折叠”并且被氧化为合适的三级结构并且产生二硫键。应用本领域公知的很多种方法能实现重折叠。这样的方法包括, 例如, 在离液剂的存在下将可溶性多肽试剂暴露给通常高于 7 的 pH。离液剂的选择类似于胞内体增溶作用使用的选择, 但是一般使用低浓度的离液剂。举例的离液剂是胍。在大多数情况下, 重折叠 / 氧化溶液还含有还原剂加特定比例的其氧化形式, 产生特定的氧化还原潜能, 使得可能存在形成半胱氨酸桥的二硫化合物。一些常用的氧化还原对包括半胱氨酸 / 胱胺, 谷胱甘肽 / 二硫双 GSH, 二氯化铜, 二硫苏糖醇 DTT / 二噻烷 DTT, 和 2- 巯基乙醇 (bME) / 二硫 -bME。在很多情况下, 可以使用辅助溶剂提高重折叠效率。通常使用的辅助溶剂包括甘油, 各种分子量的聚乙二醇, 和胍。

[0476] 期望纯化本发明的肽和肽抗体。蛋白质纯化技术是本领域公知的。这些技术在一个水平上包括蛋白质和非蛋白质级分的分级分离。将所述肽和 / 或肽抗体与其他蛋白质分离之后, 应用实现部分或完全纯化 (或者纯化至均匀) 的色谱法和电泳技术能进一步纯化感兴趣的肽或多肽。特别适合制备本发明的肽抗体和肽的分析方法是离子交换色谱法, 排阻层析; 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 等电聚焦。纯化肽的特别有效的方法是快速蛋白质液相色谱法或 HPLC。

[0477] 本发明的一些方面涉及纯化, 在特定实施方案中, 涉及本发明的肽抗体或肽的大量纯化。这里使用的术语“纯化的肽抗体或肽”, 是指与其他成分可分离的成分, 其中将肽抗体或肽纯化至相对其天然可获得状态的任何程度。因此纯化的肽或肽抗体也称作从其天然存在的环境脱离的肽抗体或肽。

[0478] 一般, “纯化的”指经分级分离去除各种其他成分的肽或肽抗体成分, 所述成分基本上保持其表达的生物活性。使用术语“基本上纯化”时, 该概念指肽或肽抗体组合物, 其中肽抗体或肽形成组合物的主要成分, 例如组合物中蛋白质构成大约 50%, 大约 60%, 大约 70%, 大约 80%, 大约 90%, 大约 95% 或更多。

[0479] 从现有公开物来说, 本领域技术人员公知很多用于定量肽或肽抗体的纯化的方法。这些包括, 例如, 测定活性级分特异结合活性, 或者通过 SDS/PAGE 分析测定级分中肽或肽抗体的量。评定肽或肽抗体级分的纯度的优选的方法是计算级分的结合活性, 将它与开始的提取物的结合活性比较, 这样计算出纯化度, 这里通过“- 折叠纯度叔”评价。用来表示结合活性的量的实际单位当然取决于选择进行纯化的特定分析技术和肽抗体或肽是否显示可检测结合活性。

[0480] 适合在纯化中使用的各种技术对于本领域技术人员是公知的。这些包括, 例如, 用

硫酸铵沉淀, PEG, 抗体(免疫沉淀)等或者通过热变性, 接着离心; 色谱步骤例如亲和色谱(例如, Protein-A-Sepharose), 离子交换, 凝胶过滤, 反相, 羟基磷灰石和亲和色谱; 等电聚焦, 凝胶电泳, 以及这些和其他技术的组合。正如本领域公知的, 相信进行各种纯化步骤的顺序是可以改变的, 或者可以省略一些步骤, 仍然得到制备基本上纯的特异性结合剂的合适的得到。

[0481] 一般不要求本发明的肽或肽抗体总是以其最纯化的状态提供。事实上, 想到在一些实施方案中比基本上纯稍差的特异结合剂产物具有用途。通过组合中较少的纯化步骤, 或者通过使用不同形式的相同的一般纯化方案, 可以实现部分纯化。例如, 知道使用 HPLC 设备进行的阳离子交换柱色谱一般会导致比利用低压色谱系统的相同技术更大“倍数”的纯化作用。显示低度相对纯化的方法在肽或肽抗体的总回收中, 或者在肽或肽抗体的结合活性的保持中有益。

[0482] 已知肽或肽抗体的迁移随着 SDS/PAGE 的不同条件可以改变, 有时改变显著 [Capaldi 等, Biochem. Biophys. Res. Comm., 76:425(1977)]。因此明白在不同的电泳条件下, 纯化或部分纯化的特异性结合剂表达产物的表观分子量可以变化。

[0483] 结合分析

[0484] 免疫结合分析一般使用与分析物靶抗原特异性结合并且经常固定分析物靶抗原的捕获剂。捕获剂是与分析物特异性结合的部分。在本发明的一个实施方案中, 捕获剂是特异性结合 Ang-2 的肽或肽抗体或者其片段。这些免疫结合分析是本领域公知的 [Asai, 编著 Methods in Cell Biology, Vol. 37, Antibodies in Cell Biology, Academic Press, Inc., New York(1993)]。

[0485] 免疫结合分析常常使用标记试剂, 它是捕获剂或抗原形成的结合的复合物存在的信号。标记试剂可以是包括结合的复合物的分子之一; 即它可以是标记的特异性结合剂或者标记的抗特异性结合剂抗体。或者, 标记试剂可以是第三分子, 通常是另一种抗体, 它结合结合的复合物。标记试剂可以是, 例如, 带有标记的抗特异性结合剂抗体。二抗, 对结合的复合物是特异性的, 可以没有标记, 但是能被第四分子结合, 第四分子对于二抗是其中一员的抗体物质是特异性的。例如, 二抗可以被可检测部分修饰, 例如生物素, 它之后被第四分子结合, 所述第四分子例如酶标记的链霉抗生物素蛋白。能特异性结合免疫球蛋白的恒定区的其他蛋白质, 例如蛋白质 A 或蛋白质 G 也可以被用作标记试剂。这些结合蛋白质是链球菌细胞壁正常成分并且具有与各种物种的免疫球蛋白恒定区的强的非免疫原反应性。Akerstrom, J. Immunol., 135:2589-2542(1985); Chaubert, Mod. Pathol., 10:585-591(1997)。

[0486] 在分析中, 每一次混合试剂之后可能要求温育和/或洗涤步骤。温育步骤可以是大约 5 秒至几小时, 优选大约 5 分钟至大约 24 小时。但是, 温育时间取决于分析形式, 分析物, 溶液体积, 浓度等。通常, 在环境温度下进行分析, 但是在一定温度范围内可以进行。

[0487] A. 非竞争性结合鉴定法

[0488] 免疫结合鉴定法可以是非竞争性类型。这些分析有一定量的直接测量的捕获分析物。例如, 在优选的“夹心”鉴定法中, 捕获试剂(抗体或肽抗体)可以直接结合固体底物, 在那里被固定。这些固定化捕获试剂然后捕获(结合)分析样品中存在的抗原。这样被固定的蛋白质然后结合标记试剂, 例如带有标记的二抗。在另一个优选的“夹心”鉴定

法中,二抗没有标记,但是可以被对二抗从中衍生的物质的抗体特异性的标记抗体结合。二抗还可以被可检测部分例如生物素修饰,第三标记分子例如链霉抗生物素蛋白能特异性结合生物素。参见 Harlow 和 Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Ch 14, Cold Spring Harbor Laboratory, NY (1988), 这里引作参考。

[0489] B. 竞争性结合鉴定法

[0490] 免疫结合鉴定法可以是竞争性类型。通过测定样品中存在的分析物置换的或者从捕获试剂(抗体或肽抗体)完全去除的加入的分析物的量,间接测定样品中存在的分析物的量。在一个优选的竞争性结合鉴定法中,向样品加入通常被标记的已知量的分析物,样品然后接触捕获试剂。与抗体结合的标记分析物的量与样品中存在的分析物的浓度成反比(参见, Harlow 和 Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Ch 14, pp. 579-583, 上文)。

[0491] 在另一个优选的竞争性结合鉴定法中,捕获试剂固定在固体底物上。通过测定蛋白质/抗体复合体中存在的蛋白质的量,或者通过测定保留的没有复合的蛋白质的量,可以测定与捕获试剂结合的蛋白质的量。通过提供标记蛋白质可以测定蛋白质的量。Harlow 和 Lane(上文)。

[0492] 在另一个优选的竞争性结合鉴定法中,利用半抗原抑制作用。这里,已知的分析物固定在固体底物上。向样品加入已知量的抗体,并且样品接触固定的分析物。与固定的分析物结合的抗体的量与样品中存在的分析物的量成反比。通过测定抗体的固定级分或者溶液中保留的级分可以测定固定化抗体的量。测定可以是直接的,其中抗体被标记,或者通过接着加入标记部分而间接测定,所述标记部分如上所述特异性结合抗体。

[0493] C. 竞争性结合鉴定法的应用

[0494] 竞争性结合鉴定法可以用于交叉反应测定,允许技术人员测定本发明的肽抗体识别的蛋白质或酶复合体是不是期望的蛋白质而不是交叉反应分子,或者测定融合蛋白是不是对抗原是特异性的而不结合不相关的抗原。在这种类型的鉴定法中,抗原可以固定到固体载体上并且向测试中加入未知蛋白质混合物,它会与肽抗体与固定化蛋白质的结合相竞争。该竞争分子还结合与所述抗原不相关的一种或几种抗原能。将蛋白质与肽抗体和固定化抗原结合相竞争的能力与和固体载体固定化的相同蛋白质的结合相比较,测定蛋白质混合物的交叉反应。

[0495] D. 其他结合鉴定法

[0496] 本发明还提供 Western 印迹法,测定或定量分析样品中 Ang-2 的存在。所述技术一般包括以分子量为基础通过凝胶电泳分离样品蛋白质并且将蛋白质转移到合适的固体载体,例如硝基纤维素过滤器,尼龙过滤器,或衍生化尼龙过滤器。样品和特异性结合 Ang-2 的肽抗体或者其片段温育并且检测得到的复合体。这些肽抗体可以直接被标记或者接着被检测,使用特异性结合肽抗体的标记抗体。

[0497] 诊断分析

[0498] 本发明的衍生结合剂,例如肽和肽抗体或者其片段用于特征在于表达 Ang-2 或亚基的症状或疾病的诊断,或者用于对用 Ang-2 的诱导物,其片段, Ang-2 活性的激动剂或抑制剂治疗的患者监测的检定中。对于 Ang-2 的诊断鉴定包括使用肽抗体和标记检测人体液或者细胞或组织提取物中的 Ang-2 的方法。本发明的肽抗体可以在有或没有修饰作用下使用。在优选的诊断鉴定法中,通过连接,例如标记或报道分子,将肽抗体标记。很多种标记

和报道分子是公知的,其中的一些已经在这里描述。特别地,本发明用于人疾病的诊断。

[0499] 本领域公知很多种使用对各种蛋白质特异性的肽抗体测定 Ang-2 蛋白质的方法。例子包括酶联免疫吸附测定 (ELISA),放射免疫测定 (RIA) 和荧光激活细胞分类 (FACS)。使用与 Ang-2 上两个不干扰表位反应的单克隆抗体的两个位点单克隆为基础的免疫测定是优选的。这些测定方法描述于,例如, Maddox 等, J. Exp. Med., 158:1211 (1983),

[0500] 为了提供诊断基础,通常确定人 Ang-2 表达的正常或标准值。在本领域公知的适合复合体形成的条件下,通过将来自正常受试者优选人的体液或细胞提取物与抗 Ang-2 的肽抗体混合,来实现测定。使用对照和疾病样品,通过比较肽抗体与已知量的 Ang-2 蛋白质的结合能定量测定标准复合体形成的量。然后,将从正常样品获得的标准值与从可能受疾病影响的受试者的样品获得的值相比较。标准值和实验值之间的偏差表明对于疾病状态中的 Ang-2 的作用。

[0501] 对于诊断应用,在一些实施方案中,本发明的肽抗体或肽一般用可检测部分标记。可检测部分可以是任何能直接或间接产生可检测信号的那些。例如,可检测部分可以是放射性同位素,例如 H, C, P, S, 或 I, 荧光或化学发光化合物,例如荧光素异硫代氰酸酯,诺丹明,或荧光素;或者酶,例如碱性磷酸酶, [β]- 半乳糖苷酶,或辣根过氧化物酶。Bayer 等, Meth. Enz., 184:138-163, (1990)。

[0502] 疾病

[0503] 本发明提供用于治疗人疾病和病理状态的结合 Ang-2 的结合剂,例如肽,肽抗体,或者其片段,变体或衍生物。可以与其他治疗药物结合使用调节 Ang-2 结合活性或者其他细胞活性的试剂,以增强它们的治疗效果或者降低可能的副作用。

[0504] 一方面,本发明提供用于治疗特征在于细胞中不期望的或异常水平的 Ang-2 活性的疾病和症状的药物和方法。这些疾病包括癌症,和其他超增殖症状,例如增生,牛皮癣,接触性皮炎,免疫失调,和不孕症。

[0505] 本发明还提供了治疗动物包括人的癌症的方法,包括对动物施用有效量的特异性结合剂,例如抑制或降低 Ang-2 活性的肽抗体。本发明进一步涉及抑制癌细胞生长的方法,包括生物系统中细胞增殖,侵入,和转移过程。所述方法包括使用本发明的化合物作为癌细胞生长抑制剂。优选地,应用所述方法对活体动物例如哺乳动物抑制或减小癌细胞生长,侵入,转移,或肿瘤发生。本发明的方法还容易适合在测试系统中使用,例如,分析癌细胞生长及其性质,以及鉴定影响癌细胞生长的化合物。

[0506] 本发明的方法可治疗的癌症优选在哺乳动物中发生。哺乳动物包括,例如,人和其他灵长目,以及宠物或陪伴动物例如狗和猫,试验用动物例如大鼠,小鼠和兔,和农场动物例如马,猪,羊,和牛。

[0507] 瘤或肿瘤包括其中细胞增殖失控且进行性的组织细胞的生长。一些这样的生长是良性的,但是其他称作恶性并且可能导致生物死亡。恶性肿瘤或癌与良性生长的区别在于,除了表现出进行性细胞增殖之外,它们可以侵犯周围的组织并且转移。此外,恶性肿瘤特征在于它们表现出较大分化损失(较大去分化),以及相对另一种和它们周围组织的它们的组织的较大损失。这种性质也称作“退行发育”。

[0508] 本发明可治疗的肿瘤还包括实体瘤,即,癌和肉瘤。癌包括渗透(侵入)周围组织并且发生转移的得自上皮细胞的那些恶性肿瘤。腺癌是得自腺组织的癌,或者它形成可识

别腺组织。另一个宽的分类或癌包括肉瘤,它们是包埋在纤维或同质物质象胚胎缔结组织中的细胞。本发明还能治疗骨髓或淋巴系统癌症,包括白血病,淋巴瘤和一般不以肿瘤质存在而是分布在血管或淋巴网状系统中的其他癌症。

[0509] 能接受本发明治疗的癌或肿瘤的类型包括,例如,ACTH-产生肿瘤,急性淋巴细胞白血病,急性非淋巴细胞白血病,肾上腺内皮癌,膀胱癌,脑癌,乳腺癌,子宫颈癌,慢性淋巴细胞白血病,慢性髓细胞白血病,结肠癌,皮肤T-细胞淋巴瘤,子宫内膜癌,食管癌,Ewing's肉瘤,胆囊癌,毛状细胞白血病,头颈癌,霍奇金淋巴瘤,Kaposi's肉瘤,肾癌,肝癌,肺癌(小细胞和非小细胞),恶性腹膜积液,恶性胸膜积液,黑素瘤,间皮瘤,多样骨髓瘤,神经胚细胞瘤,神经胶质瘤,非霍奇金淋巴瘤,骨肉瘤,卵巢癌,卵巢(胚细胞)癌,胰腺癌,阴茎癌,前列腺癌,视网膜母细胞瘤,皮肤癌,软组织肉瘤,鳞状细胞癌,胃癌,睾丸癌,甲状腺癌,滋养层肿瘤,子宫癌,阴道癌,阴户癌,和Wilms'肿瘤。

[0510] 关于一些类型的实验确定的癌症的治疗,本发明在这里特别详细地描述。在这些详述的治疗中,使用现有技术标准体外和体内模型。这些方法能被用来鉴定预期在体内治疗方案中有效的药物。但是,明白本发明的方法不局限于这些肿瘤类型的治疗,而是延伸到源自任何器官系统的实体瘤。其侵入或转移与Ang-2表达或活性有关的癌症特别易于用本发明抑制或者甚至被诱导退化。

[0511] 本发明还通过包括使用下面的本发明的化合物而实施,例如与另一种抗癌化疗药物例如任何常用化疗药物结合的肽抗体。特异性结合剂与这样的其他药物结合能使化疗方案有增强的作用。熟练医师会想到很多种化疗法能结合本发明的方法。可以使用任何化疗药物,包括烷基化试剂,抗代谢物,激素和拮抗剂,放射性同位素,以及天然产物。例如,本发明的化合物能和抗生素一起给药,所述抗生素例如阿霉素和其他蒽环霉素类似物,氮芥例如环磷酰胺,嘧啶类似物例如5-氟尿嘧啶,顺铂,羟基脲,紫杉醇及其天然和合成衍生物,等。在另一个实施例中,在混合肿瘤情况下,例如乳腺癌,其中肿瘤包括促性激素依赖性和非促性激素依赖性细胞,该化合物可以和抑那通或果丝瑞宁(LH-RH的合成肽类似物)联合给药。其他抗肿瘤方案包括使用四环素化合物和另一种治疗用药程式,例如,手术,放射等,这里也称作“辅助抗肿瘤用药程式”。因此,本发明的方法可以使用这样的常规方案进行,好处是减小副作用并且增强药效。

[0512] 本发明因此提供用于治疗多种癌症,包括实体瘤和白血病,的组合物和方法。可以治疗的癌症类型包括但不限于:乳腺癌,前列腺癌,和结肠癌;所有形式的肺支气管原癌;骨髓癌;黑素瘤;肝脏肿瘤;成神经细胞瘤;乳头状瘤;胺前体摄取与脱羧细胞瘤;迷芽瘤;腮腺瘤;恶性癌综合症;癌心脏病;癌(例如,Walker癌,基细胞癌,basosquamous癌,Brown-Pearce癌,导管癌,Ehrlich肿瘤,Krebs 2癌,梅克尔细胞,粘蛋白,非小细胞肺癌,燕麦细胞,乳头状瘤,硬癌,细支气管癌,支气管原癌,鳞状细胞癌,和移行细胞癌);组织细胞性病;白血病;恶性组织细胞增多;Hodgkin's病;免疫增殖小细胞肺癌;非霍金森淋巴瘤;浆细胞瘤;网状内皮组织增殖;黑素瘤;成软骨瘤;软骨瘤;软骨肉瘤;纤维瘤;纤维肉瘤;巨细胞肿瘤;组织细胞瘤;脂瘤;脂肉瘤;间皮瘤;粘液瘤;粘液肉瘤;骨瘤;骨肉瘤;脊索瘤;颅咽管瘤;无性细胞瘤;错构瘤;间叶瘤;中肾瘤;肌肉瘤;成釉细胞瘤;牙骨质瘤;牙瘤;畸胎瘤;胸腺瘤;teratoblastic肿瘤。此外,也可以治疗下面类型的癌症:腺瘤;胆管瘤;胆脂瘤;cyclindroma;囊腺癌;囊腺瘤;粒层细胞瘤;两性胚细胞瘤;肝细胞瘤;汗腺腺

瘤；小岛细胞肿瘤；间质细胞肿瘤；乳头状瘤；塞尔托利氏细胞肿瘤；鞘细胞瘤；平滑肌瘤；平滑肌肉瘤；原粒细胞瘤；肌瘤；肌肉瘤；横纹肌瘤；横纹肌肉瘤；室管膜瘤；神经节瘤；神经胶质瘤；成神经管细胞瘤；脑膜瘤；神经鞘瘤；成神经细胞瘤；神经上皮瘤；神经纤维瘤；神经瘤；副神经节瘤；副神经节瘤 nonchromaffin；血管角质瘤；嗜曙红细胞增多类淋巴管增生；血管瘤硬化；多发性血管瘤；血管球瘤；血管内皮瘤；血管瘤；血管外皮细胞瘤；血管肉瘤；淋巴管瘤；淋巴管肌瘤；淋巴管肉瘤；松果体瘤；癌肉瘤；软骨肉瘤；叶状囊性肉瘤；纤维肉瘤；血管肉瘤；平滑肌肉瘤；淋巴瘤性白血病；脂肉瘤；淋巴管肉瘤；肌肉瘤；粘液肉瘤；卵巢癌；横纹肌肉瘤；肉瘤；赘生物；nerofibromatosis；和子宫颈发育异常。

[0513] 本发明的另一方面是使用本发明的材料和方法来防止和 / 或治疗任何皮肤超增殖症状，包括牛皮癣和接触性皮炎或者其他超增殖疾病。已经证明牛皮癣和接触性皮炎患者其身体病灶有升高的 Ang-2 活性 [Ogoshi 等, J. Inv. Dermatol., 110:818-23(1998)]。优选地，与治疗表现这些临床症状人的其他药物联合使用对 Ang-2 特异性的特异性结合剂。利用各种各样的载体通过这里描述的给药途径和本领域技术人员公知的其他途径能送递特异性结合剂。

[0514] 本发明的另一方面包括治疗各种其中涉及血管发生的视网膜病（包括糖尿病视网膜病和与年龄相关的黄斑变性），以及女性生殖道失调 / 疾病，例如子宫内膜异位，子宫纤维瘤，和与功能障碍血管增生相关的女性生殖周期期间其他这样的症状（包括子宫内膜微血管生长）。

[0515] 本发明的另一方面涉及治疗异常血管生长，包括脑动静脉畸形 (AVMs) 胃肠粘膜损伤和修复，有消化系统溃疡病使患者胃十二指肠粘膜溃疡，包括中风导致的局部缺血，各种肝病中肺维管失调和非肝门高血压患者的肝门高血压。

[0516] 本发明的另一方面是使用本发明提供的组合物和方法预防癌症。这样的试药包括特异性结合剂例如抗 Ang-2 肽抗体。

[0517] 药物组合物

[0518] Ang-2 特异性结合剂例如肽抗体的药物组合物在本发明的范围内。含有抗体的药物组合物详细描述于，例如，2001 年 1 月 9 日公布的 Lam 等人的美国专利 No. 6, 171, 586。这样的组合物含有治疗或预防有效量的特异性结合剂，例如与药学可接受试剂混合的这里描述的抗体，或者其片段，变体，衍生物或融合体。在优选的实施方案中，药物组合物含有与药学可接受试剂混合的部分或完全调节 Ang-2 的至少一种生物活性的拮抗剂特异性结合剂。典型地，所述特异性结合剂足够纯化，用于对动物施用。

[0519] 药物组合物可以含有制剂材料，用于调整，保持或维持，例如，组合物的 pH，克分子渗透压浓度，粘度，澄清度，颜色，等张性，气味，无菌，稳定性，溶解或释放速度，吸附或渗透。合适的制剂材料包括，但不限于，氨基酸（例如甘氨酸，谷氨酰胺，天冬酰胺，精氨酸或赖氨酸）；抗菌剂；抗氧化剂（例如抗坏血酸，亚硫酸钠或亚硫酸氢钠）；缓冲液（例如硼酸盐，碳酸氢盐，Tris-HCl，柠檬酸盐，磷酸盐，其他有机酸）；膨胀剂（例如甘露糖醇或甘氨酸），螯合剂 [例如乙二胺四乙酸 (EDTA)]；络合剂（例如咖啡因，聚乙烯吡咯烷酮， β -环糊精或羟丙基- β -环糊精）；填料；单糖；二糖和其他碳水化合物（例如葡萄糖，甘露糖，或糊精）；蛋白质（例如血清白蛋白，明胶或免疫球蛋白）；着色剂；矫味剂和稀释剂；乳化剂；亲水聚合物（例如聚乙烯吡咯烷酮）；低分子量多肽；成盐抗衡粒子（例如钠）；防腐剂（例如

氯化苄烷铵, 苯甲酸, 水杨酸, 硫贡撒, 苯乙醇, 羟苯甲酯, 羟苯丙酯, 洗必太, 山梨酸或过氧化氢); 溶剂 (例如甘油, 丙二醇或聚乙二醇); 糖醇 (例如甘露糖醇或山梨糖醇); 悬浮剂; 表面活性剂或湿润剂 (例如普流罗尼, PEG, 脱水山梨糖醇酯, 聚山梨酯类例如聚山梨酯 20, 聚山梨酯 80, 三硝基甲苯, 氨丁三醇, 卵磷脂, 胆固醇, 四丁酚醛); 稳定增强剂 (蔗糖或山梨醇); 紧张性增强剂 (例如碱金属卤化物 (优选氯化钠或氯化钾, 甘露糖醇, 山梨糖醇); 运送载体; 稀释剂; 赋形剂和 / 或药物佐剂 (Remington' s Pharmaceutical Sciences, 第 18 板, A. R. Gennaro, 编著, Mack Publishing Company, 1990)。

[0520] 根据例如想用的给药途径, 送递方式, 和期望的剂量, 本领域技术人员会确定最佳药物组合物。参见, 例如, Remington' s Pharmaceutical Sciences, 上文。这样的组合物可以影响特异性结合剂的物理状态, 稳定性, 和体内释放速度, 和体内清除速度。

[0521] 药物组合物中的主要赋形剂和载体性质可以是含水的或非水的。例如, 合适的赋形剂或载体可以是注射用水, 生理盐水或人工脑脊髓液, 可能补充有肠胃外给药组合物中常用的其他材料。中性缓冲盐水或者与血清白蛋白混合的盐水是另外的举例的赋形剂。其他例示的药物组合物含有大约 pH 7.0-8.5 的 Tris 缓冲液, 或者大约 pH 4.0-5.5 的乙酸缓冲液, 其可以进一步包括山梨糖醇或者合适的替代物。在本发明的一个实施方案中, 可以通过将具有期望程度纯度的选择的组合物和任意的配药制剂 (Remington' s Pharmaceutical Sciences, 上文) 混合成冻干块状物或水溶液而制备结合剂组合物储存。此外, 利用合适的赋形剂例如蔗糖可以将结合剂产物配制成冻干剂。

[0522] 可以选择用于肠胃外给药的药物组合物。或者, 可以选择组合物用于吸入法或肠给药例如口服, 耳给药, 眼给药, 直肠, 或阴道给药。这样的药学可接受组合物的制备在本领域技术人员能力之内。

[0523] 给药部位可接受的浓缩物中存在制剂成分。例如, 使用缓冲液保持组合物为生理 pH 或者稍低的 pH, 一般在大约 5 至大约 8 的 pH 范围内。

[0524] 当涉及肠胃外给药时, 本发明中使用的治疗性组合物可以是无热源的药学可接受赋形剂中含有期望的特异性结合剂的肠胃外可接受水溶液。用于肠胃外注射的特别合适的赋形剂是无菌水, 其中结合剂被配制成无菌的, 等张的溶液, 使当地防腐。而另一个制备涉及用一种提供产物缓蚀或持续性释放然后通过贮存注射送递的物质, 例如可注射微球体, 生物可降解颗粒, 聚合物化合物 (聚乳酸, 聚乙醇酸), 小球, 或脂质体, 将期望的分子制成制剂。也可以使用透明质酸, 它在循环中有推广延长时间的作用。引入期望的分子的其他合适的方法包括可植入药物送递装置。

[0525] 另一方面, 可以在水溶液, 优选生理可容缓冲液例如 Hanks' 溶液, ringer' s 溶液, 或者生理缓冲盐水中配制适合肠胃外给药的药物制剂。含水注射悬浮液可以含有提高悬浮液粘度的物质, 例如羧甲基纤维素钠, 山梨糖醇, 或葡聚糖。另外, 可以将活性化合物悬浮液制备成合适的油注射悬浮液。合适的亲油性溶剂或赋形剂包括脂肪油, 例如芝麻油, 或合成的脂肪酸酯, 例如油酸乙酯, 三甘油酯, 或脂质体。非脂质聚阳离子氨基聚合物可以用于送药。任选地, 悬浮液还可以含有合适的稳定剂或者提高化合物溶解度的试剂, 制备出高浓缩溶液。

[0526] 在另一个实施方案中, 药物组合物可以配制成吸入法用药。例如, 可以将结合剂配制成吸入用干粉剂。也可以用用于气雾剂送药的抛射剂配制多肽或核酸分子吸入用溶

液。在另一个实施方案中,可以喷洒溶液。PCT 申请 No. PCT/US94/001875 中进一步描述了肺给药,它描述了肺给药化学修饰的蛋白质。

[0527] 还涉及可以口服施用一些制剂。在本发明的一个实施方案中,使用或不使用象片剂和胶囊这样的固体剂型是常规使用的那些载体,能配制以这种方式给药的结合剂分子。例如,设计胶囊,当生物利用率最大并且系统之前降解最小时,在胃肠道的一点释放制剂的活性部分。可以含有附加试剂以有利于结合剂分子的吸收。也可以使用稀释剂,矫味剂,低熔点蜡,植物油,润滑剂,悬浮剂,片剂崩解剂,和粘合剂。

[0528] 使用本领域技术人员公知的药学可接受载体也能将用于口服给药的药物组合物配制成适合口服给药的剂型。这样的载体使药物组合物被配制成患者摄食的片剂,丸剂,糖衣丸,胶囊,液体,凝胶,糖浆,浆液,悬浮液,等。

[0529] 通过将活性化合物与固体赋形剂混合并且将得到的颗粒混合加工处理(任选地,在研磨之后),获得片剂或糖衣丸核心,能获得口服使用的药物制剂。如果期望,可以加入合适的辅助剂。合适的辅助剂包括碳水化合物或蛋白质,例如糖,包括乳糖,蔗糖,甘露糖醇,和山梨糖醇;来自玉米,小麦,稻,马铃薯,或其他植物的淀粉;纤维素,例如甲基纤维素,羟丙基甲基纤维素,或羧甲基纤维素钠;树胶,包括阿拉伯胶和黄芪胶;和蛋白质,例如明胶和胶原。如果期望,可以加入崩解剂或增溶剂,例如交联聚乙烯吡咯烷酮琼脂,和海藻酸或者其盐,例如藻酸盐。

[0530] 糖衣丸心核可以与合适的包衣联合使用,所述合适的包衣是例如浓糖溶液,它还可以含有阿拉伯胶,滑石,聚乙烯吡咯烷酮,carbopolgel,聚乙二醇,和/或二氧化钛,漆溶液,和合适的有机溶剂或溶剂混合物。可以向片剂或糖丸剂包衣加入染料或颜料,用于产物识别或者表征活性化合物的量,即,剂量。

[0531] 可以口服使用的药物制剂还可以包括明胶制成的适合推动的胶囊,以及明胶和包衣例如甘油或山梨糖醇制成的软密封胶囊。适合推动的胶囊可以含有与填料或粘合剂例如乳糖或淀粉,润滑剂,例如滑石或硬脂酸镁,和任选地,稳定剂混合的活性成分。在软胶囊中,活性化合物可以溶解于或悬浮于合适的液体中,例如脂肪油,液体,液体聚乙二醇,有或没有稳定剂。

[0532] 另一种药物组合物可以含有与适合制备片剂的无毒赋形剂的混合物中有效量的结合剂。通过将片剂溶解于无菌水,或者其他合适的赋形剂中,可以制备单位剂量形式的溶液。合适的赋形剂包括但相比于,惰性稀释剂,例如碳酸钙,碳酸钠或碳酸氢钠,乳糖,或磷酸钙;或粘合试剂,例如淀粉,明胶,或阿拉伯胶;或润滑剂例如硬脂酸镁,硬脂酸,或滑石。

[0533] 另外的药物组合物对于本领域技术人员是显然的,包括持续性释放或缓释送药制剂中含有结合剂分子的制剂。配制各种各样的其他持续性或缓释送药方式的技术,例如脂质体载体,生物可降解微粒或者大孔小球和贮存注射液,对于本领域技术人员也是公知的。参见,例如, PCT/US93/00829,它描述了用于递送药物组合物的大孔聚合物微粒的缓释。持续性释放制剂的另外的例子包括有形物品形式的半渗透聚合物基体,例如膜,或微胶囊。持续性释放基体可以包括聚酯类,水凝胶,聚较酯(美国专利 No. 3,773,919, EP 58,481), L-谷氨酸和 γ -L-谷氨酸乙酯的共聚物 [Sidman 等, Biopolymers, 22:547-556(1983)], 聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯) [Langer 等, J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277, (1981)] 和 [Langer 等, Chem. Tech., 12:98-105(1982)], 乙酸亚乙基乙烯酯 (Langer 等, 上文)

或聚-D(-)-3-羟基丁酸 (EP 133,988)。持续性释放组合物还包括脂质体,通过本领域公知的几种方法制备。参见,例如, Eppstein 等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 82: 3688-3692 (1985); EP36,676; EP88,046; EP143,949。

[0534] 用于体内施用的药物组合物一般一定要灭菌。通过灭菌过滤膜灭菌过滤能够实现这样。将组合物冻干,在冻干和重新配制之前或之后可以实施利用这种方法的灭菌。用于肠胃外给药的组合物可以以冻干形式或在溶液中储存。另外,一般将肠胃外组合物置于具有灭菌入口的容器内,例如,带有皮下注射针头可穿透的塞子的静脉溶液袋或小瓶。

[0535] 一旦配制了药物组合物,可以在灭菌小瓶中贮溶液,悬浮液,凝胶,乳状液,固体,或脱水或冻干粉末剂。可以以待用形式或者在给药之前需要重新配置的形式(例如冻干的)贮存这样的制剂。

[0536] 在具体的实施方案中,本发明涉及用于制备单剂量给药单位的试剂盒。试剂盒可以各自含有盛有干燥的蛋白质的第一容器和盛有含水制剂的第二容器两者。本发明范围内还包括包含单个或多个小室预装注射器(例如液体注射器和冻干剂注射器)的试剂盒。

[0537] 治疗上使用的药物组合物的有效量取决于,例如,治疗背景和主体。本领域技术人员明白用于治疗适当的剂量水平是不同的,部分取决于递送的分子,使用的结合剂分子的适应征,给药途径,和患者的大小(体重,体表面或器官大小)和状况(年龄和一般的健康情况)。因此,临床医师可以确定剂量并且改变给药途径,以获得最佳治疗效果。根据上面提到的因素,典型的剂量范围是大约 0.1mg/kg 至最多大约 100mg/kg 或者更多。在其他实施方案中,剂量范围可以是 0.1mg/kg 最多至 100mg/kg;或者 1mg/kg 至最多大约 100mg/kg;或者 5mg/kg 至最多大约 100mg/kg。

[0538] 对于任何化合物,开始时在细胞培养物或者动物模型例如小鼠,大鼠,兔,狗,猪,或猴中能估计治疗有效剂量。还可以使用动物模型来确定合适的浓度范围和给药途径。然后利用这样的信息来确定对人给药的有用的剂量和途径。

[0539] 考虑与需要治疗的受试者相关的因素确定精确剂量。调节剂量和施用,提供足够水平的活性化合物或者保持期望的作用。可以考虑的因素包括病态的严重性,受者的一般健康,受者的年龄,体重和性别,该药的时间和次数,药物联合,反应灵敏性,对治疗的反应。根据特定制剂的半寿期和清除率,可以每 3-4 天,每周,或者每两周施用长效药物组合物。

[0540] 给药次数取决于使用的制剂中结合剂分子的药物动力学参数。一般地,施用组合物,直到用量达到期望的作用。因此,可以用单剂量,或随时间多次给药(以相同或不同浓度/剂量),或者连续输液,可以施用组合物。合适剂量的进一步精确给药方案是常规制定的。通过使用适当的剂量-反应数据,可以确定合适的剂量。

[0541] 药物组合物的给药途径与已知方法相一致,例如口服,通过静脉内,腹膜内,大脑内(薄壁组织内),脑室内,肌内,眼内,动脉内,肝门内,病灶内途径注射,骨髓内,鞘内,室内,经皮,皮下,腹膜内,鼻内,肠内,局部,舌下,尿道,阴道,或者直肠方式,通过持续性释放系统或者通过埋入装置。期望时,通过大丸剂注射,或者通过输液或者通过埋入装置连续施用组合物。

[0542] 或者,另外,通过埋入其上已经吸收或者包在其中有期望的分子的膜,海绵状物质,或者其他合适的材料,可以局部施用组合物。当使用埋入装置时,可以将装置埋入任何合适的组织或器官,期望的分子的递送可以通过扩散,随时间释放的大丸剂,或者连续给

药。

[0543] 在某些情况下,期望以来自体内的方式使用药物组合物。在这样的情况下,使来自患者的细胞,组织,或器官接触药物组合物,其后接着将这些细胞,组织,和 / 或器官植回给患者。

[0544] 在另外的情况下,本发明的结合剂例如肽抗体能通过埋入利用这里描述的方法经基因工程处理表达和分泌多肽的细胞递送。这样的细胞可以是动物或人细胞,并且可以是自身的,异种的,或异基因的。任选地,细胞可以是无限增殖的。为了减小免疫应答机会,可以将细胞包在荚膜内,以避免周围组织渗透。密封材料是生物相容的半渗透聚合物外壳或膜,它允许蛋白质产物释放但是防止患者免疫系统或者周围组织的其他有害因子对细胞的破坏。

[0545] 联合治疗

[0546] 在对与 Ang-2 表达相关的疾病的治疗中,本发明的特异性结合剂例如肽抗体可以与其他治疗法联合应用。这些其他疗法包括,例如放射疗法,化疗,和靶向疗法,例如 Herceptin™, Rituxan™, Gleevec™, 等。没有在这里具体列出的其他联合疗法也在本发明的范围内。

[0547] 化疗治疗可以使用抗肿瘤药物,包括,例如,烷基化试剂,包括:氮芥,例如双氯乙基甲胺,环磷酰胺,异磷酰胺,左旋溶肉瘤素和苯丁酸氮芥;亚硝基脲类,例如卡氮芥(BCNU),洛氮芥(CCNU),和司莫司汀(甲基-CCNU);氮丙啶/甲基三聚氰胺例如三亚乙基三聚氰胺(TEM),三胺硫磷,硫替哌(噻替哌),六甲基三聚氰胺(HMM,六甲蜜胺);磺酸烷基酯,例如白消安;三嗪类,例如达卡巴嗪(DTIC);抗代谢物,包括叶酸类似物,例如甲氨喋呤和曲美沙特,嘧啶类似物,例如5-氟尿嘧啶,氟去氧尿苷,吉西他滨,胞嘧啶阿拉伯糖苷(AraC,阿糖胞苷),5-氮杂胞苷,2,2'-二氟脱氧胞苷,嘌呤类似物,例如6-巯基嘌呤,6-硫代鸟嘌呤,硫唑嘌呤,2'-脱氧助间型霉素(喷司他丁),赤型羟基壬基腺嘌呤(EHNA),磷酸氟达拉滨,和2-氯脱氧腺苷(克拉屈滨,2-CdA);天然产物,包括抗有丝分裂药物,例如紫杉醇,长春花生物碱,包括长春碱(VLB),长春新碱,和长春烯碱,脱乙酰基紫杉醇,雌莫司汀,和盐酸雌莫司汀;ppipodophylotoxins 例如依托泊苷和替尼泊苷;抗生素例如 actinomycin D,柔毛霉素(柔红霉素),阿霉素,二羟蒽二酮,去甲柔毛霉素,博来霉素,光辉霉素(普卡霉素),丝裂霉素C,和放线菌素;酶例如L-天冬酰胺酶;生物学反应改性剂例如干扰素- α , IL-2, G-CSF 和 GM-CSF;各种药物例如铂复合物例如顺铂和卡铂,蒽二酮类例如二羟蒽二酮,取代的脲例如羟基脲,甲基胍衍生物包括N-甲基胍(MIH)和甲苄胍,肾上腺皮质抑制剂例如米托坦(o,p'-DDD)和安鲁米特;激素和拮抗剂包括肾上腺皮质激素甾族化合物拮抗剂例如强的松和等价物,地塞米松和安鲁米特;孕激素例如长效黄体酮,甲羟孕酮乙酸盐和甲地孕酮乙酸盐;雌激素例如己烯雌酚和乙炔基雌二醇等价物;抗雌激素例如他莫西芬;雄激素包括丙酸睾丸和氟甲睾酮/等价物;抗雄激素例如氟他胺,促性腺素释放激素类似物和抑那通;和非甾族抗雄激素例如氟他胺。

[0548] 和生长因子的联合治疗包括细胞因子,淋巴因子,生长因子,或者其他造血因子,例如 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, TNF0, TNF1, TNF2, G-CSF, Meg-CSF, GM-CSF, 血小板生成素,干细胞因子,和红细胞生成素。其他成分包括已知的血小

板生成素,例如 Ang-1,-2,-4,-Y,和 / 或人 Ang- 样多肽,和 / 或血管内皮生长因子 (VEGF)。生长因子包括血管生成素,骨形态发生蛋白 -1,骨形态发生蛋白 -2,骨形态发生蛋白 -3,骨形态发生蛋白 -4,骨形态发生蛋白 -5,骨形态发生蛋白 -6,骨形态发生蛋白 -7,骨形态发生蛋白 -8,骨形态发生蛋白 -9,骨形态发生蛋白 -10,骨形态发生蛋白 -11,骨形态发生蛋白 -12,骨形态发生蛋白 -13,骨形态发生蛋白 -14,骨形态发生蛋白 -15,骨形态发生蛋白受体 1A,骨形态发生蛋白受体 1B,脑起源神经营养因子,睫状营养佳良因子,睫状神经营养因子受体,细胞因子 - 诱导的嗜中性白细胞趋化因子 1,细胞因子 - 诱导的嗜中性白细胞趋化因子 2,内皮细胞生长因子,内皮素 1,表皮生长因子,来自上皮的嗜中性白细胞诱引剂,成纤维细胞生长因子 4,成纤维细胞生长因子 5,成纤维细胞生长因子 6,成纤维细胞生长因子 7,成纤维细胞生长因子 8,成纤维细胞生长因子 8b,成纤维细胞生长因子 8c,成纤维细胞生长因子 9,成纤维细胞生长因子 10,酸性成纤维细胞生长因子,碱性成纤维细胞生长因子,得自神经胶质细胞系的嗜中性细胞因子受体 -1,得自神经胶质细胞系的嗜中性细胞因子受体 -2,生长相关蛋白质,生长相关蛋白质 -1,生长相关蛋白质 -2,生长相关蛋白质 -3,肝素结合表皮生长因子,肝细胞生长因子,肝细胞生长因子受体,胰岛素 - 样生长因子 I,胰岛素 - 样生长因子受体,胰岛素 - 样生长因子 II,胰岛素 - 样生长因子结合蛋白,角质形成细胞生长因子,白血病抑制因子,白血病抑制因子受体 -1,神经生长因子,神经生长因子受体,神经营养蛋白 -3,神经营养蛋白 -4,胎盘生长因子,胎盘生长因子 2,得自血小板的内皮细胞生长因子,得自血小板的生长因子,得自血小板的生长因子 A 链,得自血小板的生长因子 AA,得自血小板的生长因子 AB,得自血小板的生长因子 B 链,得自血小板的生长因子 BB,得自血小板的生长因子受体 -1,得自血小板的生长因子受体 -2,pre-B 细胞生长刺激因子,干细胞因子,干细胞因子受体,转化生长因子 -1,转化生长因子 -2,转化生长因子 -1.2,转化生长因子 -3,转化生长因子 -5,潜伏型转化生长因子 -1,转化生长因子 -1 结合蛋白 I,转化生长因子 -1 结合蛋白 II,转化生长因子 -1 结合蛋白 III,肿瘤坏死因子受体 I 型,肿瘤坏死因子受体 II,尿激酶型纤溶酶原激活剂受体,血管内皮生长因子,及其嵌合蛋白和生物学或免疫学活性片段。

[0549] 免疫治疗

[0550] 免疫治疗一般依赖定向并破坏癌细胞的免疫效应子细胞和分子的使用。免疫效应子可以是,例如,识别靶细胞表面上的一些标记的本发明的肽抗体。单独的肽抗体可以用作治疗的效应子或者它可以补充其他细胞来实际实施细胞杀伤。肽抗体也可以偶联药物或毒素(化疗药物,放射性核素,蓖麻毒 A 链,霍乱毒素,百日咳毒素,等),因此可以只作为靶向试剂。

[0551] 根据本发明,本发明的免疫疗法肽抗体或肽抗体偶合物可以靶向 Ang-2 的突变体形式。特别涉及本发明的肽抗体组合物可以与结合 Ang-2 靶向治疗的治疗方法联合应用。

[0552] 已经证明被动免疫疗法对于抗多种癌症特别有效。参见,例如,W098/39027。

[0553] 下面的实施例只是为了详细说明的目的,而不应该认为在任何方面限制本发明的范围。

[0554] 实施例 1

[0555] 病理组织和正常组织中 Ang-2 表达

[0556] 利用原位杂交检查正常和病理组织中 Ang-2 表达。通过逆转录酶 -PCR 从人或

鼠胎儿肺 cDNA 扩增人 (Genbank Accession Number :AF004327, 核苷酸 1274-1726) 和鼠 (Genbank Accession Number :AF004326, 核苷酸 1135-1588) Ang-2 序列的片段, 克隆到质粒 pGEM-T 中, 并且通过测序证实。使用 ^{33}P -UTP 和 RNA 聚合酶从线性化质粒模板转录 ^{33}P - 标记反义 RNA 探针。甲醛固定化的石蜡包埋的组织块切成 5 微米, 并且收集在带电载玻片上。原位杂交之前, 组织用 0.2M HCL, 接着用蛋白酶 K 消化, 并且用三乙醇胺和乙酸酐进行乙酰化作用。55°C 下切片与放射性标记探针杂交过夜, 然后进行 RNA 酶消化, 并且在大约 0.1XSSC 在 55°C 下高严谨性洗涤, 将载玻片浸入 Slides weredipped in Kodak NTB2 乳剂中, 4°C 下暴露 2-3 周, 显影, 并且复染色。在黑暗区和标准照明下检查切片, 同时评价形态学和杂交信号。

[0557] 结果表明正常产后人, Ang-2 表达限于包含血管发生脉管系统的少数组织, 例如卵巢, 胎盘, 和子宫。在正常成年人心脏, 脑, 肾, 肝, 肺, 胰腺, 脾, 肌肉, 扁桃体, 胸腺, 阑尾, 淋巴结, 胆囊, 前列腺或睾丸和子宫中没有可检测的 Ang-2 表达。在五周大小的小鼠 (而不是成年猴子或人), 肾显示直小管中显著的 Ang-2 表达。为了确定这种表达是不是胚胎发育遗留的, 使用鼠 Ang-2 探针和上述条件对最大一年龄大小的小鼠源的肾反复进行这项实验。在新生儿发育期发现 Ang-2 表达降低, 但是一年龄小鼠的肾中仍然明显。

[0558] 事实上对试验的所有肿瘤类型检查了 Ang-2 表达, 包括, 原发性人肿瘤, 例如结肠癌 (5 例), 乳房癌 (10 例), 肺癌 (8 例), 恶性胶质瘤 (1 例), 转移性人肿瘤, 例如乳房癌 (2 例), 肺癌 (2 例), 和卵巢癌 (2 例), 已经转移到脑, 和啮齿动物肿瘤模型例如 C6 (大鼠神经胶质瘤), HT29 (人结肠癌), Colo-205 (人结肠癌), HCT116 (人结肠癌), A431 (人表皮样瘤), A673 (人横纹肌肉瘤), HT1080 (人纤维肉瘤), PC-3 (人前列腺癌), B16F10 (鼠黑素瘤), MethA (鼠肉瘤), 和 Lewis 肺癌。另外, 对反应 VEGF 的生长到 Matrigel 栓中的新血管和早产视网膜病小鼠低氧症模型检查 Ang-2 表达。

[0559] 实施例 2

[0560] 评价 Ang-2 肽抗体的分子测定

[0561] 进行分子测定 (亲和力 ELISA, 中和作用 ELISA, 和 BIAcore) 评价结合 Ang-2 和相关家族成员的直接肽抗体, 以及肽抗体对 Ang-2 :Tie-2 相互作用的作用。下面详细描述这些体外试验。

[0562] 亲和力 ELISA

[0563] 为了最初筛选候选抗 -Ang-2 肽抗体, 使用纯化的人 Ang-2 (R&D Systems, Inc ; 目录号 623-AN ; Ang-2 以 2 个截短型的混合物被提供) 或鼠 Ang-2 多肽 (如上所述制备)。为了证实结合测试, 从用全长人 Ang-2 DNA 转染的人 293T 细胞的条件培养基获得人 Ang-2 并且在含有大约 50 微克 / 毫升牛血清白蛋白 (BSA) 的无血清 Dulbecco's 修饰的 Eagle 培养基 (DMEM) 中培养。

[0564] 使用微量滴定板, 向每个孔加入大约 100 微升 / 孔 Ang-2, 并且将板温育大约 2 小时, 然后用含有大约 0.1% Tween-20 的磷酸缓冲盐水 (PBS) 将板冲洗四次。然后对于每孔用 250 微升的大约 5% BSA 的 PBS 溶液封闭各孔, 板在室温下温育大约 2 小时。温育之后, 弃除过量的封闭溶液, 向孔中加入大约 100 微升的各种候选抗 -Ang-2 肽抗体, 稀释系列开始浓度是大约 40 毫微摩尔, 然后在含有大约 1% BSA 的 PBS 中系列稀释 4 倍。培养板然后在室温下温育过夜。温育之后, 用含有大约 0.1% Tween-20 的 PBS 冲洗平板。将冲洗

又重复四次,然后向每孔加入在含有 1% BSA 的 PBS 中以 1 : 5000 预先稀释的山羊抗 - 人 IgG(Fc)-HRP(Pierce Chemical Co., catalog#31416) 大约 100 微升。培养板在室温下温育大约 1 小时。然后在含有大约 0.1% Tween-20 的 PBS 冲洗平板五次,然后每孔加入大约 100 微升的 TMB (3,3',5,5' - 四甲基联苯胺液体底物体系;Sigma Chemical Company, St.Louis,Mo., 目录号 T8665) 底物,并且将培养板温育大约 5-15 分钟直到显示蓝色。然后在分光光度计上在大约 370nm 读取吸光度。

[0565] 中和作用 ELISA

[0566] 根据对于亲和力 ELISA 所描述的制备结合了人 Ang-2 多肽的微量滴定板。在含有大约 1% BSA 和大约 1nM Tie-2(以 Tie-2-Fc 分子提供,其中 Tie-2 部分只含有该分子的可溶性胞外部分;R&D Systems, 目录号 313-TI) 的 PBS 溶液中以 4 倍稀释度从 1000nM 至 0.2pM 滴定候选抗 -Ang-2 肽抗体。向各孔加入大约 100 微升的抗体 /Tie-2 溶液之后,培养板在室温下温育过夜,然后用含有大约 0.1% Tween-20 的 PBS 清洗五次。冲洗之后,每孔加入大约 100 微升的抗 -Tie-2 抗体 (Pharmingen Inc., catalog#557039),最终浓度达到大约 1 微克 / 毫升,培养板在室温下温育大约 1 小时。接着,以含有大约 1% BSA 的 PBS 中以 1 : 10,000 的稀释度每孔加入大约 100 微升山羊抗 - 小鼠 -IgG-HRP(Pierce Chemical CO., catalog#31432)。培养板在室温下温育大约 1 小时,然后用含有大约 0.1% Tween-20 的 PBS 清洗五次。然后每孔加入大约 100 微升的 TMB 底物(如上所述),使得显色。然后在分光光度计上在大约 370nm 读取吸光度。

[0567] 亲和力 BIAcore

[0568] 使用 PBS 和 0.005 % P20 表面活性剂 (Biacore, Inc.) 作为洗脱缓冲液在 **BIAcore**[®] 2000 (Biacore, Inc., Piscataway, N. J.) 上进行各种候选 Ang-2 肽抗体的亲和力分析。使用 Amine Coupling Kit (Biacore, Inc.) 根据供应商建议的方法通过伯胺基团将重组蛋白质 G (Repligen, Needham, Mass.) 固定到研究级 CM5 传感器芯片 (Biacore, Inc.) 上。

[0569] 通过首先将大约 100Ru 的各种候选抗 -Ang-2 肽抗体捕获到固定的蛋白质 G,然后以 50 微升 / 分钟的流速向结合的抗体表面注射各种浓度的 (0-100nM) 的 huAng-2 或 mAng-2 三分钟,进行结合分析。应用 BIA 求值 3.1 计算机程序 (Biacore, Inc.) 测定肽抗体结合动力学参数,包括 k_a (缔合作用速度常数), k_d (离解作用速度常数) 和 K_D (离解平衡常数)。离解平衡常数越低,表明肽抗体对 Ang-2 的亲和力越大。

[0570] 实施例 3

[0571] Ang-2 结合肽的鉴定

[0572] 1. Ang-2- 包被磁珠制备

[0573] A. Ang-2 在磁珠上的固定化

[0574] 对于非特异性洗脱,对于全部三轮筛选,以每 100 微升从生产商处得到的小珠原液大约 4 微克生物素化 Ang-2 蛋白质的浓度,将生物素化 Ang-2 蛋白质 (Biotinylated Recombinant Human Angiopoietin-2, R&D Systems, Inc.; 目录号 BT 623) 固定在 Streptavidin Dynabeads (Dynal, Lake Success, N. Y.) 上。对于第二轮筛选,对于抗原 (Ang-2) 和受体 (Tie-2) 洗脱,2 微克生物素化 Ang-2 蛋白质固定在 50 微升的 Streptavidin Dynabeads 上。对于第三轮筛选,将包被浓度减小到每 50 微升小珠原液大约 1 微克生物素化

Ang-2 蛋白质。通过使用磁子将小珠拉到试管的一边并且汲出液体,用磷酸缓冲盐水 (PBS) 将小珠清洗五次并且再次悬浮于 PBS。以上述浓度对清洗过的小球加生物素化 Ang-2 蛋白质,并且室温下转动温育 1 小时,接着转动下 4℃ 下温育几小时至过夜。然后通过加入 BSA 至大约 1% 终浓度并且转动下 4℃ 下温育过夜,封闭 Ang-2- 包被小珠。然后用 PBS 将得到的 Ang-2 包被小珠清洗五次,然后进行筛选程序。

[0575] B. 阴性筛选小珠制备

[0576] 另外制备小珠用于阴性筛选。对于各种筛选条件,使用 500 微升从生产商处得到的小珠原液进行上述程序 (1A 部分),除了省略用生物素化 Ang-2 温育步骤。在最后清洗步骤中,将小珠分为五个 100 微升等份。

[0577] 2. Ang-2 结合噬菌体的筛选

[0578] A. 总的策略

[0579] 使用三个丝状噬菌体文库,称作 "TN8-IX" (5×10^9 独立转化体), "TN12-I" (1.4×10^9 独立转化体),和 "Linear" (2.3×10^9 独立转化体)(都从 Dyax Corp. 获得),来筛选 Ang-2 结合噬菌体。然后用各个文库进行非特异性洗脱,Ang-2 洗脱,和受体洗脱 (Tie-2)。对于 Ang-2 使用九种不同的筛选条件(利用非特异性洗脱方法的 TN8-IX,利用 Ang-2 洗脱方法的 TN8-IX,利用 Tie-2 洗脱方法的 TN8-IX,利用非特异性洗脱方法的 TN12-I,用 Ang-2 洗脱方法的 TN12-I,和利用 Tie-2 洗脱方法的 TN12-I,利用非特异性洗脱方法的 Linear,用 Ang-2 洗脱方法的 Linear,和利用 Tie-2 洗脱方法的 Linear)。对于所有这三种文库,在非特异性方法中,从第一轮筛选中只洗脱出用于再几轮筛选的噬菌体。在第二和第三轮筛选中使用 Ang-2 和 Tie-2 洗脱。对于 Linear 文库,仅第二轮对 Ang-2 和 Tie-2 洗脱进行筛选。

[0580] B. 阴性筛选

[0581] 关于筛选条件,从文库中原种分出对于 TN8-IX 和 TN12-I 文库大约 100 个(对于 TN8-IX 大约 5×10^{11} pfu,对于 TN12-I 大约 1.4×10^{11} pfu),对于线性文库大约 10 个(大约 1×10^{11} pfu) 随机库等价物等份,并且用 PBST(含有 0.05% Tween-20 的 PBS) 大约 400 微升稀释。最后洗涤之后,从第一个制备用于阴性筛选 (1B 章节) 的小珠 100 微升等份汲出液体,向小珠加大约 400 微升稀释的文库原种。旋转下,得到的混合物在室温下温育大约 10 分钟。用磁子汲出噬菌体上清液,并且加给第二个 100 微升等份用于另一个阴性筛选步骤。用这种方法,进行五次阴性筛选步骤。

[0582] C. 使用 Ang-2 蛋白质包被珠进行筛选

[0583] 将最后阴性筛选步骤之后的噬菌体上清液 (1B 章节) 加给 Ang-2 包被珠 (1A 章节)。该混合物在旋转下室温下温育 1-2 小时,使噬菌体与靶蛋白质结合。弃除上清液之后,用 PBST 将珠清洗大约 10 次,接着用 PBS 清洗两次。

[0584] D. 非特异性洗脱

[0585] 排除最后的清洗液之后 (2C 部分),将大约 1 毫升的 Min A 盐溶液 (60mM K_2HPO_4 , 33mM KH_2PO_4 , 7.6mM $(NH_4)SO_4$, 和 1.7mM 柠檬酸钠) 加给小珠。将这种小珠混合物直接加给浓缩细菌样品用于感染 (参见下面的 3A 和 3B 章节)。

[0586] E. 被结合噬菌体的抗原 (Ang-2) 洗脱

[0587] 对于第二轮 2,最后清洗步骤之后 (2C 章节),通过加入 100 微升的 1pM, 0.1nM,

和 10nM 重组 Ang-2 蛋白质 (Recombinant HumanAngiopoietin-2, R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minn.), 对于每一个条件继续温育 30 分钟, 从磁珠洗脱被结合噬菌体。非特异性洗脱保留的噬菌体 (2D 章节)。合并 10nM 和非特异性洗脱洗脱出的噬菌体, 让它们进行第三轮筛选 (参见下面的第 4 章节)。

[0588] 对于第 3 轮, 最后清洗步骤之后 (2C 章节), 通过加入大约 1nM 重组 Ang-2 蛋白质, 和 10nM 重组 Ang-2 蛋白质, 对于每一个条件继续温育 30 分钟, 从磁珠洗脱被结合噬菌体。另外, 在旋转装置上用 1 毫升的 100mM 三乙胺溶液 (Sigma, St. Louis, Mo.) 洗脱噬菌体大约 10 分钟。用 0.5 毫升的 1M Tris-HCl (pH 7.5) 中和含有噬菌体的三乙胺溶液的 pH。最后用 100mM 三乙胺溶液洗脱之后, 通过对细菌加小珠而洗脱留下的噬菌体 (2D 章节)。

[0589] F. 被结合噬菌体的受体 (Tie-2) 洗脱

[0590] 对于第二轮 2, 最后清洗步骤之后 (2C 章节), 通过加入大约 100 微升的 1pM, 0.1nM, 和 10nM 重组 Tie-2 蛋白质 (重组人 Tie-2-Fc 嵌合体, R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minn.), 对于每一个条件继续温育 30 分钟, 从磁珠洗脱被结合噬菌体。非特异性洗脱保留的噬菌体 (2D 章节)。合并 10nM 和非特异性洗脱洗脱出的噬菌体, 让它们进行第三轮筛选 (参见下面的第 4 章节)。

[0591] 对于第 3 轮, 最后清洗步骤之后 (2C 章节), 通过加入大约 1nM 重组 Ang-2 蛋白质, 和 10nM 重组 Tie-2 蛋白质, 对于每一个条件继续温育 30 分钟, 从磁珠洗脱被结合噬菌体。另外, 在旋转装置上用 1 毫升的 100mM 三乙胺溶液 (Sigma, St. Louis, Mo.) 洗脱噬菌体大约 10 分钟。用 0.5 毫升的 1M Tris-HCl (pH 7.5) 中和含有噬菌体的三乙胺溶液的 pH。最后用 100mM 三乙胺溶液洗脱之后, 通过对细菌加小珠而洗脱留下的噬菌体 (2D 章节)。

[0592] 3. 扩增

[0593] A. 平板细胞的制备

[0594] 新鲜大肠杆菌 (XL-1 Blue MRF') 培养物在含有大约 12.5 微克 / 毫升四环素的 LB 培养基中生长至 OD₆₀₀ 为大约 0.5。对于每一个筛选条件, 在冰上冷却大约 20 毫升的这种培养物并且离心。将细菌颗粒重新悬浮于大约 1 毫升的 Min A 盐溶液。

[0595] B. 转导

[0596] 向浓缩细菌样品 (3A 章节) 加入上述各种不同洗脱方法 (2D, 2E 和 2F 章节) 得到的各种混合物, 并且在大约 37°C 下温育大约 15 分钟。向各混合物加入大约 2 毫升的 NZCYM 培养基 (2XNZCYM, 50 微克 / 毫升氨苄青霉素), 并且在大约 37°C 下温育大约 15 分钟。得到的 4 毫升溶液在含有大约 50 微克 / 毫升氨苄青霉素的大 NZCYM 琼脂板上平板培养, 并且在 37°C 下温育过夜。

[0597] C. 噬菌体收集

[0598] 各种细菌 / 噬菌体混合物在大 NZCYM 琼脂板 (3B 章节) 上培养过夜, 然后将它们破碎移到大约 35 毫升的 LB 培养基中。琼脂板进一步用另外的 35 毫升的 LB 培养基漂净。将 LB 培养基中得到的细菌 / 噬菌体混合物离心使细菌成颗粒状物。然后将大约 50 毫升的噬菌体上清液移至一个新试管中, 加入大约 12.5 毫升的 PEG 溶液 (20% PEG8000, 3.5M 乙酸铵) 并且在冰上温育 2 小时使噬菌体沉淀。将沉淀的噬菌体离心出并且重新悬浮于 6 毫升的噬菌体再悬浮缓冲液 (250mM NaCl, 100mM Tris pH8, 1mM EDTA) 中。通过离心进一步纯化这种噬菌体溶液去除残留的细菌, 并且通过加入大约 1.5 毫升的 PEG 溶液第二次沉淀噬菌

体。离心步骤之后,将噬菌体沉淀再次重新悬浮于大约 400 微升的 PBS。让这种溶液最后离心以清除任何残留细菌碎屑的溶液。利用标准噬斑形成测试滴定得到的噬菌体制剂。

[0599] 4. 附加筛选和扩增

[0600] 在第二轮中,将第一轮(3C 章节)得到的扩增的噬菌体制剂(大约 10^{10} pfu)用作输入噬菌体进行筛选和扩增步骤(第 2 和 3 章节)。对于 Ang-2 和 Tie-2 洗脱,将来自 10nM 个非特异性洗脱的噬菌体合并并且扩增,用于第三轮筛选。从第二轮得到的扩增的噬菌体制剂(大约 10^9 pfu)接着被用作输入噬菌体进行第三轮筛选和扩增(第 2 和 3 章节)。第三轮洗脱步骤之后(2D, 2E, 和 2F 章节),对洗脱出的小级分制成平板进行噬斑形成分析(3C 章节)。取各噬斑并且在每孔含有 100 微升 TE 缓冲剂的 96 孔微量滴定板上平板培养。将这些主板在 4℃ 下温育过夜,使噬菌体洗脱到 TE 缓冲液中。

[0601] 5. 克隆分析

[0602] 通过噬菌体 ELISA 和 DNA 技术分析噬菌体克隆。以这两个测试合并的结果为基础排列序列。

[0603] A. 噬菌体 ELISA

[0604] XL-1 Blue MRF' 培养物生长至 OD₆₀₀ 达到大约 0.5。大约 30 微升的这种培养物分成等份加给 96 孔微量滴定板的每个孔中。向各孔加入大约 10 微升洗脱的噬菌体(第 4 部分)并且让细菌在室温下传染大约 15 分钟。向各孔加入大约 100 微升的含有大约 12.5 微克/毫升四环素和大约 50 微克/毫升氨苄青霉素的 LB 培养基。微量滴定板然后在摇动下在大约 37℃ 下温育过夜。让重组 Ang-2 蛋白质(大约 1 微克/毫升 PBS 溶液)在大约 4℃ 下与 96 孔 Maxisorp 板(NUNC)结合过夜。作为对照物,以大约 2 微克/毫升 PBS 溶液将纯链霉抗生物素蛋白包被到分开的 Maxisorp 板上。

[0605] 第二天,弃除蛋白质包被的 Maxisorp 板中的液体,大约 4℃ 下用大约 300 微升的 5% 奶溶液将各个孔封闭过夜(或者,室温下封闭 1 小时)。然后弃除奶溶液,并且用 PBST 溶液将孔清洗三次。最后清洗步骤之后,向蛋白质包被的 Maxisorp 板中的各个孔加入大约 50 微升的 PBST-4% 奶液。向 Ang-2 包被的平板和对照物链霉抗生物素蛋白包被的平板的相应的孔移入从 96 孔微量滴定板的每个孔中汲出的大约 50 微升的过夜培养物。室温下将各类型板中 100 微升混合物温育大约 1 小时。弃除 Maxisorp 板中的液体,并且用 PBST 将孔清洗三次。将 HRP- 耦合的抗-M13 抗体(Amersham Pharmacia Biotech)稀释至大约 1 : 7,500, 并且向 Maxisorp 板的各孔加入大约 100 微升稀释溶液,在室温下温育大约 1 小时。再次弃除液体,并且用 PBST 将孔清洗大约五次。向各孔加入大约 100 微升的 TMB 底物(Sigma),并且用大约 50 微升的 5N H₂SO₄ 溶液终止反应。在分光光度计(Molecular Devices)上读取 OD_{450°}。

[0606] B. 噬菌体克隆测序

[0607] 对于每一个噬菌体克隆,利用 PCR 制备测序模板。下面的寡核苷酸对被用来扩增大约 500 个核苷酸片段:

[0608] 引物 1 :5' -CGGCGCAACTATCGGTATCAAGCTG-3' (SEQ ID NO :54)

[0609] 引物 2 :5' -CATGTACCGTAACACTGAGTTTCGTC-3' (SEQ ID NO :55)

[0610] 对于各个克隆制备下面的混合物:

[0611]

试剂	体积 (微升) / 试管
dH ₂ O	26.25
50%甘油	10
10XPCR 缓冲液 (w/oMgCl ₂)	5
25mMMgCl ₂	4
10mMdNTP 混合物	1
100 μ M 引物 1	0.25
100 μ M 引物 2	0.25
Taq 聚合酶	0.25
TE 中的噬菌体 (第 4 章节)	3
终反应体积	50

[0612] 对于 PCR, 使用热循环控制装置 (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) 进行下面的程序: 94℃, 5 分钟; (94℃ 30 秒, 55℃ 30 秒, 72℃ 45 秒) x 30 个循环; 72℃ 7 分钟; 冷却至 4℃。使用 QIAquick Multiwell PCR 纯化试剂盒 (Qiagen), 根据厂商说明, 将各反应的 PCR 产物纯化。然后通过 1% 琼脂糖凝胶上对含有大约 1 微升染料 (10*BBXS 琼脂糖凝胶加载染料) 的各种 PCR 反应混合物大约 10 微升进行电泳来分析纯化的 PCR 产物。然后使用 ABI 377 测序仪 (Perkin Elmer) 根据厂商推荐的方法对保留的产物测序。

[0613] 6. 序列排列和共有序列测定

[0614] A. 序列排列和分析

[0615] 可变核苷酸序列翻译的肽序列 (5B 章节) 与 ELISA 数据有相关性。在 Ang-2 包被孔中表现高 OD₄₅₀ 并且在链霉抗生物素蛋白包被孔中表现低 OD₄₅₀ 的克隆具有较高优先排列。出现多次的序列也具有较高优先排列。根据这些标准选择候选序列用于进一步肽或肽抗体分析。

[0616] B. 共有序列测定

[0617] 如下从 TN8-IX 文库产生三类不同的共有基序:

[0618] KRPCEEXWGGCXYX (SEQ ID NO :56)

[0619] KRPCEEXFGGCXYX (SEQ ID NO :57)

[0620] XXXCXDXYWYCXXX (SEQ ID NO :61)

[0621] XXXCXDXYTYCXXX (SEQ ID NO :62)

[0622] XXXCXDxFWYCXXX (SEQ ID NO :63)

[0623] XXXCXDxFTYCXXX (SEQ ID NO :64)

[0624] XXXCXWDPWTCEXM (SEQ ID NO :58)

[0625] 从 TN12-I 文库产生一个共有基序：

[0626] W S X C A W F X G X X X X X C R R X (SEQ ID NO :59)

[0627] 对于所有的共有基序序列,通过测定各个位置上最经常出现的氨基酸而获得各个共有序列的下划线“核心氨基酸序列”。“X”指任何天然存在的氨基酸。两个与核心序列邻接的半胱氨酸是 TN8-IX 和 TN12-I 文库中固定的氨基酸。

[0628] 下面的表 3 中给出经鉴定与 Ang-2 结合的肽。

[0629] 表 3Ang-2 结合肽

[0630]

肽	SeqIdNo.	肽序列
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

[0631] 实施例 4

[0632] 编码肽抗体的 DNA 的构建

[0633] 使用选择为对 Ang-2:Tie-2 结合 (参见表 3) 有潜在抑制性的修饰的肽来构建融合蛋白,其中各个肽单体或者各个肽的串联二聚体 (单体单元之间有连接体) 读框内与编码连接体的 DNA 融合,后面接人 IgG1 的 Fc 区。通过寡核苷酸 (“寡聚物”) 对淬火产生编码肽和连接体的多核苷酸双螺旋来构建各个修饰的肽,所述连接体,根据所述肽,由或者五个甘氨酸残基,或者八个甘氨酸残基或一个赖氨酸残基组成;这些构建体被制备成 NdeI 至 XhoI 片段。这些双螺旋多核苷酸分子连接包含人 Fc 基因在载体 (pAMG21-Fc N-末端,下文进一步描述),其预先用 NdeI 和 XhoI 消化。利用标准方法通过电穿孔将得到的连接混合物转化到大肠杆菌菌株 2596 细胞 (GM221,下文进一步描述) 中。对克隆筛选产生重组蛋白质产物并且具有正确的核苷酸序列的融合基因的能力。对于每一种修饰的肽选择单一的这样的克隆 (即, Fc-肽融合产物)。

[0634] pAMG21-Fc N-末端载体 pAMG21 的构建

[0635] pAMG21

[0636] 表达质粒 pAMG21 (ATCC No. 98113) 得自表达载体 pCFM1656 (ATCC No. 69576) 和美

国专利 No. 4, 710, 473 中描述的表达载体系统, 根据公开的国际专利申请 WO 00/24782 中描述的方法 (参见实施例 2 部分, 第 100-103 页, 以及附图 17A 和 17B)。

[0637] Fc N- 末端载体

[0638] 使用大肠杆菌菌株 3788, pAMG21Tpo_Gly5_Fc 单体, 作为模板, 构建 Fc N- 末端载体。WO 00/24782 中可以找到该菌株克隆的信息 (参见实施例 2 和附图 10)。设计 5' PCR 引物 (下文进一步描述) 去除 pAMGTpo Gly5 中的 Tpo 肽序列并且用包含 ApaLI 和 XhoI 位点的聚连接体置换它。使用菌株 3788 作为模板, 使用 Expand Long 聚合酶进行 PCR, 使用 SEQ ID NO :8 寡核苷酸, 下面的, 作为 5' 引物和通用 3' 引物, SEQ ID NO :9, 下面的。得到的 PCR 产物被凝胶纯化并且用限制酶 NdeI 和 BsrGI 消化。利用 Qiagen (Chatsworth, Calif.) 凝胶纯化旋转柱凝胶纯化质粒和编码带有其连接体的感兴趣的肽的多核苷酸。然后利用标准连接技术连接质粒和插入物, 并且将得到的连接混合物转化到大肠杆菌细胞 (菌株 2596) 中。选取单克隆并且进行 DNA 测序。鉴定正确的克隆并且这个被用作这里描述的修饰的肽的载体来源。

[0639] 5' 引物:

[0640] ACAAACAAACATATGGGTGCACAGAAAGCGGCCGCAAAAAAACTCGAGGGTGA

[0641] GGCGGTGGGGACA (SEQ ID NO :8)

[0642] 3' 引物:

[0643] GGTCATTACTGGACCGGATC (SEQ ID NO :9)

[0644] 除了将这些修饰的肽制成与 Fc 的 N- 末端融合体 (N- 末端肽抗体) 之外, 也将它们中的一些制成 C- 末端融合产物 (C- 末端肽抗体)。下面描述用于制备 C- 末端融合体的载体。

[0645] Fc C- 末端载体的构建

[0646] 使用大肠杆菌菌株 3728, pAMG21Fc_Gly5_Tpo 单体, 作为模板, 构建 Fc C- 末端载体。WO 00/24782 中可以找到该菌株克隆的信息 (参见其实施例 2 和附图 7)。设计 3' PCR 引物 (SEQ ID NO :10) 去除 Tpo 肽序列并且用包含 ApaL I 和 Xho I 位点的聚连接体置换它。使用菌株 3728 作为模板, 使用 Expand Long 聚合酶进行 PCR, 使用通用 5' 引物 (SEQ ID NO :11) 和上述 3' 引物。得到的 PCR 产物被凝胶纯化并且用限制酶 BsrGI 和 BamHI 消化。利用 Qiagen 凝胶纯化旋转柱凝胶纯化质粒和编码带有其连接体的感兴趣的各个肽的多核苷酸。然后利用标准连接技术连接质粒和插入物, 并且将得到的连接混合物转化到大肠杆菌细胞 (菌株 2596) 中。选取单克隆并且进行 DNA 测序。鉴定正确的克隆并且这个被用作这里描述的修饰的肽的载体来源。

[0647] 5' 引物:

[0648] CGTACAGGTTTACGCAAGAAAATGG (SEQ ID NO :10)

[0649] 3' 引物:

[0650] TTTGTTGGATCCATTACTCGAGTTTTTTTTGCGGCCGCTTCTGTG

[0651] CACCACCACCTCCACCTTTAC (SEQ ID NO :11)

[0652] GM221 (#2596). 宿主菌株 #2596, 用于表达 Fc- 肽融合蛋白, 是经修饰包含 lux 启动子, 和早期 ebg 区中温度灵敏 λ 阻抑物 cI857s7 和晚期 ebg 区中 lacI^q 阻抑物两者的大肠杆菌 K-12 菌株。这两个阻抑物基因的存在允许这种宿主使用带有各种表达系统。这种

菌株的 ATCC 登记号是 202174。

[0653] 实施例 5

[0654] 肽抗体的制备

[0655] 在大肠杆菌中表达. 37℃ 下大肠杆菌 GM221 中各个 pAMG21-Fc 融合构建体的培养物在 Terrific Broth 培养基 (参见 Tartof 和 Hobbs, "Improved media for growing plasmid and cosmid clones", Bethesda Research Labs Focus, 第 9 卷, 12 页, 1987, 上文提到的 Sambrook 等参考文献中引述) 中培养。向培养基中加入合成的自身诱导剂, N-(3-氧己酰基)-DL-高丝氨酸内酯, 达到每毫升 20 纳克 (ng/ml) 的最终浓度之后, 实现从 luxPR 启动子的基因产物表达的诱导。将培养物在 37℃ 下温育另外的 6 小时。然后通过显微镜检查对细菌培养物检查包涵体的存在并且离心收集。在诱导的培养物中发现可折射包涵体, 表明 Fc-融合体最可能在大肠杆菌中的不溶级分中产生。通过在含有 10% β-巯基乙醇的 Laemmli 样品缓冲液中再次悬浮而直接溶解细胞颗粒状物, 然后通过 SDS-PAGE 加以分析。在大多数情况下, 在 SDS-PAGE 凝胶上发现合适分子量的强考马斯兰染色泳带。

[0656] 纯化利用高压匀化作用 (两个道是 14,000PSI) 在水 (1/10) 中将细胞破碎, 并且离心收集包涵体 (4000RPM, J-6B 离心机, 1 小时)。以 1/10 的比例将包涵体溶解于 6M 胍, 50mM Tris, 10mM DTT, pH8.5, 1 小时。对于与 Fc 融合的线性肽, 用 2M 胍, 50mM Tris, 160mM 精氨酸, 2mM 半胱氨酸, pH 8.5 将溶解的混合物稀释 25 倍。4℃ 下将氧化作用进行 2 天, 让形成二硫键键合的化合物 (即, Fc-肽同二聚体)。对于与 Fc 融合的环肽, 加上下面三个折叠条件实施相同的方法: (1) 2M 胍, 50mM Tris, 160mM 精氨酸, 4mM 半胱氨酸, 1mM 胱胺, pH 8.5; (2) 4M 胍, 20% 甘油, 50mM Tris, 160mM 精氨酸, 2mM 半胱氨酸, pH 8.5; 和 (3) 4M 胍, 20% 甘油, 50mM Tris, 160mM 精氨酸, 4mM 半胱氨酸, 1mM 胱胺, pH 8.5。用 1.5M 胍, 50mM NaCl, 50mM Tris, pH 9.0 透析再折叠的蛋白质。用乙酸将该混合物的 pH 降低至 pH 5。离心去除沉淀, 根据各个融合产物的等电点, 将上清液调节至 pH 为 5 至 6.5。过滤蛋白质并且 4℃ 下加载到 SP-Sepharose HP 柱子上, 柱子用 20mM NaAc, 50mM NaCl, 对各个构建物测定的 pH 中平衡过。用 50mM NaCl 至 500mM NaCl 范围相同的缓冲液, 用 20- 柱体积线性梯度洗脱蛋白质。合并个峰流出液并且过滤。

[0657] 下面的表 4 中给出了利用上述方法产生的肽抗体。

[0658] 表 4

[0659]

肽抗体	肽抗体序列
L1 (N)	MGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ IDNO :12)
L1 (N) WT	MKFNPLDELEETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ IDNO :13)
L1 (N) 1KWT	MKFNPLDEEETLYEQFTFQQGSGSATGGSGSTASSGS GSATHLEGGGGG-Fc (SEQ IDNO :14)

肽抗体	肽抗体序列
2xL1 (N)	MGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQGGGGGGGKFNPL DELEETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQIDNO :15)
2xL1 (N) WT	MKFNPLDELEETLYEQFTFQQGGGGGGGKFNPLDELEE TLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQIDNO :16)
Con4 (N)	MGAQQEECEWDPWTCEHMLEGGGGG-Fc (SEQID NO :17)
Con4 (N) 1K-WT	MQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATH LEGGGGG-Fc (SEQIDNO :18)
2xCon4 (N) 1K	MGAQQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGS ATHQEECEWDPWTCEHMLEGGGGG-Fc (SEQID NO :19)
L1 (C)	M-Fc-GGGGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQLE (SEQ IDNO :20)
L1 (C) 1K	M-Fc- GGGGAQGSATGGSGSTASSGSGSATHKFNPLDELE ETLYEQFTFQQLE (SEQIDNO :21)
2xL1 (C)	M-Fc- GGGGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQGGGGGGGKF NPLDELEETLYEQFTFQQLE (SEQIDNO :22)
Con4 (C)	M-Fc-GGGGAQQEECEWDPWTCEHMLE (SEQID NO :23)
Con4 (C) 1K	M-Fc- GGGGAQGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWDP WTCEHMLE (SEQIDNO :24)
2xCon4 (C) 1K	M-Fc- GGGGAQQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASS GSGSATHQEECEWDPWTCEHMLE (SEQIDNO :25)

肽抗体	肽抗体序列
Con4-L1 (N)	MGAQEECEWDPWTCEHMGGGGGGGKFNPLDELEET LYEQFTFQQGSGSATGGSGSTASSGSGSATHLEGGGGG- F-(SEQ ID NO :26)
Con4-L1 (C)	M-Fc- GGGGGAQGSGSATGGSGSTASSGSGSATHKFNPLDELE 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)

[0660] 在表 4 中, "Fc" 指人 Fc IgG1 序列。第二栏给出肽抗体的氨基酸序列。其 Fc 部分标记为 "Fc", 并且是下面 SEQ ID NO :60 中给出。要明白使用标记的情况下, 例如, "Con4" 或 "Con-4", 这指 Con-4 肽, 其中其上使用的后缀 "C", "(C)", 或 "-C"; 或 "N", "(N)", 或 "-N" 表示该分子是这里描述的肽抗体。肽抗体名称中的后缀 "N", "(N)", 或 "-N" 表示 Ang-2- 结合肽 (或结合肽复数) 是 Fc 结构域的 N- 末端, 后缀 "C", "(C)" 或 "-C" 表示 Ang-2- 结合肽 (或结合肽复数) 是 Fc 结构域的 C- 末端。此外, 2xCon4(C) 1K, 如 SEQ ID NO :25 中定义的, 也可以指其中没有 "1K" 后缀。

[0661] 各个肽抗体的 Fc 部分的氨基酸序列如下 (从氨基末端至羧基末端):

[0662] DKTHTCPPELPGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV

[0663] SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL

[0664] HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS

[0665] RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL

[0666] DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLS

[0667] LSPGK (SEQ ID NO :60)

[0668] 下面给出表 4 中分别相应于肽抗体 SEQ ID NOs :12-32 的肽抗体的编码 DNA 序列 (SEQ ID Nos :33-53) :

[0669] SEQ ID NO :33

[0670] ATGGGTGCACAGAAATTC AACCCGCTGGACGAACTGGAAGAAACTCT

[0671] GTACGAACAGTTCACTTTCCAGCAGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGG

[0672] ACAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGG

[0673] GACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGAT

[0674] CTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA

[0675] AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC

[0676] ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC

[0677] CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC

[0678] AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATC

[0679] GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT

[0680] GTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAG

[0681] CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGA

[0682] GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACCTACAAGACCACGCCTC

[0683] CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGT

[0684] GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT

[0685] GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC

[0686] TCCGGGTAAATAATGGATCC

[0687] SEQ IDNO :34

[0688] ATGAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAAACTCTGTACGAACA

[0689] GTTCACTTTCCAGCAGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCA

[0690] CACATGTCCACCTTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGT

[0691] TTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC

[0692] CCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA

[0693] GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA

[0694] GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA

[0695] GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA

[0696] AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA

[0697] TCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG

[0698] CCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC

[0699] CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC

[0700] AATGGGCAGCCGGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA

[0701] CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG

[0702] CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC

[0703] TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA

[0704] ATAA

[0705] SEQ ID NO :35
[0706] ATGAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAACTCTGTACGAACA
[0707] GTTCACTTTCCAGCAGGGATCCGGTTCTGCTACTGGTGGTTCCGGCTCC
[0708] ACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGTGC GACTCATCTCGAGGGTGGAGGC
[0709] GGTGGGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTC
[0710] CTGGGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACC
[0711] CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTG
[0712] AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT
[0713] GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA
[0714] GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC
[0715] TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA
[0716] GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA
[0717] ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAA
[0718] CCAGGTACGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT
[0719] CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGA
[0720] CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAA
[0721] GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT
[0722] GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC
[0723] TCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA
[0724] SEQ ID NO :36
[0725] ATGGGTGCACAGAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAACTCT
[0726] GTACGAACAGTTCACTTTCCAGCAGGGTGGTGGTGGTGGCGGTGG
[0727] TAAGTTCAACCCACTGGATGAGCTGGAAGAGACTCTGTATGAACAGTT
[0728] CACTTTCCAGCAACTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCACA
[0729] CATGTCCACCTTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTT
[0730] TCCTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC
[0731] CTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG
[0732] GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
[0733] ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
[0734] CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA
[0735] GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCAT
[0736] CTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC
[0737] CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCC
[0738] TGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
[0739] ATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC
[0740] TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC
[0741] AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
[0742] CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
[0743] TAA

[0744] SEQ ID NO :37

[0745] ATGAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAACTCTGTACGAACA
[0746] GTTCACTTTCCAGCAGGGTGGTGGTGGTGGCGGTGGTAAGTTCAACCC
[0747] ACTGGATGAGCTGGAAGAGACTCTGTATGAACAGTTCACTTTCCAGCA
[0748] ACTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTT
[0749] GCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTTTCTCTTCCCCC
[0750] AAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATG
[0751] CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG
[0752] GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG
[0753] AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCC
[0754] TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
[0755] AACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA
[0756] AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGG
[0757] ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT
[0758] TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
[0759] GAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC
[0760] TTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
[0761] GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC
[0762] TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

[0763] SEQ ID NO :38

[0764] ATGGGTGCACAGCAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCGA
[0765] ACACATGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCACACATGTC
[0766] CACCTTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTTTCTCTT
[0767] CCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGT
[0768] CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT
[0769] CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
[0770] CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTC
[0771] ACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
[0772] GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAA
[0773] AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCAT
[0774] CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCA
[0775] AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
[0776] CAGCCGGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
[0777] GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
[0778] CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
[0779] AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

[0780] SEQ ID NO :39

[0781] ATGCAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACACATGGG
[0782] ATCCGGTTCTGCTACTGGTGGTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCA

[0783] GGCAGTGC GACTCATCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCA
[0784] CACATGTCCACCTTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGT
[0785] TTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC
[0786] CCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
[0787] GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA
[0788] GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
[0789] GCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA
[0790] AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAAACCA
[0791] TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG
[0792] CCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGC
[0793] CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
[0794] AATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA
[0795] CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG
[0796] CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC
[0797] TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA
[0798] ATAA
[0799] SEQ ID NO :40
[0800] ATGGGTGCACAGCAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCGA
[0801] ACACATGGGATCCGGTTCTGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAG
[0802] CTCTGGTTCAGGCAGTGC GACTCATCAGGAAGAATGCGAATGGGACCC
[0803] ATGGACTTGCGAACACATGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAA
[0804] CTCACACATGTCCACCTTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGT
[0805] CAGTTTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG
[0806] GACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC
[0807] CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG
[0808] CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG
[0809] GTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG
[0810] TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAA
[0811] ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC
[0812] CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGAC
[0813] CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
[0814] GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGC
[0815] TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACA
[0816] AGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG
[0817] AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
[0818] GTAAATAA
[0819] SEQ ID NO :41
[0820] ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCAGCACCTGAACTCCTG
[0821] GGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC

[0822] ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
[0823] CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
[0824] GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
[0825] CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
[0826] ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
[0827] CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
[0828] ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
[0829] GGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
[0830] CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACCTACAAGACCA
[0831] CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCT
[0832] CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
[0833] CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
[0834] CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGAAATTCAACCC
[0835] GCTGGACGAGCTGGAAGAGACTCTGTACGAACAGTTTACTTTTCAACA
[0836] GCTCGAGTAA
[0837] SEQ ID NO :42
[0838] ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
[0839] GGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
[0840] ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
[0841] CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
[0842] GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
[0843] CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
[0844] ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
[0845] CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
[0846] ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
[0847] GGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
[0848] CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACCTACAAGACCA
[0849] CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCT
[0850] CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
[0851] CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
[0852] CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGGGATCCGGTTC
[0853] TGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGTGC
[0854] GACTCATAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAACTCTGTACGA
[0855] ACAGTTCACTTTCCAGCAACTCGAGTAA
[0856] SEQ ID NO :43
[0857] ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
[0858] GGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
[0859] ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
[0860] CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA

[0861] GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
[0862] CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
[0863] ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
[0864] CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
[0865] ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
[0866] GGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
[0867] CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCA
[0868] CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCT
[0869] CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
[0870] CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
[0871] CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGACAGAAATTCAACCC
[0872] GCTGGACGAACTGGAAGAACTCTGTACGAACAGTTCACTTTCCAGCA
[0873] GGGTGGTGGTGGTGGTGGCGGTGGTAAGTTCAACCCACTGGATGAGCT
[0874] GGAAGAGACTCTGTATGAACAGTTCACTTTCCAGCAACTCGAGTAA
[0875] SEQ ID NO :44
[0876] ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
[0877] GGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
[0878] ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
[0879] CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
[0880] GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
[0881] CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
[0882] ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
[0883] CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
[0884] ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
[0885] GGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
[0886] CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCA
[0887] CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCT
[0888] CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
[0889] CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
[0890] CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGACAGCAGGAAGAAT
[0891] GCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACACATGCTCGAGTAA
[0892] SEQ ID NO :45
[0893] ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
[0894] GGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
[0895] ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
[0896] CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
[0897] GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
[0898] CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
[0899] ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC

[0900] CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
[0901] ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
[0902] GGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
[0903] CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCA
[0904] CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCT
[0905] CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
[0906] CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
[0907] CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGGGATCCGGTTC
[0908] TGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGTGC
[0909] GACTCATCAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACACA
[0910] TGCTCGAGTAA
[0911] SEQ TD NO :46
[0912] ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
[0913] GGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
[0914] ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
[0915] CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
[0916] GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
[0917] CGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
[0918] ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
[0919] CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
[0920] ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
[0921] GGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
[0922] CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCA
[0923] CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCT
[0924] CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
[0925] CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
[0926] CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGCAGGAAGAAT
[0927] GCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACACATGGGATCCGGTTCGTGCTA
[0928] CTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGCGGACTC
[0929] ATCAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACACATGCTC
[0930] GAGTAA
[0931] SEQ ID NO :47
[0932] ATGGGTGCACAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACA
[0933] CATGGGTGGTGGTGGTGGTGGCGGTGGTAAATTCAACCCGCTGGACGA
[0934] ACTGGAAGAACTCTGTACGAACAGTTCACCTTCCAGCAGGGATCCGG
[0935] TTCTGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGT
[0936] GCGACTCATCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGgGACAAAACCTCACACATGT
[0937] CCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCTCT
[0938] TCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG

[0939] TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT
[0940] TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
[0941] CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
[0942] ACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
[0943] GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
[0944] AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT
[0945] CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
[0946] AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
[0947] CAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
[0948] GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTGG
[0949] CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
[0950] AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA
[0951] SEQ ID NO :48
[0952] ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
[0953] GGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
[0954] ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
[0955] CACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
[0956] GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
[0957] CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCCTACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGA
[0958] ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
[0959] CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
[0960] ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
[0961] GGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
[0962] CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCA
[0963] CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCT
[0964] CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
[0965] CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
[0966] CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGACAGGGATCCGGTTC
[0967] TGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGTGC
[0968] GACTCATAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAACTCTGTACGA
[0969] ACAGTTCACTTTCCAGCAGGGTGGTGGCGGTGGTCAGGAAGAATGCGA
[0970] ATGGGACCCATGGACTTGCGAACACATGCTCGAGTAA
[0971] SEQ ID NO :49
[0972] ATGGGTGCACAGTTCGACTACTGCGAAGGTGTTGAAGACCCGTTCCT
[0973] TTCGGTTGCGACAACCACCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAAAC
[0974] TCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTC
[0975] AGTTTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG
[0976] ACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCT
[0977] GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC

[0978] AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT
[0979] CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA
[0980] CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAAAC
[0981] CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC
[0982] TGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT
[0983] GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
[0984] GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG
[0985] GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG
[0986] AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG
[0987] GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT
[0988] AAATAA
[0989] SEQ ID NO :50
[0990] ATGGGTGCACAGCAGTACGGTTGCGACGGTTTTCTGTACGGTTGCATG
[0991] ATCAACCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACTCACACATGTCC
[0992] ACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTC
[0993] CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
[0994] ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC
[0995] AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC
[0996] GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA
[0997] CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
[0998] GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAAACCATCTCCAAA
[0999] GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC
[1000] CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
[1001] AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
[1002] AGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
[1003] GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
[1004] CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
[1005] AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA
[1006] SEQ ID NO :51
[1007] ATGGGTGCACAGAAACGCCCATGCGAAGAAATGTGGGGTGGTTGCAA
[1008] CTACGACCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACTCACACATGTC
[1009] CACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCTCTT
[1010] CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
[1011] CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT
[1012] CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
[1013] CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
[1014] ACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
[1015] GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAAACCATCTCCAA
[1016] AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT

[1017] CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
[1018] AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
[1019] CAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
[1020] GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
[1021] CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
[1022] AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA
[1023] SEQ ID NO :52
[1024] ATGGGTGCACAGCACCAGATCTGCAAAATGGGACCCGTGGACCTGCAA
[1025] AACTGGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCACACATGTC
[1026] CACCTTGCCACGACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTT
[1027] CCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
[1028] CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT
[1029] CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
[1030] CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
[1031] ACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
[1032] GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
[1033] AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT
[1034] CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
[1035] AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
[1036] CAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
[1037] GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
[1038] CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
[1039] AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA
[1040] SEQ ID NO :53
[1041] ATGGGTGCACAGAAACGTCCATGCGAAGAAATCTTCGGTGGTTGCACC
[1042] TACCAGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCACACATGTCC
[1043] ACCTTGCCACGACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTC
[1044] CCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
[1045] ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC
[1046] AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC
[1047] GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA
[1048] CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
[1049] GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA
[1050] GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC
[1051] CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
[1052] AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
[1053] AGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
[1054] GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
[1055] CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC

[1056] AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

[1057] 实施例 6

[1058] 肽抗体分析

[1059] 应用中和作用 ELISA 分析十四种肽抗体,应用亲和力 ELISA 分析三种肽抗体。表 5 给出结果。

[1060] 表 5

[1061]

肽抗体	hAng-2		mAng-2		hAng-1	
	IC 50 (nM)	EC 50 (nM)	IC 50 (nM)	EC 50 (nM)	IC 50 (nM)	EC 50 (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	没有抑制	没有结合
2xL1 (C)	0.90		1.0			
Con4 (N) 1K-WT			1.9			
L1 (N)	6		11		没有抑制	
C17 (N)	9		13		没有抑制	
12-9 (N)	21		7.7		没有抑制	
Con1 (N)	26		~ 200		没有抑制	
8-14 (N)	45		33		没有抑制	
L1 (C)	65		37			
8-8 (N)	80		~ 700		没有抑制	
阴性对照 肽抗体 4883	没有抑制	没有结合	没有抑制	没有结合	没有抑制	没有结合

[1062]

[1063] 下面是阴性对照肽抗体 4883 的氨基酸序列 (Fc 部分是下划线,连接体是 "GGGGG",肽部分是粗体):

[1064] MDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD

[1065] VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL

[1066] HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS

[1067] RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD

[1068] SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS

[1069] PGK-GGGGG-**CTAGYHWNSDCECCRRN** (SEQ ID NO :243)

[1070] 要明白这里使用术语 "没有抑制" 不是指化合物没有抑制能力。实际上,这里使用的 "没有抑制" 指当应用中和作用 ELISA 分析在这里描述的条件下测试时表现出大于 1000nM 的 IC₅₀ 值的那些化合物,这是筛选的这些化合物的最高浓度。当对于标记的分子没有发现显著抑制能力时当作表现出 "没有抑制作用",明白在不同的测试条件下,或者

在不同的测试中,那些化合物事实上可以证实抑制能力。在优选的实施方案中,明白本发明涉及应用这里描述的分析具有抑制能力的肽抗体。

[1071] 应用亲和力 BIAcore 分析(如实施例 2 所述)分析两种肽抗体。下面的表 6 给出结果。

[1072] 表 6

[1073] 肽抗体 (Pb) 对于 hAng-2 和 mAng-2 的亲和力

[1074]

肽抗体	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

[1075] 实施例 7

[1076] 全身施用 Ang-2 肽抗体的治疗功效研究

[1077] 肿瘤攻击之后 72 小时以每天一次的治疗方案对携带 A431 肿瘤的小鼠皮下施用 Ang-2 肽抗体, TN8-Con4-C。使用的肽抗体的剂量是 1000, 200, 40 和 8 微克 / 小鼠 / 天。对所有的动物公共给药 20 剂。每周三次记录肿瘤体积和体重。研究结束时, 杀死动物, 收集它们的血清并且通过 ELISA 测定肽抗体水平。从所有的组收集肿瘤和正常组织。

[1078] 图 1 给出结果。可以看出, Ang-2 肽抗体治疗组和赋形剂对照组之间观察到肿瘤生长的显著差异。与赋形剂对照组相比, 所有四剂 Ang-2 肽抗体抑制肿瘤生长 ($p < 0.0001$ 对赋形剂对照组, 利用反复测定 ANOVA)。相反, 对照组中肿瘤继续以快得多的速度生长。用这种融合体治疗对用上述剂量治疗的动物的最后体重, 器官重量或血液学参数没有显著影响。

[1079] 实施例 8

[1080] 1. Ang-2 第二肽文库的构建

[1081] A. 电感受态大肠杆菌细胞

[1082] Epicurian **Coli**® XL1-Blue MRF' 电穿孔感受态细胞 (Stratagene#200158) 从 Stratagene (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Calif.) 购得。

[1083] B. pCES1 载体的修饰

[1084] 应用 Extend Long Template PCR Systems (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, Ind.), 使用 1 微克的 pCES1 载体 (TargetQuest Inc.) 作为模板进行 PCR。PCR 混合物体积是 100 微升, 它含有 1xPCR 缓冲液, 200nM 的两种引物的每一种: 5' -CAAAC GAATGGATCCTCATTAAGCCAGA-3' (SEQ ID NO:244) 和

[1085] 5' -GGTGGTGC GCCGCACTCGAGACTGTTGAAAGTTGTTTAGCA-3' (SEQ ID NO:245), 200nM dNTP, 和 3 单位 (U) 的 Tag DNA 聚合酶。TRI0-Thermoblock (Biometra) PCR 系统如下

运行:94℃ 5 分钟;94℃ 30 秒,50℃ 30 秒,72℃ 45 秒 30 次循环;和 72℃ 10 分钟;冷却至 4℃。

[1086] 然后将 PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶上电泳,并且用 QIAGEN 旋转柱(QIAGEN Inc., Valencia, Calif.) 根据厂商提供的方案纯化。在如上所述相同的 PCR 条件下,使用 5 微升的 PCR 产物和 200nM 的两种引物的每一种 5' -CAAACGAATGGATCCTCATTAAGCCAGA-3' (SEQ ID NO:246) 和 5' -AACACAAAAGTGCACAGGGTGGAGGTGGTGGTGGCGCCGCACT-3' (SEQ ID NO:247) 进行第二 PCR 反应。

[1087] 然后在 37℃ 下在含有 1xNEB2 缓冲液,60U 的 ApaLI(New England Biolabs, Beverly, Mass.),60U 的 BamHI(New England Biolabs) 的 100 微升反应液中分别消化 PCR 产物和原始 pCES1 载体 1 小时。然后利用 QIAGEN Spin Column 纯化消化过的 DNA,并且在室温下在含有 1x 连接缓冲液和 40U 的 T4 DNA 连接酶(New England Biolabs) 的 40 微升反应中连接过夜。

[1088] 将载体转染到大肠杆菌中并且在 37℃ 下温育过夜。选择分离的单一菌落并且用 QIAGEN Spin Column 将质粒纯化。通过 DNA 测序证实正确的插入片段。

[1089] C. 载体 DNA 的制备

[1090] 使用 Gene Pulser II(BIO-RAD, Hercules, Calif.), 设置 2500V, 25 μF, 和 200ohms, 将 1 微克修饰的 pCES1 载体 DNA(从上述 1B 获得) 转化到 40 微升电感受态 XL1-blue 大肠杆菌(从上述 1A 获得) 中。然后将转化的细菌样品立刻转移到含有 960 微升 SOC(2%胰蛋白胨,0.5%酵母提取物,10mM NaCl,2.5mM KCl,20mM 葡萄糖,10mM MgSO₄, 10mM MgCl₂) 的试管中,并且摇动下在 37℃ 下让培养物生长 1 小时。

[1091] 然后将细胞分布在 2xYTAGT(2xYT,含有 100 微克/毫升氨苄青霉素,12.5 微克/毫升四环素和 2%葡萄糖) 琼脂板上并且在 37℃ 下温育过夜。测序证实单一菌落,并且用来在 37℃ 下摇动下接种 2 升 2xYTAGT 培养基过夜。用 QIAGEN Plasmid Maxi 试剂盒根据生产商提供的说明纯化质粒载体 DNA。

[1092] D. 载体 DNA 的消化

[1093] 在 37℃ 下在含有 1xNEB 缓冲液,2,300U 的 ApaLI,和 300U 的 XhoI 的 5000 微升反应中将总共大约 2000 微克的载体 DNA(从上面 1C 获得) 消化过夜。限制性消化反应在 37℃ 下温育过夜并且在预先制备的 0.8%琼脂糖凝胶(Embi Tec, San Diego, Calif.) 上分析。然后从凝胶上切除线性载体 DNA,并且用 QIAquick 凝胶提取试剂盒(QIAGEN Inc.) 根据厂商说明提取。

[1094] E. 文库寡核苷酸的制备

[1095] 在从上述结果产生的序列的基础上设计六个文库寡核苷酸(1 个固定,5 个掺入)。一个固定的文库寡核苷酸是:

[1096] 5' -CACAGTGCACAGGGTNNKNNKNNKNNKNNKNNKSARTGGGATCCGTGGASCNNKNNKNNKNNKNNKNNKCATT CTCTCGAGATCA-3' (文库号 20) (SEQ ID NO:248);

[1097] 两个 70%掺入的文库寡核苷酸是:

[1098] 5' -CACAGTGCACAGGGTNNKNNKNNKaaKcgKccKNNKgaKgaKatKttKggKggKNNKacKtaKcaKNNKNNKNNKCATTCTC

[1099] TCGAGATCA-3' (文库号 27);(SEQ ID NO:249);

[1100] 5' -CACAGTGCACAGGGTNNKaaKttKaaKccKctKgaKgaKctKgaKgaKacKctKtaKgaKcaKttKacKttKcaKcaKNNKATTCTCTCGAGATCA-3' (文库号 99); (SEQ ID NO:250);

[1101] 小写字母表示指定碱基的 70%和另三个核苷酸各自的 10%的混合物。另三个 91%掺入的文库寡核苷酸如下:

[1102] 5' -CACAGTGCACAGGGTNNKNNKNNKcaKgaKgaKTGCgaKtgKgaKccKtgKacKTGCgaKcaKatKNNKNNKNNKATTCTCTCGAGA

[1103] TC A-3' (文库号 94); (SEQ ID NO:251);

[1104] 5' -CACAGTGCACAGGGTNNKttKgaKtaKNNKgaKggKgtKgaKgaKccKttKacKttKggKNNKgaKaaKcaKNNKATTCTCTCGAGATCA-3' (文库号 25); (SEQ ID NO:252); 和

[1105] 5' -CACAGTGCACAGGGTNNKaaKttKaaKccKctKgaKgaKctKgaKgaKacKctKtaKgaKcaKttKacKttKcaKcaKNNKATTCTCTCGAGATCA-3' (文库号 26); (SEQ ID NO:253);

[1106] 对于上述寡聚物,本领域技术人员明白" N"表示在寡核苷酸合成中同等代表四种核苷酸中的每一个(A,T,C,和G)," K"表示在寡核苷酸合成中同等代表核苷酸G和T。小写字母代表指定碱基的 91%和另三个核苷酸各自的 3%的混合物。这些寡核苷酸各自被用作 PCR 中的模板。

[1107] 对于 PCR 反应使用 Expand High Fidelity PCR System 试剂盒 (Roche Diagnostics Corp.)。在 96 个孔中在含有 1nM 的文库寡核苷酸, 1xPCR 缓冲液, 300nM 的各种引物 5' -CACAGTGCACAGGGT-3' (SEQ ID NO:254); 和 5' -TGATCTCGAGAGAATG-3', (SEQ ID NO:255), 200 μM dNTP, 1.5mM MgCl₂, 和 350U 的 Expand 聚合酶的 50 微升 PCR 反应中扩增各种文库寡聚物。

[1108] 使用热循环控制装置 (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) 进行下面的程序: 94°C, 5 分钟; (94°C 30 秒, 52.5°C 60 秒, 72°C 30 秒) x25 次循环; 72°C 10 分钟; 冷却至 4°C。使用 QIAquick PCR 纯化试剂盒 (QIAGEN Inc. Cat#28104), 根据厂商说明, 去除三个核苷酸。

[1109] F. 文库寡核苷酸的消化

[1110] 对于每个文库, 在 37°C 下在含有 1xNEB 缓冲液, 2, 750U 的 ApaLI, 和 750U 的 XhoI 的 1200 微升反应中将 PCR 产物 (1E 章节) 消化过夜。在预先制备的 3% 琼脂糖凝胶上 (Embi Tec) 分离消化的 DNA。从凝胶上切下各个反应中令人感兴趣的 DNA 泳带并且用 COSTAR Spin-X 离心管过滤器, 0.22 微米乙酸纤维素 (Corning Inc., Cat#8160) 提取。

[1111] G. 载体与文库寡核苷酸的连接

[1112] 450 微升连接反应含有 1 : 5 摩尔比的线性载体 (1D 章节) 和各种消化的文库 PCR 产物 (1F 章节), 1xNEB 连接缓冲液, 和 20, 000U 的 T4 DNA 连接酶, 在 16°C 下反应过夜。经连接的产物在 65°C 下温育 20 分钟, 以灭活 T4DNA 连接酶, 并且进一步与 100U 的 NotI 在 37°C 下温育 2 小时, 将载体自身连接最小化。然后通过标准苯酚 / 氯仿萃取法 (Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Maniatis 等, 第三版, 冷泉干实验出版社, 2000) 纯化经连接的产物全部重新悬浮于 120 微升的 H₂O。

[1113] H. 电穿孔转化

[1114] 对于每个文库, 进行 12 个电穿孔反应。对于每一次转化, 在 0.2-cm 小杯 (BIO-RAD) 中混合 10 微升的连接载体 DNA (1G 章节) 和 300 微升的 XL1-BLUE MRF' 细胞 (1A 章节)。

得到的混合物用设置在 2500V, 25 μ F, 和 200ohms 的 Gene Pulser II 脉冲处理。然后将来自 12 个电穿孔反应的转化细胞合并并且转移到含有 26 毫升 SOC 的烧瓶中, 在 37°C 下温育 1 小时。将细胞加给 450ml 2xYT_{AG}, 并且搅拌下在 37°C 下摇动培养 5 小时。在 4°C 下以 4000rpm 将细胞离心 15 分钟。然后将细胞颗粒状物重新悬浮于 12 毫升的 15% 甘油 / 2xYT 并且在 -80°C 下贮存。这是文库的第一原液。滴度表示 5.0x10⁶ (文库数目 20), 3.3x10⁶ (文库数目 94), 4.7x10⁶ (文库数目 25), 5.0x10⁶ (文库数目 26), 3.0x10⁶ (文库数目 27), 和 4.2x10⁶ (文库数目 99) 独立的转化体的文库大小。

[1115] 2. 文库的扩增

[1116] A. 制备文库的第二原液

[1117] 从第一文库细胞原液 (从上文 1H 章节获得), 使用覆盖 10X 过量各个文库大小的足量的细胞接种 2xYT_{AGT} (2YT, 含有 100 微克 / 毫升氨苄青霉素, 12.5 微克 / 毫升四环素和 2% 葡萄糖) 培养基使得起始 OD₆₀₀ 是 0.1。让培养物在 37°C 下摇动下生长几小时直到 OD₆₀₀ = 0.5。从各个文库取出十分之一等分并且在分开的烧瓶中在 37°C 下又培养 2 小时。然后使用 Beckman JA-14 转床在 4°C 下将这些传代培养物以 4000rpm 离心, 并且将细菌颗粒状物重新悬浮于 7.0ml (对于各个文库) 分 15% 甘油 / 2xYT, 在 -80°C 下贮存。

[1118] B. 噬菌体诱导

[1119] 向保留的 OD₆₀₀ = 0.5 (从上文 2A 章节得到) 的细菌培养物加入 M13K07 辅助噬菌体等份 (Amersham Pharmacia Biotech) 达到 3x10⁶ pfu / 毫升最终浓度。让辅助噬菌体在 37°C 下在不摇动下感染细菌 30 分钟, 在慢速摇动下感染细菌 30 分钟。在 4°C 下将感染的细胞以 5000rpm 离心 15 分钟。将细胞颗粒状物重新悬浮于相同体积的 (见上文 2A 章节) 2xYT_{AK} 培养基 (2YT, 含有 100 微克 / 毫升氨苄青霉素和 40 微克 / 毫升卡那霉素)。让噬菌粒产生在摇动下在 30°C 下反应过夜。

[1120] C. 噬菌体收集

[1121] 在 4°C 下将上文 2B 章节获得的细菌培养物以 5000rpm 离心 15 分钟。然后将上清液转移到新瓶中, 加入 0.2 体积的 20% PEG/2.5M NaCl 并且在冰上温育 1 小时沉淀噬菌粒。在 4°C 下将沉淀出的噬菌粒以 10,000rpm 离心 30 分钟并且小心地悬浮于 100ml 的冷 PBS 中。通过在 4°C 下以 4000rpm 离心 10 分钟去除残留的细胞进一步纯化噬菌粒溶液, 并且通过加入 0.2 体积的 20% PEG/2.5M NaCl 沉淀出噬菌粒。4°C 下以 10,000rpm 将噬菌粒离心 30 分钟, 并且将噬菌粒颗粒状物重新悬浮于 18ml 的冷 PBS。向噬菌粒溶液加入 6 毫升 60% 甘油溶液, 在 -80°C 下贮存。通过标准方法测定噬菌粒滴度 (MolecularCloning, Maniatis 等, 第三版)。

[1122] 3. Ang-2 结合噬菌体的筛选

[1123] A. Ang-2 在磁珠上的固定化

[1124] 以对于生产商提供的 100 微升珠原料 2000ng Ang-2 蛋白质的浓度在 Dynabead M-280 Streptavidin (DYNAL, Lake Success, N.Y.) 上固定生物素化 Ang-2 (来自上文 3A 章节)。使用磁子将小珠拉到试管的一边并且吸移出液体之后, 用磷酸缓冲盐水 (PBS) 将小珠洗涤两次。以上述浓度向洗过的小珠加入生物素化 Ang-2 蛋白质, 并且在室温下旋转温育 1 小时。然后通过加入 BSA 至 2% 终浓度并且 4°C 下旋转温育过夜将 Ang-2 包被小珠封闭。然后用 PBST (含有 0.05% Tween-20 的 PBS) 将得到的 Ang-2 包被小珠清洗两次, 然后

进行筛选程序。

[1125] B. 使用 Ang-2 包被珠的筛选

[1126] 用 1 毫升含有 2% BSA 的 PBS 将大约 1000- 倍文库等价噬菌粒（来自上面的 2C 章节）封闭 1 小时。通过将其加给空白珠（和 3A 章节所述相同的珠，但是没有 Ang-2 蛋白质包被）让被封闭的噬菌粒样品进行三个阴性筛选步骤，并且转动下将这种混合物在室温下温育 15 分钟。使用磁体将含有噬菌粒的上清液排出并且转移到含有空白珠（和 3A 章节所述相同的珠，但是其上没有 Ang-2 蛋白质包被）的第二试管，将这种混合物在室温下旋转下温育 15 分钟。

[1127] 重复该程序。使用磁体将含有噬菌粒的上清液排出并且转移到含有 Ang-2 蛋白质包被珠（来自 3A 章节）的新试管中，将这种混合物在室温下旋转下温育 1 小时。弃除上清液之后，噬菌粒 - 结合 - 珠用 2% 奶 -PBS 洗涤 10 次；用 2% BSA-PBS 洗涤 10 次；用 PBST 洗涤 10 次和用 PBS 洗涤两次。然后在旋转装置上让噬菌粒在 1 毫升的 100mM 三乙胺溶液（Sigma, St. Louis, Mo.）中洗脱 10 分钟。通过加入 0.5ml 的 1M Tris-HCl (pH7.5) 将含有噬菌粒的溶液的 pH 中和。使用得到的噬菌粒在 37℃ 下不摇动感染 10ml 新鲜培养的 XL1-Blue MRF' 细菌 (OD_{600} 大约 0.5) 30 分钟并且慢速摇动下感染 30 分钟。然后将所有的感染的 XL1-BLUE MRF' 细胞在 15x5cm 2xYTAg 板上平板培养，在 30℃ 下培养过夜。

[1128] C. 噬菌体的诱导和收获

[1129] 将 10ml 等份的 2xYTAgT 培养基加给培养板（来自 3B 章节）以悬浮 XL1-BLUE MRF' 细胞。所有的 XL1-BLUE MRF' 细胞收集在试管中，并且将 250 微升等份的这些细胞加给 25ml 的 2xYTAgT 并且在 37℃ 下生长至 $OD_{600} = 0.5$ 。M13K07 辅助噬菌体加至 3×10^6 cfu/ml 的终浓度并且在 37℃ 下不摇动温育 30 分钟并且慢速摇动下温育 30 分钟。在 4℃ 下将细胞以 5000rpm 离心 10 分钟并且用 25ml 的 2xYTAK 再次悬浮。让这些细胞在 30℃ 下摇动下生长过夜。收获诱导的噬菌粒并且和 2C 章节一样加以纯化。

[1130] D. 第二轮筛选

[1131] 除了下面的操作外，根据上文 3B 至 3C 章节描述的要点进行第二轮筛选。从 3C 章节得到的大约 100- 倍文库等价噬菌粒用作输入噬菌粒。包被到 Dynabead M-280 Streptavidin 上的生物素化 Ang-2 蛋白质（3A 章节）的量降至 20ng。然后噬菌体 - 结合 - 珠用 2% 奶 -PBS 洗涤 10 次；用 2% BSA-PBS 洗涤 10 次；用 PBST 洗涤 10 次，其中最后洗涤包括在 PBST 中在室温下温育 60 分钟。小珠用 PBS 洗涤两次。洗脱条件和第一轮相同（3B 章节）。

[1132] E. 第三轮筛选

[1133] 除了下面的操作外，根据上文 3B 至 3C 章节描述的要点进行第三轮筛选。从 3D 章节得到的大约 10- 倍文库等价噬菌粒用作输入噬菌粒。使用大约 2ng 的生物素化 Ang-2 蛋白质（3A 章节）包被 DynabeadM-280Streptavidin。噬菌体 - 结合 - 珠用 2% 奶 -PBS 洗涤 10 次；用 2% BSA-PBS 洗涤 10 次；用 PBST 洗涤 10 次，其中最后洗涤包括在 PBST 中在室温下温育 60 分钟。小珠用 PBS 洗涤两次。洗脱条件和第一轮相同（3B 章节）。

[1134] F. 第四轮筛选

[1135] 除了下面的操作外，根据上文 3B 至 3C 章节描述的要点进行第四轮筛选。从 3E 章节得到的文库等价噬菌粒用作输入噬菌粒。对于文库 25, 26, 和 27, 包被到 Dynabead M-280

Streptavidin 上的生物素化 Ang-2 蛋白质 (3A 章节) 的量降至 0.4ng。对于文库 20 和 94, 包被量和第三轮一样保持在 2ng。文库 99 没有进行第四轮筛选步骤。洗脱条件和第一轮相同 (3B 章节)。

[1136] 4. 克隆分析

[1137] A. 主板的制备

[1138] 从第二轮筛选取单一菌落并且接种每孔含有 120 微升的 2xYTAgT 的 96 孔板。96 孔板在摇动下在 30°C 下温育过夜。每孔加入 40 微升的 60% 甘油, 在 -80°C 下贮存。

[1139] B. 噬菌粒 ELISA

[1140] 用来自主板的大约 2 微升等份的细胞 (来自上文 4A 章节) 接种新鲜 **Costar®** 96 孔板 (Corning incorporated, Corning, N. Y., cat. #9794), 它每孔含有 100 微升的 2xYTAgT, 这个新的细胞培养板在 37°C 下培养直到大约 $OD_{600} = 0.5$ 。

[1141] 向每个孔加入 40 微升的含有 M13K07 辅助噬菌体 (1.5×10^{13} cfu/ml) 的 2xYTAgT, 96 孔板在 37°C 下不摇动温育 30 分钟并且在摇动下又温育 30 分钟。培养板在 4°C 下以 2000rpm (Beckman CS-6R 桌面离心机) 离心 10 分钟。从孔中去除上清液, 并且将每种细胞颗粒状沉淀重新悬浮于 150 微升的 2xYTAK/ 孔。培养板在 30°C 下温育过夜用于噬菌粒的表达。

[1142] 在 4°C 下以 1xPBS 中 1 微克/毫升用人 Ang-2 蛋白质包被 96 孔 Maxisorp 板 (NUNC) 过夜。作为对照, 2% BSA (Sigma) 包被分开的 Maxisorp 板。第二天, 在 4°C 下以 2000rpm 将过夜细胞培养物离心 10 分钟。将来自各个孔的 10 微升上清液转移给含有 BSA/PBS 溶液以 1:10 稀释上清液的新的 96 孔板。得到的混合物在室温下摇动下温育 1 来封闭噬菌粒。同时, 每孔用 400 微升的 2% BSA/PBS 溶液将 Ang-2 蛋白质包被的培养板在室温下封闭 1 小时。弃除 BSA 溶液, 各个孔用 PBS 溶液清洗三次。最后洗涤步骤之后, 向 Ang-2 蛋白质包被的培养板和对照板的每个孔加入 100 微升的封闭的噬菌粒溶液, 并且在室温下摇动下温育 1 小时。弃除液体, 用 PBST 溶液将各个孔清洗三次。向 Ang-2 蛋白质包被的培养板和对照板的每个孔加入 100 微升的 15,000 稀释的 HRP-偶合抗-M13 mAb (Amersham Pharmacia Biotech), 这些板在室温下摇动下温育 1 小时。再次弃除液体, 各个孔用 PBST 溶液清洗三次。向孔中加入 100 微升的 LumiGLO 化学发光底物 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, Md.), 并且用 Luminoskan Ascent DL Rearly machine (Labsystems, Franklin, MA) 对各个孔读数。

[1143] C. 噬菌体克隆的测序

[1144] 使用来自主板 (4A 章节) 的 1 微升细菌作为模板进行 PCR 反应。各个 PCR 混合物的体积是 50 微升, 其含有 1xPCR 缓冲液, 300nM 的两种引物的每一种:

[1145] 5' -GTTAGCTCACTCATTAGGCAC-3' (SEQ ID NO:256) 和

[1146] 5' -GTACCGTAACACTGAGTTTCG-3', (SEQ ID NO:257);

[1147] 200 μ M dNTP, 2mM $MgCl_2$, 和 2.5U taq DNA 聚合酶 (Roche Molecular Biochemicals)。使用 The GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) 进行下面的程序: 94°C 5 分钟; (94°C 45 秒, 55°C 45 秒, 72°C 90 秒) 40 个循环; 72°C 10 分钟; 冷却到 4°C。使用 QIAquick 96 PCR 纯化试剂盒 (QIAGEN Inc.) 根据厂商说明纯化 PCR 产物。使用 ABI 3770 测序仪 (Perkin Elmer) 根据厂商说明, 用引物 5' -TTACACTTTATGCTTCCG-3' (SEQ ID

NO :258) 对所有的纯化的 PCR 产物测序。

[1148] 5. 序列排列

[1149] 从核苷酸序列 (从上文 4C 章节获得) 翻译的肽序列与 ELISA 数据有相关性。认为显示在 Ang-2 包被孔中读取高 OD 并且在 BSA 包被孔中读取低 OD 值的更重要。出现多次的序列也认为是重要的。从文库 20 选择 24 个肽序列, 从文库 94 选择 26 个肽序列, 从文库 25 选择 7 个肽序列, 从文库 25 选择 18 个肽序列, 从文库 27 选择 6 个肽序列, 从文库 99 选择 4 个肽序列用于进一步分析和肽抗体制备。另外, 从文库 20 和 94 推断 11 个共有序列, 从文库 26 和 99 推断 3 个共有序列, 从文库 25 推断 2 个共有序列, 并且用来制备肽抗体。使用这里实施例 10 描述的中和作用 ELISA 方法评价表 7 中的肽抗体。结果在表 7 中给出。

[1150] 表 7

[1151]

Con4 衍生的 亲和性 - 成熟 Pbs	hAng-2 :Tie2 IC ₅₀ (nM)	肽抗体序列 (SeqIdNo :)
Con4-44 (C)	0.09	M-Fc-GGGGGAQ- PIRQEECDWDPWTCEHMWEV-LE (SEQIDNO :259)
Con4-40 (C)	0.10	M-Fc-GGGGGAQ- TNIQEECEWDPWTCDHMPGK-LE (SEQIDNO :260)
Con4-4 (C)	0.12	M-Fc-GGGGGAQ- WYEQDACEWDPWTCEHMAEV-LE (SEQIDNO :261)
Con4-31 (C)	0.16	M-Fc-GGGGGAQ- NRLQEVCEWDPWTCEHMENV-LE (SEQIDNO :262)
Con4-C5 (C)	0.16	M-Fc-GGGGGAQ- AATQEECEWDPWTCEHMPRS-LE (SEQIDNO :263)
Con4-42 (C)	0.17	M-Fc-GGGGGAQ- LRHQEGCEWDPWTCEHMFWD-LE (SEQIDNO :264)

Con4 衍生的 亲和性 - 成熟 Pbs	hAng-2 :Tie2 IC ₅₀ (nM)	肽抗体序列 (SeqIdNo :)
Con4-35 (C)	0.18	M-Fc-GGGGGAQ- VPRQKDCEWDPWTCEHMYVG-LE (SEQIDNO :265)
Con4-43 (C)	0.18	M-Fc-GGGGGAQ- SISHEECEWDPWTCEHMQVG-LE (SEQIDNO :266)
Con4-49 (C)	0.19	M-Fc-GGGGGAQ- WAAQEECEWDPWTCEHMGRM-LE (SEQIDNO :267)
Con4-27 (C)	0.22	M-Fc-GGGGGAQ- TWPQDKCEWDPWTCEHMGST-LE (SEQIDNO :268)
Con4-48 (C)	0.26	M-Fc-GGGGGAQ- GHSQEECGWDPWTCEHMGTS-LE (SEQIDNO :269)
Con4-46 (C)	0.26	M-Fc-GGGGGAQ- QHWQEECEWDPWTCDHMP SK-LE (SEQIDNO :270)
Con4-41 (C)	0.26	M-Fc-GGGGGAQ- NVRQEKCEWDPWTCEHMPVR-LE (SEQIDNO :271)
Con4-36 (C)	0.28	M-Fc-GGGGGAQ- KSGQVECNWDPWTCEHMPRN-LE (SEQIDNO :272)
Con4-34 (C)	0.28	M-Fc-GGGGGAQ- VKTQEHCWDPWTCEHMREW-LE (SEQIDNO :273)

Con4 衍生的 亲和性 - 成熟 Pbs	hAng-2 :Tie2 IC ₅₀ (nM)	肽抗体序列 (SeqIdNo :)
Con4-28 (C)	0. 30	M-Fc-GGGGGAQ- AWGQEGCDWDPWTCEHMLPM-LE (SEQIDNO :274)
Con4-39 (C)	0. 30	M-Fc-GGGGGAQ- PVNQEDCEWDPWTCEHMPPM-LE (SEQIDNO :275)
Con4-25 (C)	0. 31	M-Fc-GGGGGAQ- RAPQEDCEWDPWTCAHMDIK-LE (SEQIDNO :276)
Con4-50 (C)	0. 38	M-Fc-GGGGGAQ- HGQNMECEWDPWTCEHMFY-LE (SEQIDNO :277)
Con4-38 (C)	0. 40	M-Fc-GGGGGAQ- PRLQEECVDPWTCEHMPLR-LE (SEQIDNO :278)
Con4-29 (C)	0. 41	M-Fc-GGGGGAQ- RTTQEKCEWDPWTCEHMESQ-LE (SEQIDNO :279)
Con4-47 (C)	0. 44	M-Fc-GGGGGAQ- QTSQEDCVDPWTCDHMVSS-LE (SEQIDNO :280)
Con4-20 (C)	0. 48	M-Fc-GGGGGAQ- QVIGRPCEWDPWTCEHLEGL-LE (SEQIDNO :281)
Con4-45 (C)	0. 48	M-Fc-GGGGGAQ- WAQQEECAWDPWTCDHMGVL-LE (SEQIDNO :282)

Con4 衍生的 亲和性 - 成熟 Pbs	hAng-2 :Tie2 IC ₅₀ (nM)	肽抗体序列 (SeqIdNo :)
Con4-37 (C)	0. 49	M-Fc-GGGGGAQ- LPGQEDCEWDPWTCEHVMRS-LE (SEQIDNO :283)
Con4-33 (C)	0. 52	M-Fc-GGGGGAQ- PMNQVECDWDPWTCEHMPRS-LE (SEQIDNO :284)
AC2-Con4 (C)	0. 52	M-Fc-GGGGGAQ- FGWSHGCEWDPWTCEHMGST-LE (SEQIDNO :285)
Con4-32 (C)	0. 75	M-Fc-GGGGGAQ- KSTQDDCDWDPWTCEHMGVP-LE (SEQIDNO :286)
Con4-17 (C)	0. 96	M-Fc-GGGGGAQ- GPRISTCQWDPWTCEHMDQL-LE (SEQIDNO :287)
Con4-8 (C)	1. 20	M-Fc-GGGGGAQ- STIGDMCEWDPWTCAHMQVD-LE (SEQIDNO :288)
AC4-Con4 (C)	1. 54	M-Fc-GGGGGAQ- VLGGQGCEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQIDNO :289)
Con4-1 (C)	2. 47	M-Fc-GGGGGAQ- VLGGQGCQWDPWTCSHLEDG-LE (SEQIDNO :290)
Con4-C1 (C)	2. 75	M-Fc-GGGGGAQ- TTIGSMCEWDPWTCAHMQGG-LE (SEQIDNO :291)

Con4 衍生的 亲和性 - 成熟 Pbs	hAng-2 :Tie2 IC ₅₀ (nM)	肽抗体序列 (SeqIdNo :)
Con4-21 (C)	3. 21	M-Fc-GGGGGAQ- TKGKSVCQWDPWTCSHMQSG-LE (SEQIDNO :292)
Con4-C2 (C)	3. 75	M-Fc-GGGGGAQ- TTIGSMCQWDPWTCAHMQGG-LE (SEQIDNO :293)
Con4-18 (C)	4. 80	M-Fc-GGGGGAQ- WVNEVVCEWDPWTCNHWDTP-LE (SEQIDNO :294)
Con4-19 (C)	5. 76	M-Fc-GGGGGAQ- VVQVGMQWDPWTCKHMLQ-LE (SEQIDNO :295)
Con4-16 (C)	6. 94	M-Fc-GGGGGAQ- AVGSQTCEWDPWTCAHLVEV-LE (SEQIDNO :296)
Con4-11 (C)	9. 70	M-Fc-GGGGGAQ- QGMKMFCEWDPWTCAHIVYR-LE (SEQIDNO :297)
Con4-C4 (C)	9. 80	M-Fc-GGGGGAQ- TTIGSMCQWDPWTCEHMQGG-LE (SEQIDNO :298)
Con4-23 (C)	9. 88	M-Fc-GGGGGAQ- TSQRVGCEWDPWTCQHLYT-LE (SEQIDNO :299)
Con4-15 (C)	15. 00	M-Fc-GGGGGAQ- QWSWPPCEWDPWTCQTVWPS-LE (SEQIDNO :300)

Con4 衍生的 亲和性 - 成熟 Pbs	hAng-2 :Tie2 IC ₅₀ (nM)	肽抗体序列 (SeqIdNo :)
Con4-9 (C)	20. 11	M-Fc-GGGGGAQ- GTSPSFCQWDPWTC SHMVQG-LE (SEQIDNO :301)
Con4-10 (C)	86. 61	M-Fc-GGGGGAQ- TQGLHQCEWDPWTCKVLWPS-LE (SEQIDNO :302)
Con4-22 (C)	150. 00	M-Fc-GGGGGAQ- VWRSQVCQWDPWTCNLGGDW-LE (SEQIDNO :303)
Con4-3 (C)	281. 50	M-Fc-GGGGGAQ- DKILEECQWDPWTCQFFYGA-LE (SEQIDNO :304)
Con4-5 (C)	没有抑制	M-Fc-GGGGGAQ- ATFARQCQWDPWTCALGGNW-LE (SEQIDNO :305)
Con4-30 (C)	没有抑制	M-Fc-GGGGGAQ- GPAQEECEWDPWTCEPLPLM-LE (SEQIDNO :306)
Con4-26 (C)	没有抑制	M-Fc-GGGGGAQ- RPEDMCSQWDPWTWHLQGYC-LE (SEQIDNO :307)
Con4-7 (C)	没有抑制	M-Fc-GGGGGAQ- LWQLAVCQWDPQTCDHMGAL-LE (SEQIDNO :308)
Con4-12 (C)	没有抑制	M-Fc-GGGGGAQ- TQLVSLCEWDPWTCRLLDGW-LE (SEQIDNO :309)

Con4 衍生的 亲和性 - 成熟 Pbs	hAng-2 :Tie2 IC ₅₀ (nM)	肽抗体序列 (SeqIdNo :)
Con4-13 (C)	没有抑制	M-Fc-GGGGGAQ- MGGAGRCEWDPWTCQLLQGW-LE (SEQIDNO :310)
Con4-14 (C)	没有抑制	M-Fc-GGGGGAQ- MFLPNECQWDPWTCSNLPEA-LE (SEQIDNO :311)
Con4-2 (C)	没有抑制	M-Fc-GGGGGAQ- FGWSHGCEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQIDNO :312)
Con4-6 (C)	没有抑制	M-Fc-GGGGGAQ- WPQTEGCQWDPWTCRLLHGW-LE (SEQIDNO :313)
Con4-24 (C)	没有抑制	M-Fc-GGGGGAQ- PDTRQGCQWDPWTCRLYGMW-LE (SEQIDNO :314)
AC1-Con4 (C)	没有抑制	M-Fc-GGGGGAQ- TWPQDKCEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQIDNO :315)
AC3-Con4 (C)	没有抑制	M-Fc-GGGGGAQ- DKILEECEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQIDNO :316)
AC5-Con4 (C)	没有抑制	M-Fc-GGGGGAQ- AATQEECEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQIDNO :317)
L1 衍生的 亲和性 - 成熟 Pbs	hAng-2 :Tie2 IC ₅₀ (nM)	肽抗体序列 (SeqIdNo :)

Con4 衍生的 亲和性 - 成熟 Pbs	hAng-2 :Tie2 IC ₅₀ (nM)	肽抗体序列 (SeqIdNo :)
L1-7 (N)	0.03	MGAQ- TNFMPMDDEQRLYEQFILQQG- LEGGGGG-Fc (SEQIDNO :318)
AC6-L1 (N)	0.03	MGAQ- TNYKPLDELDATLYEHWILQHS LEGGGGG-Fc (SEQIDNO :319)
L1-15 (N)	0.04	MGAQ- QKYQPLDELDKTLYDQFMLQQG LEGGGGG-Fc (SEQIDNO :320)
L1-2 (N)	0.04	MGAQ-LNFTPLDELEQTLYEQWTLQQS LEGGGGG-Fc (SEQIDNO :321)
L1-10 (N)	0.05	MGAQ- QKFQPLDELEQTLYEQFMLQQA LEGGGGG-Fc (SEQIDNO :322)
L1-139 (N)	0.05	MGAQ- QEYEPLDELDETLYNQWMFHQR LEGGGGG-Fc (SEQIDNO :323)
L1-5 (N)	0.05	MGAQ-VKYKPLDELDEILYEQQTFQER LEGGGGG-Fc (SEQIDNO :324)

Con4 衍生的 亲和性 - 成熟 Pbs	hAng-2 :Tie2 IC ₅₀ (nM)	肽抗体序列 (SeqIdNo :)
L1-C2 (N)	0.05	MGAQ- TKFQPLDELDTLYEQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQIDNO :325)
L1-C3 (N)	0.06	MGAQ- TNFQPLDELDTLYEQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQIDNO :326)
L1-11 (N)	0.07	MGAQ- QNFKPMDELEDTLKQFLFQHS LEGGGGG-Fc (SEQIDNO :327)
L1-17 (N)	0.08	MGAQ- VKYKPLDELDEWLYHQFTLHHQ LEGGGGG-Fc (SEQIDNO :328)
L1-12 (N)	0.08	MGAQ- YKFTPLDDLEQTLYEQWTLQHV LEGGGGG-Fc (SEQIDNO :329)
L1-1 (N)	0.08	MGAQ-QNYKPLDELDATLYEHFIFHYT LEGGGGG-Fc (SEQIDNO :330)
L1-4 (N)	0.08	MGAQ- VKFKPLDALEQTLYEHWMFQQA LEGGGGG-Fc (SEQIDNO :331)

Con4 衍生的 亲和性 - 成熟 Pbs	hAng-2 :Tie2 IC ₅₀ (nM)	肽抗体序列 (SeqIdNo :)
L1-20 (N)	0.09	MGAQ- EDYMPLDALDAQLYEQFILLHG LEGGGGG-Fc (SEQIDNO :332)
L1-22 (N)	0.09	MGAQ- YKFNPMDLEQTLYEFLFQHA LEGGGGG-Fc (SEQIDNO :333)
L1-14 (N)	0.11	MGAQ- SNFMPLDELEQTLYEQFMLQHQ LEGGGGG-Fc (SEQIDNO :334)
L1-16 (N)	0.11	MGAQ- QKFQPLDELEETLYKQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQIDNO :335)
L1-18 (N)	0.16	MGAQ-QKFMPLDELDEILYEQFMFQQS LEGGGGG-Fc (SEQIDNO :336)
L1-3 (N)	0.16	MGAQ- TKFNPLDELEQTLYEQWTLQHQ LEGGGGG-Fc (SEQIDNO :337)
L1-21 (N)	0.17	MGAQ- HTFQPLDELEETLYYQWLYDQL LEGGGGG-Fc (SEQIDNO :338)

Con4 衍生的 亲和性 - 成熟 Pbs	hAng-2 :Tie2 IC ₅₀ (nM)	肽抗体序列 (SeqIdNo :)
L1-C1 (N)	0. 56	MGAQ- QKFKPLDELEQTLYEQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQIDNO :339)
L1-19 (N)	1. 26	MGAQ- QTFQPLDDLEEYLYEQWIRRYH LEGGGGG-Fc (SEQIDNO :340)
L1-9 (N)	1. 62	MGAQ- SKFKPLDELEQTLYEQWTLQHA LEGGGGG-Fc (SEQIDNO :341)
Con1 衍生的 亲和性 - 成熟 Pbs	hAng-2 :Tie2 IC ₅₀ (nM)	肽抗体序列 (SeqIdNo :)
Con1-4 (C)	1. 68	M-Fc-GGGGGAQ- SGQLRPCEEIFGCGTQNLAL-LE (SEQIDNO :342)
Con1-1 (C)	3. 08	M-Fc-GGGGGAQ- AGGMRPYDGMLGWPNYDVQA-LE (SEQIDNO :343)
Con1-6 (C)	8. 60	M-Fc-GGGGGAQ- GQDLRPCEDMFGCGTKDWYG-LE (SEQIDNO :344)
Con1-3 (C)	16. 42	M-Fc-GGGGGAQ- APGQRPYDGMLGWPTYQRIV-LE (SEQIDNO :345)

Con4 衍生的 亲和性 - 成熟 Pbs	hAng-2 :Tie2 IC ₅₀ (nM)	肽抗体序列 (SeqIdNo :)
Con1-2 (C)	没有抑制	M-Fc-GGGGGAQ- QTWDDPCMHLGPVTWRRCI-LE (SEQIDNO :346)
Con1-5 (C)	没有抑制	M-Fc-GGGGGAQ- FGDKRPLECMFGGPIQLCPR-LE (SEQIDNO :347)
Parent :Con1 (C)	26.00	M-Fc-GGGGGAQ-KRPCEEIFGGCTYQ- LE (SEQIDNO :348)
12-9 衍生的 亲和性 - 成熟 Pbs	hAng-2 :Tie2 IC ₅₀ (nM)	肽抗体序列 (SeqIdNo :)
12-9-3 (C)	0.81	M-Fc-GGGGGAQ- LQEWCEGVDPFTFGCEKQR-LE (SEQIDNO :349)
12-9-7 (C)	0.93	M-Fc-GGGGGAQ- MLDYCEGMDDPFTFGCDKQM-LE (SEQIDNO :350)
12-9-6 (C)	0.95	M-Fc-GGGGGAQ- HQEYCEGMEDPFTFGCEYQG-LE (SEQIDNO :351)
12-9-C2 (C)	1.41	M-Fc-GGGGGAQ- LQDYCEGVDPFTFGCENQR-LE (SEQIDNO :352)
12-9-5 (C)	1.56	M-Fc-GGGGGAQ- LLDYCEGVQDPFTFGCENLD-LE (SEQIDNO :353)

Con4 衍生的 亲和性 - 成熟 Pbs	hAng-2 :Tie2 IC ₅₀ (nM)	肽抗体序列 (SeqIdNo :)
12-9-1 (C)	1. 84	M-Fc-GGGGGAQ- GFEYCDGMEDPFTFGCDKQT-LE (SEQIDNO :354)
12-9-4 (C)	2. 05	M-Fc-GGGGGAQ- AQDYCEGMEDPFTFGCEMQK-LE (SEQIDNO :355)
12-9-C1 (C)	2. 68	M-Fc-GGGGGAQ- LQDYCEGVEDPFTFGCEKQR-LE (SEQIDNO :356)
12-9-2 (C)	8. 42	M-Fc-GGGGGAQ- KLEYCDGMEDPFTQGCDNQS-LE (SEQIDNO :357)
Parent :12-9 (C)	15. 00	M-Fc-GGGGGAQ- FDYCEGVEDPFTFGCDNH-LE (SEQIDNO :358)

[1152] 实施例 9

[1153] 在 BIAcore 上对六个抗 -Ang 肽抗体测定它们对 huAng (R&D Systems, BNO12103A) 的结合活性。根据标准胺 - 偶联方法 (BIAcore Inc.) 将蛋白质 G 固定到 CM5 芯片上, 然后在蛋白质 G 表面上注射肽抗体用于捕获 (RL 大约 100Ru)。为了分析 hAng2 和捕获的肽抗体之间的结合, 在捕获的肽抗体表面上注射 0. 3nM-40nM 的 huAng2, 并且使用 BIAevaluation 3. 0 (BIAcore Inc.) 分析结合 sensorgrams。表 8 总结了该项实验的结果。

[1154] 表 8

[1155]

肽抗体	批号	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

肽抗体	批号	KD (M)	ka (1/MS)	kd (1/s)
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

[1156] 实施例 10

[1157] 中和作用 ELISA

[1158] 如下用 DMEM/50 微克 / 毫升 BSA 稀释人, 鼠, cyno, 和大鼠 Ang-2 和在培养基中条件培养的人和鼠 Ang-1 : hAng-2-1 : 64 稀释 ; mAng-2-1 : 64 稀释 ; 大鼠 Ang-2- 没有稀释 ; cyno Ang-2-1 : 32 稀释 ; hAng-1-1 : 4 稀释 ; 和 mAng-1-1 : 4 稀释。

[1159] 通过 50% 最大可实现结合 (即, 平台) 下它们结合 1nM hTie2-Fc (以 Tie-2-Fc 分子提供, 其中 Tie-2 部分只含有分子的可溶性胞外部分 ; R&D Systems, 目录号 313-TI) 的能力测定稀释这些条件培养基的程度。用稀释的条件培养基 100 微升包被微量滴定板。对于 Ang-2 中和作用 ELISAs, 在含有大约 1% BSA 和大约 1nM Tie-2 (以 Tie-2-Fc 分子提供, 其中 Tie-2 部分只含有分子的可溶性胞外部分 ; R&D Systems, 目录号 313-TI) 的 PBS 溶液中 4- 倍稀释中从 62.5nM 至 0.015pM 滴定候选抗 -Ang-2 肽抗体。对于 Ang-1 中和作用 ELISAs, 在含有大约 1% BSA 和大约 1nM Tie-2 (以 Tie-2-Fc 分子提供, 其中 Tie-2 部分只含有分子的可溶性胞外部分 ; R&D Systems, 目录号 313-TI) 的 PBS 溶液中 4- 倍稀释中从 1000nM 至 0.2pM 滴定候选抗 -Ang-2 肽抗体。

[1160] 向各个孔加入大约 100 微升肽抗体 / Tie-2 溶液之后, 培养板在室温下温育过夜, 然后用含有大约 0.1% Tween-20 的 PBS 洗涤五次。洗涤之后, 对每孔加入大约 100 微升的抗 -Tie-2 抗体 (Pharmingen Inc., catalog#557039) 达到每毫升大约 1 微克的终浓度, 培养板在室温下温育大约 1 小时。接着, 以在含有大约 1% BSA 的 PBS 中 1 : 10,000 的稀释度每孔加入大约 100 微升山羊抗 - 小鼠 -IgG-HRP (Pierce Chemical Co., catalog#31432)。

[1161] 培养板在室温下温育大约 1 小时, 用含有大约 0.1% Tween-20 的 PBS 冲洗五次。然后每孔加入大约 100 微升的 TMB 底物 (SIGMA, catalog#T8665) 使显示蓝色。然后在分光光度计上在 370nm 读取吸光度。

[1162] 表 9

[1163] 血管生成素 : Tie2 相互作用的肽抗体介导的中和作用

[1164]

	hAng-2	mAng-2	rAng-2	cAng-2	hAng-1	mAng-1
肽抗体	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

	hAng-2	mAng-2	rAng-2	cAng-2	hAng-1	mAng-1
Con4 (C)	0.197	0.289	0.236	0.540	200	300
Co4-44 (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	-----

[1165] 实施例 11

[1166] PK 研究

[1167] 研究设计

[1168] 将雄性 CD-1 小鼠, 体重 20-30g, 随机分为各个肽抗体处理组 (2xCon4-C, L1-7-N, 和 L1-21-N)。动物接受单一 IV 大丸剂 (n = 38/ 组) 或者一次 SC 施用 50 微克肽抗体 (n = 34/ 组)。分别尾静脉肩皮肤 IV 和 SC 给药进行注射。

[1169] 血液取样和分析方法

[1170] 对于 SC 和 IV 组, 给药之前和给药之后第 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 216, 264, 312, 和 336 小时对于每一次抗 -Ang 肽抗体浓度测定取血样。对于 IV 组给药之后 5 和 30 分钟采集另外的样品。每个时间点对两个动物取血, 并且在取样之后杀死动物。用心脏穿刺术将血液 (大约 0.50mL) 采取到聚丙烯 **microtainer®** 血清分离管中。样品在冰上保持大约 20 分钟直到发生凝结。通过在 2-8°C 下离心大约 10 分钟从血样分离血清, 并且在测试之前在大约 -70°C 下保存。利用校验的时间分辨荧光测定法 (TRF) 使用 100ng/mL 较低限度的量化测定样品。用重组小鼠 Ang-2 蛋白质包被 NUNCfluoroMaxisorp 微量滴定板。然后用蛋白质封闭培养板以减少非特异性结合。在 10% 小鼠血清测定缓冲液中制备标准物, 性质对照物和未知样品并且吸移到微量滴定板的孔中。肽抗体与固定的 Ang-2 特异性结合。将所有的没有结合的物质 (Kirkegaard&Perry Laboratories Inc.) 洗涤之后, 对孔加入生物素化山羊抗 - 人 IgG (H+L) 单克隆抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.)。去除所有的没有结合的生物素化单克隆抗体的洗涤步骤之后, 对孔加入钕标记的链霉抗生物素蛋白。将没有结合的链霉抗生物素蛋白钕洗掉之后, 结合的钕从链霉抗生物素蛋白释放, 酸性溶液吸移到各个孔中。产生荧光信号并且在 Wallac' s 荧光读数仪上读数。小鼠血清抗 -Ang-2 肽抗体的分析的测试范围是 0.078-5 微克 / 毫升。

[1171] 药物动力学分析

[1172] 利用 WinNonlin Professional (Version 3.3, Pharsight Corp., Mountain View, Calif.) 对每一组的成分平均浓度 - 时间数据进行非房室分析。对于 PK 分析使用标称取样时间, 在标称时间的 10% 内收集样品。在 PK 分析之前将小于 LLOQ 的所有的浓度值设置为

0。估计下面的 PK 参数：

[1173] 根据 $t_{1/2} = \ln(2)/k_{el}$ 计算极限半寿期 ($t_{1/2}$)，其中 k_{el} 是通过极限对数 - 线性衰退期的线性回归估算的一级极限速度常数。

[1174] 血清浓度 - 时间曲线下的面积 ($AUC_{(0-\text{最后})}$) 用时间是 0- 最后的线性 / 对数梯形方法估算，所述时间是最后可以计量的浓度 (C_{last})。

[1175] 根据相应的 $AUC_{(0-\text{最后})}$ 和预计的 C_{last}/k_{el} 值之和估算 0 至无穷大时间 ($AUC_{(0-\infty)}$) 曲线下的面积：

[1176]

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

[1177] 如下计算 SC 给药之后的绝对生物可利用率 (F)：

$$[1178] \quad F = \frac{AUC_{(0-\infty)SC}}{AUC_{(0-\infty)IV}} \times 100$$

[1179] 图 2 中给出结果。

[1180] 实施例 12

[1181] 在研究的第 0 天用 1×10^7 A431 细胞对雌性裸鼠皮下注射。第三天，以 200 微克 / 小鼠 / 天的剂量皮下施用 Ang-2 肽抗体 2xCon4-C。如图中所示以有规律的时间间隔记录肿瘤体积和体重。在旋转摇动器中观察 Ang-2 肽抗体 - 处理组对赋形剂对照和对照肽抗体之间的显著差异 2 小时。(p < 0.0001 对每个对照组，使用重复测定 ANOVA，用 Scheffe' spost hoc 检验)。用这种肽抗体处理对体重没有显著影响。图 3 给出结果。

[1182] 实施例 13

[1183] A431 体外生长曲线

[1184] 以每孔 2000 个细胞对 96 孔组织培养板接种 A431 细胞，用补充有 10% 胎牛血清 (FBS) 的 200 微升 DMEM。接种之后 16 小时吸出培养基。然后加回到孔中并且重复三份：每孔 100 微升 DMEM, 10% FBS, 1 毫克 / 毫升阴性对照肽抗体 4883 或肽抗体 TN8-Con4。在 5 个板上重复设置。处理之后 24, 48, 72, 96, 和 120 小时从一个培养板吸出培养基。然后对每孔加入 100 微升的 10% 三氯乙酸 (TCA)，然后在 4℃ 存贮培养板。当最后的培养板在 10% TCA 中最少放置 4 小时之后收集所有的板。去除 10% TCA，孔用自来水洗涤 5 次。然后在室温下用 100 微升 0.4% sulforhodamine B (Sigma S-9012) 的 1% 乙酸溶液 (Sigma A-6283) 将细胞染色 10 分钟，然后用 1% 乙酸溶液洗涤 5 次。然后空气风干培养板。在旋转摇动器上用 300 微升 20mM 没有缓冲的 Tris (pH > 10) 溶解染料。然后在微量滴定板读数仪上在 540nm 读取光密度 (OD)。图 4 给出结果。

[1185] 实施例 14

[1186] 在研究的第 0 天用 2×10^6 Colo-205 细胞加 Matrigel (2 : 1) 对雌性裸鼠皮下注射。第三天，以 14 微克 / 小鼠的剂量皮下施用 Ang-2 肽抗体 L1-7-N, L1-21-N, Con4-C, 和 2xCon4-C，一周两次。一周三次施用抗 -Ang-2 抗体 Ab536, 47 微克 / 小鼠，作为阳性对照。以有规律的时间间隔记录肿瘤体积和体重。

[1187] 观察每一个 Ang-2 肽抗体 - 处理组对赋形剂对照和对照肽抗体之间的显著差异 (p < 0.0001 对每个对照组，使用重复测定 ANOVA，用 Scheffe' s post hoc 检验)。用这些肽抗体处理对体重没有显著影响 (没有给出结果)。图 5 给出结果。

[1188] 实施例 15

[1189] 在研究的第 0 天用 2×10^6 Colo-205 细胞加 Matrigel (2 : 1) 对雌性裸鼠皮下注射。第三天, 以 14, 2.8, 和 0.56 微克 / 小鼠的剂量皮下施用 Ang-2 肽抗体 2xCon4-C, 一周两次。以有规律的时间间隔记录肿瘤体积和体重。观察两个较高剂量的 Ang-2 肽抗体 - 处理组对赋形剂对照和对照肽抗体之间的显著差异 (中间给药之后 $p = 0.003$, 对于高剂量, $p < 0.0001$, 使用重复测定 ANOVA, 用 Scheffe's post hoc 检验)。用这些肽抗体处理对体重没有显著影响。划线代表小组总 n 的减少, 从 10 减小至 9 只小鼠, 由于一只小鼠不明原因死亡。图 6 给出结果。

[1190] 实施例 16

[1191] 抗-Ang-2 肽抗体对 Colo-205 异种移植肿瘤

[1192] 在研究的第 0 天用 2×10^6 Colo-205 细胞加 Matrigel (2 : 1) 对雌性裸鼠皮下注射。第三天, 以 350 微克 / 天的剂量皮下施用 Ang-2 肽抗体 2xCon4-C 或对照肽抗体。在第 14 天 (大小匹配对照) 或第 18 天 (时间匹配对照) 收集用对照肽抗体 (如表 5 所述) 治疗的组的肿瘤。然后在第 18 天收集来自 2xCon4(C) 治疗组的肿瘤。以有规律的时间间隔记录肿瘤体积, 如所给出的。观察时间匹配对照组和 2xCon4-C 处理组之间肿瘤生长的显著差异 ($p = 0.0154$, 使用重复测定 ANOVA, 用 Scheffe's post hoc 检验)。用这些肽抗体处理对体重没有显著影响。

[1193] 将为了成像分析而制备的肿瘤冠状对切, 并且把一半迅速在 OCT (Sakura Finetek USA Inc., Torrance, Calif.) 中冷冻。使用 DAB 作为发色体, 2 微克 / 毫升, 用抗 - 小鼠 CD31 (目录 #553370, BD PharMingen, San Diego, Calif.) 将冷冻切片免疫组织化学染色。以 20 倍实物放大率对肿瘤切片数字成像。对于每个肿瘤捕获四个 "覆盖 - 点" 区, 每个处理组用 10 个肿瘤。利用 MetaMorph (Universal Imaging Corporation, Downingtown, Pa.) 图像分析系统限定图像中 CD31 染色血管的阈。CD31 阳性染色面积表示为各个区内总的肿瘤组织比例。图 7 给出结果。

[1194] 实施例 17

[1195] 在研究的第 0 天用 2×10^6 Colo-205 细胞加 Matrigel (2 : 1) 对雌性裸鼠皮下注射。从研究的第 3, 10 或 15 天开始, 一周两次用 350 微克 / 小鼠的 Ang-2 肽抗体 2xCon4-C, 或等价对照肽抗体皮下给药。以有规律的时间间隔记录肿瘤体积和体重。对 A431 和 Colo-205 异种移植模型观察所有 Ang-2 肽抗体 - 处理组对赋形剂对照之间的肿瘤生长显著差异 (对于第 15 天组, $p = 0.089$ 并且 $p =$ 给药 10 周)。这里使用的 CR 指处理之后没有可测得的肿瘤的结果。图 9 给出结果。

[1196] 实施例 19

[1197] a) Colo-205 肿瘤模型中 Pb 与脱乙酰紫杉醇的联合

[1198] 在研究的第 0 天用 2×10^6 Colo-205 细胞加 Matrigel (2 : 1) 对雌性裸鼠皮下注射。研究的第 14 天, 用 a) 350 微克 / 小鼠, 每周两次皮下, Ang-2 肽抗体 2xCon4-C, b) 20mg/kg qwx3 i. p. _ 脱乙酰紫杉醇, 或 c) 两者的联合, 开始治疗。以有规律的时间间隔记录肿瘤体积和体重。观察所有处理组对赋形剂对照之间肿瘤生长的显著差异 ($p < 0.0001$, 使用重复测定 ANOVA, 用 Scheffe's post hoc 检验)。另外, 和单一治疗药物任一种相比, 联合治疗组显著不同 ($p < 0.0001$ 对 2xCon-4-C 和 $p = 0.0122$ 对脱乙酰紫杉醇)。划线代表小组

总 n 的减少,从 10 减小至 9 只小鼠,由于一只小鼠不明原因死亡。用这些肽抗体治疗对体重没有显著影响。图 10a 给出结果。

[1199] b) Colo-205 肿瘤模型中 Pb 与 5-FU 的联合

[1200] 在研究的第 0 天用 2×10^6 Colo-205 细胞 Matrigel (2 : 1) 对雌性裸鼠皮下注射。研究的第 14 天,用 a) 350 微克 / 小鼠,每周两次皮下, Ang-2 肽抗体 2xCon4-C, b) 50mg/kg qwx5 i. p. 5-FU, 或 c) 两者的联合,开始治疗。以有规律的时间间隔记录肿瘤体积和体重。

[1201] 观察所有处理组对赋形剂对照之间肿瘤生长的显著差异 ($p < 0.0001$, 使用重复测定 ANOVA, 用 Scheffe' s post hoc 检验)。另外,和单一治疗药物任一种相比,联合治疗组显著不同 ($p = 0.0375$ 对 2xCon-4-C 和 $p = 0.0453$ 对 5-FU)。5-FU 治疗组 (18%, 在研究的第 20 天) 以及联合治疗组 (16%, 在研究的第 20 天) 发现体重暂时减轻,随后完全恢复体重。图 10b 给出结果。

[1202] 实施例 20

[1203] 辅助关节炎模型

[1204] 在环境控制房间 (温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 相对湿度 $50 \pm 20\%$), 12- 小时光照 / 黑暗周期, 在每只滤网盖子笼子中关养雄性 Lewis 大鼠 (120-130g, Charles River, Wilmington Mass.)。对动物喂以商售啮齿动物饲料 (Formulation 8640 ; Tek Lab, Madison, Wis.) 并且自由饮用过滤器纯化的自来水。食物该和磷含量分别是 1.2% 和 1.0%。

[1205] 通过在尾根真皮内一次注射悬浮于 0.05mL 石蜡油 (Crescent Chemical Co., Hauppauge, N. Y.) 中的 0.5mg 热杀死结核分枝杆菌 H37Ra (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) 诱导辅助关节炎。关节炎的临床发生在第 9 天, 指征是后爪肿胀行走困难。除了在 2xCon4(c) 治疗组外 (其在免疫之后第一天治疗), 免疫之后第 9 天开始每天皮下注射 (关节炎发生之前) 并且持续 18 天。

[1206] 辅助关节炎的临床监测

[1207] 根据 Feige 等, Cellular Molec. Life Sci., 57 : 1457-1470 (2000) 描述的方法用水体积描记法通过测定后爪体积的间歇式测量, 临床评价炎症进程。应用根据下式的梯形规则以曲线 (AUC) 下的面积为基础计算爪炎症的抑制作用 :

[1208] $[1 - \{(\text{治疗的 AdA} - \text{正常}) / (\text{未治疗的 AdA} - \text{正常} 1)\}] * 100$

[1209] 另外, 在 9 天的治疗方案中每天测定总体重作为补充终点, 因为体重减轻表明该关节炎模型关节炎的进行平行。第 18 天用 CO_2 杀死动物。

[1210] 对尸体检查骨矿物质密度 (BMD) 的减少 (免疫后第 18 天)。在毛皮线处去除后爪 (仅接近踝关节 (后踝)), 浸在 70% 乙醇中, 然后使用通风机 X- 射线柱光密度计 (Model QDR-4500A ; Hologic, Waltham, Mass.) 在水平方向上扫描。参见 Feige 等, 上文。扫描之后, 将跟骨处居中的矩形盒 (29x25mm) 位于描绘出的位置用于分析, 用专业算法 (Hologic 软件) 计算骨面积, 骨矿物质含量, 和骨矿物质密度。

[1211] 所有的结果表示为平均值 $\pm$ 标准误差。使用 p 值是 0.05 描述各组之间的统计学差异。对临床数据进行 Kruskal-Wallis ANOVA 和 Mann-Whitney U. 检验, 使用商售统计学软件 (Statsoft v3.0 ; Statsoft, Tulsa, Okla.)。

[1212] 图 11a, 11b, 和 11c 中分别给出结果。

[1213] 实施例 21

[1214] 角膜血管发生模型

[1215] CON4(C) 对大鼠 VEGF- 诱导的血管发生的作用

[1216] 对大鼠血管发生角膜模型评价 Ang-2 肽抗体 CON4(C)。通过将 VEGF-(或 BSA 对照物) 浸透的尼龙片埋植到角膜基质中 (n = 8/ 组) 诱导血管发生。以 1.0 或 0.1 毫克 / 大鼠 / 天皮下注射施用肽抗体 TN8CON4-C7 天。用相同剂量的阴性对照肽抗体 4883 处理另外两组动物。用 3.0 或 0.3 毫克的单一载量预先处理所有的组, 这个量是 1.0 或 0.1mg 维护剂量的三倍 (参见附图)。处理 7 天之后, 从大鼠角膜各个数字成像确定两个血管端点 : 片和边缘之间的中点相交的血管数目, 和血管面积。TN8CON4-C 处理以剂量依赖方式显著抑制 VEGF- 诱导的血管发生 (p < 0.04), 而用对照肽抗体处理对两个端点的任一个没有显著作用。根据受治疗动物的体重, 没有明显毒性的证据。图 12 给出了结果。

[1217] 实施例 22

[1218] 表位定位

[1219] 将全长 (氨基酸 1-495), N- 末端 (氨基酸 1-254) 和 C- 末端 (氨基酸 255-495) 人 Ang-2 (hAng-2) 蛋白质克隆到带有 C- 末端 6xHis 标记的 CMV- 驱动哺乳动物表达载体中。将三个得到的构建体加载体对照物瞬时表达达到 293T 细胞中。然后从感染的细胞收集条件培养基, 并且通过 6xHis ELISA 和蛋白质印迹估计培养基中 Ang-2 的表达水平。

[1220] 根据下面的方案通过 ELISA, 通过它们结合人 hAng-2 的三种版本的能力, 测定抗 -Ang-2 抗体和肽抗体的结合表位 : 每孔用 100 微升条件培养基包被高结合 96- 孔测定板, 并且在 37°C 下温育 1 小时。吸出条件培养基, 室温下每孔用 200 微升 5% BSA 的 PBS 溶液封闭平板 1 小时。然后吸出封闭溶液。以 1 微克 / 毫升 1% BSA 的 PBS 溶液每孔加入 100 微升抗体, 肽抗体, 或 Tie2-Fc, 并且室温下温育 1 小时。用 200 微升 0.1% Tween 的 PBS 溶液将孔洗涤四次。每孔加入 100 微升 HRP- 偶联的山羊抗 - 人 IgG 或山羊抗 - 小鼠 IgG, 并且室温下温育 45 分钟。然后用 200 微升 0.1% Tween 的 PBS 溶液将孔洗涤四次。然后每孔加入 100 微升 TMB 底物。在 370nm 下读取 O.D.。

[1221] 图 13a, 图 13b, 和图 13c 给出结果。

[1222] 实施例 23

[1223] 由于 BiaCore 测定中固有的一些灵敏性限制, 利用 SepidyneKinExA 分析也评估结合亲和力。

[1224] 在 KinExA (Sapidyne, Boise, Ind.) 上试验 2xCON4-C (Pb5714) 与 huAng-2 的结合。Reacti-Gel 6x 珠 (Pierce, Rockford, Ill.) 预先用 huAng-2 包被并且用 BSA 封闭。10pM 和 30pM 的 2xCON4-C 样品与各种浓度的 (0.3pM-3nM) 的 huAng-2 在室温下温育 8 小时, 然后通过 huAng-2- 包被珠。通过荧光 (Cy5) 标记的山羊抗 - 人 -Fc 抗体 (Jackson Immuno Research, West Grove, Pa.) 定量测定小珠 - 结合的肽抗体的量。结合信号和平衡中自由肽抗体的浓度成比例。

[1225] 使用双曲线一点均匀结合模型 (KinEx™ 软件) 从竞争曲线的非线性回归获得离解平衡常数 (KD)。然后对于与 huAng-2 结合的 2xCON4-C 测定 KD 大约是 2pM。

[1226] 如图 14 所示, 使用 KinExA 分析, 证明肽抗体 2xCon4 对于 hAng-2 具有 2pM。

[1227] 实施例 24

[1228] PEG 化肽

[1229] 利用残基 14(met) 与 N- 末端残基 1(Cys), 从 N- 末端至 C- 末端编号, 的标准偶联方法和双偶联, 用 431ABI 合成仪合成 L1-7 肽。

[1230] L1-7 肽与甲氧基-聚(乙二醇)-马来酰亚胺的偶联; MW: 5KDa; 称作 " mPEG5K-(L1-7 肽) "

[1231] 用 13.5mg 甲氧基-聚(乙二醇)-马来酰亚胺 (MW = 5KDa ; Shearwater Corp.) ; 0.27ml 的 50.0mg/mL 缓冲液 1 的溶液, 处理 400 微升缓冲液 1 (20mM 磷酸盐, 5mM EDTA, pH 6.5) 中 0.8mg 的 L1-7 肽的溶液。反应混合物在 4℃ 下温育过夜, 然后用 1.6mL 的缓冲液 A (20mM Tris HCl, pH 7.2) 稀释, 并且在 Slide-A-Lyzer 盒 (3500MWC0, Pierce) 中用相同的缓冲液透析。在 1.0mL HiTrap Q Sepharose HP 柱 (Amersham Biosciences Corp.) 上通过离子交换色谱法纯化透析的反应混合物。通过 40 柱体积从 100% 缓冲液 A 至 100% 缓冲液 B (缓冲液 A+0.5M NaCl) 梯度在两个 1.0mL 级分中洗脱出产物峰。使用 Microsep 1K Centrifugal Device (Pall Life Sciences) 将合并的产物级分浓缩至 250 微升, 含有 0.23mg 蛋白质 / 毫升。

[1232] L1-7 肽与 1,11-双-马来酰亚胺四亚乙基二醇的偶联; 称作 " PE04(L1-7 肽)₂ "

[1233] 用 0.0375 毫克的 1,11-双-马来酰亚胺四亚乙基二醇 (Pierce) (0.375mL 的缓冲液 1 中 0.1mg/mL 溶液) 处理 500 微升缓冲液 1 中 1.0mg 的 L1-7 肽溶液 (20mM 磷酸盐, 5mM EDTA, pH 6.5)。反应混合物在 4℃ 下温育 3.33 小时, 然后用 Slide-A-Lyzer 盒 (3500MWC0, Pierce) 中用缓冲液 A (20mM Tris HCl, pH 7.2) 透析。在 1.0mL HiTrap Q Sepharose HP 柱 (Amersham Biosciences Corp.) 上通过离子交换色谱法纯化透析的反应混合物。通过 40 柱体积从 100% 缓冲液 A 至 100% 缓冲液 B (缓冲液 A+0.5M NaCl) 梯度在三个 1.0mL 级分中洗脱出二聚体产物峰。使用 Microsep 1K Centrifugal Device (Pall Life Sciences) 将合并的产物级分浓缩至 550 微升, 含有 0.12mg 蛋白质 / 毫升。

[1234] L1-7 肽与聚(乙二醇)-双-马来酰亚胺的偶联; MW 3.4KDa; 称作 " PEG3.4K(L1-7 肽)₂ "

[1235] 用 1.125 毫克的聚(乙二醇)-双-马来酰亚胺 (MW = 3.4KDa, Shearwater Corp.) ; 0.563mL 的缓冲液 1 中 2.0mg/mL 溶液处理 1.5 毫升缓冲液 1 中 3.0mg 的 L1-7 肽溶液 (20mM 磷酸盐, 5mM EDTA, pH 6.5)。反应混合物在 4℃ 下温育过夜, 然后用 Slide-A-Lyzer 盒 (3500 MWC0, Pierce) 中用缓冲液 A (20mM Tris HCl, pH 7.2) 透析。在 5.0mL HiTrap Q Sepharose HP 柱 (Amersham Biosciences Corp.) 上通过离子交换色谱法纯化透析的反应混合物。通过 40 柱体积从 100% 缓冲液 A 至 100% 缓冲液 B (缓冲液 A+0.5M NaCl) 梯度在三个 3.0mL 级分中洗脱出产物峰。使用两个 Microsep 1K Centrifugal Device (Pall Life Sciences) 将合并的产物级分浓缩至 850 微升, 含有 0.24mg 蛋白质 / 毫升。

[1236] MALDI-TOF 质谱结果如下:

[1237]

样品 #	身份	实验 MS	Obs. MS
1	L1-7 (没有 PEG 化的肽)	3,545	3,538.7

样品 #	身份	实验 MS	Obs. MS
2	mPEG5K-(L1-7 肽)	8,500	8,851
3	PEO4(L1-7 肽) ₂	7,443	7,446.29
4	PEG3.4K(L1-7 肽) ₂	10,550	10,552 6,882.61 3,550.13

[1238] 明白对于 PEG 3.4K(L1-7 肽) 和 PEO4(L1-7 肽) 的角注“₂”指每个聚合物链有两个肽,各位于聚合物的各端。

[1239] IC₅₀ 测定

[1240] 如实施例 2 所述,通过中和作用 ELISA 测定自由 L1-7 和 PEG 化肽的 hAng : hTie2-Fc 相互作用的抑制作用的 IC₅₀。对于中和作用 ELISA,如实施例 2 所述制备结合了人 Ang-2 多肽的微量滴定板用于亲和力 ELISA。在含有大约 1% BSA 和大约 1nM Tie-2(以 Tie-2-Fc 分子提供,其中 Tie-2 部分只含有该分子的可溶性胞外部分;R&D Systems,目录号 313-TI) 的 PBS 溶液中以 4 倍稀释度从 1000nM 至 0.2pM 滴定候选抗 -Ang-2L1-7PEG 化和自由肽。向各孔加入大约 100 微升的抗体 /Tie-2 溶液之后,培养板在室温下温育过夜,然后用含有大约 0.1% Tween-20 的 PBS 清洗五次。冲洗之后,每孔加入大约 100 微升的抗 -Tie-2 抗体 (Pharminogen Inc.,catalog#557039),最终浓度达到大约 1 微克 / 毫升,培养板在室温下温育大约 1 小时。接着,以含有大约 1% BSA 的 PBS 中以 1 : 10,000 的稀释度每孔加入大约 100 微升山羊抗 -小鼠 -IgG-HRP (Pierce Chemical CO.,catalog#31432)。培养板在室温下温育大约 1 小时,然后用含有大约 0.1% Tween-20 的 PBS 清洗五次。然后每孔加入大约 100 微升的 TMB 底物(如上所述),使得显色。然后在分光光度计上在大约 370nm 读取吸光度。

[1241] L1-7 肽 (C-GGGGG-AQ-TNFMDDLEQRLYEQFILQQG-LE) (SEQ ID NO :359) 包括 :用于偶联 PEG 的 N- 末端半胱氨酸 ;和一个 5Gly 连接体。原始噬菌体克隆和肽抗体中都存在 AQ 和 LE 侧翼序列。下面给出 hAng-2 :Tie2 抑制作用 IC₅₀ 结果 :

[1242]

肽	IC ₅₀ (nM)
L1-7 肽	0.49
mPEG5K-(L1-7 肽)	11.7
PEO4(L1-7 肽) ₂	20.064
PEG3.4K(L1-7 肽) ₂	0.058

- [1243] 序列表
- [1244] <110>AMGEN INC.
- [1245] <120> 人血管生成素 -2 的特异结合剂
- [1246] <130>A-801B
- [1247] <140>NOT YET ASSIGNED
- [1248] <141>2002-10-11
- [1249] <150>US 60/414, 155
- [1250] <151>2002-09-27
- [1251] <150>US 60/328, 624
- [1252] <151>2001-10-11
- [1253] <160>359
- [1254] <170>PatentIn version 3.2
- [1255] <210>1
- [1256] <211>14
- [1257] <212>PRT
- [1258] <213> 人工序列
- [1259] <220>
- [1260] <223>Ang-2 结合肽
- [1261] <400>1
- [1262] Lys Arg Pro Cys Glu Glu Met Trp Gly Gly Cys Asn Tyr Asp
- [1263] 1 5 10
- [1264] <210>2
- [1265] <211>14
- [1266] <212>PRT
- [1267] <213> 人工序列
- [1268] <220>
- [1269] <223>Ang-2 结合肽
- [1270] <400>2
- [1271] His Gln Ile Cys Lys Trp Asp Pro Trp Thr Cys Lys His Trp
- [1272] 1 5 10
- [1273] <210>3
- [1274] <211>14
- [1275] <212>PRT
- [1276] <213> 人工序列
- [1277] <220>
- [1278] <223>Ang-2 结合多肽
- [1279] <400>3
- [1280] Lys Arg Pro Cys Glu Glu Ile Phe Gly Gly Cys Thr Tyr Gln
- [1281] 1 5 10

- [1282] <210>4
- [1283] <211>14
- [1284] <212>PRT
- [1285] <213> 人工序列
- [1286] <220>
- [1287] <223>Ang-2 结合多肽
- [1288] <400>4
- [1289] Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met
- [1290] 1 5 10
- [1291] <210>5
- [1292] <211>18
- [1293] <212>PRT
- [1294] <213> 人工序列
- [1295] <220>
- [1296] <223>Ang-2 结合多肽
- [1297] <400>5
- [1298] Phe Asp Tyr Cys Glu Gly Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Asp
- [1299] 1 5 10 15
- [1300] Asn His
- [1301] <210>6
- [1302] <211>20
- [1303] <212>PRT
- [1304] <213> 人工序列
- [1305] <220>
- [1306] <223>Ang-2 结合多肽
- [1307] <400>6
- [1308] Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe
- [1309] 1 5 10 15
- [1310] Thr Phe Gln Gln
- [1311] 20
- [1312] <210>7
- [1313] <211>14
- [1314] <212>PRT
- [1315] <213> 人工序列
- [1316] <220>
- [1317] <223>Ang-2 结合肽
- [1318] <400>7
- [1319] Gln Tyr Gly Cys Asp Gly Phe Leu Tyr Gly Cys Met Ile Asn
- [1320] 1 5 10

[1321]	<210>8	
[1322]	<211>67	
[1323]	<212>DNA	
[1324]	<213> 人工序列	
[1325]	<220>	
[1326]	<223> 寡核苷酸	
[1327]	<400>8	
[1328]	acaaacaaac atatgggtgc acagaaagcg gccgcaaaaa aactcgaggg tggaggcggt	60
[1329]	ggggaca	67
[1330]	<210>9	
[1331]	<211>20	
[1332]	<212>DNA	
[1333]	<213> 人工序列	
[1334]	<220>	
[1335]	<223> 寡核苷酸	
[1336]	<400>9	
[1337]	ggtcattact ggaccggatc	20
[1338]	<210>10	
[1339]	<211>25	
[1340]	<212>DNA	
[1341]	<213> 人工序列	
[1342]	<220>	
[1343]	<223> 寡核苷酸	
[1344]	<400>10	
[1345]	cgtacaggtt tacgcaagaa aatgg	25
[1346]	<210>11	
[1347]	<211>66	
[1348]	<212>DNA	
[1349]	<213> 人工序列	
[1350]	<220>	
[1351]	<223> 寡核苷酸	
[1352]	<400>11	
[1353]	tttgttggat ccattactcg agtttttttg cggccgcttt ctgtgcacca ccacctccac	60
[1354]	ctttac	66
[1355]	<210>12	
[1356]	<211>32	
[1357]	<212>PRT	
[1358]	<213> 人工序列	
[1359]	<220>	

- [1360] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
- [1361] <220>
- [1362] <221>misc_feature
- [1363] <222>(32)..(32)
- [1364] <223>Xaa = Fc
- [1365] <400>12
- [1366] Met Gly Ala Gln Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu
- [1367] 1 5 10 15
- [1368] Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
- [1369] 20 25 30
- [1370] <210>13
- [1371] <211>29
- [1372] <212>PRT
- [1373] <213> 人工序列
- [1374] <220>
- [1375] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
- [1376] <220>
- [1377] <221>misc_feature
- [1378] <222>(29)..(29)
- [1379] <223>Xaa = Fc
- [1380] <400>13
- [1381] Met Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln
- [1382] 1 5 10 15
- [1383] Phe Thr Phe Gln Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
- [1384] 20 25
- [1385] <210>14
- [1386] <211>51
- [1387] <212>PRT
- [1388] <213> 人工序列
- [1389] <220>
- [1390] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
- [1391] <220>
- [1392] <221>misc_feature
- [1393] <222>(51)..(51)
- [1394] <223>Xaa = Fc
- [1395] <400>14
- [1396] Met Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln
- [1397] 1 5 10 15
- [1398] Phe Thr Phe Gln Gln Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser

[1399]	20	25	30
[1400]	Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Leu Glu Gly Gly Gly		
[1401]	35	40	45
[1402]	Gly Gly Xaa		
[1403]	50		
[1404]	<210>15		
[1405]	<211>60		
[1406]	<212>PRT		
[1407]	<213> 人工序列		
[1408]	<220>		
[1409]	<223> 能结合 Ang-2 的肽抗体		
[1410]	<220>		
[1411]	<221>misc_feature		
[1412]	<222>(60).. (60)		
[1413]	<223>Xaa = Fc		
[1414]	<400>15		
[1415]	Met Gly Ala Gln Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu		
[1416]	1 5 10 15		
[1417]	Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly		
[1418]	20 25 30		
[1419]	Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe		
[1420]	35 40 45		
[1421]	Thr Phe Gln Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa		
[1422]	50 55 60		
[1423]	<210>16		
[1424]	<211>56		
[1425]	<212>PRT		
[1426]	<213> 人工序列		
[1427]	<220>		
[1428]	<223> 能结合 Ang-2 的肽抗体		
[1429]	<220>		
[1430]	<221>misc_feature		
[1431]	<222>(56).. (56)		
[1432]	<223>Xaa = Fc		
[1433]	<400>16		
[1434]	Met Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln		
[1435]	1 5 10 15		
[1436]	Phe Thr Phe Gln Gln Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Lys Phe Asn Pro		
[1437]	20 25 30		

- [1438] Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln
 [1439] 35 40 45
 [1440] Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
 [1441] 50 55
 [1442] <210>17
 [1443] <211>26
 [1444] <212>PRT
 [1445] <213> 人工序列
 [1446] <220>
 [1447] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
 [1448] <220>
 [1449] <221>misc_feature
 [1450] <222>(26).. (26)
 [1451] <223>Xaa = Fc
 [1452] <400>17
 [1453] Met Gly Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu
 [1454] 1 5 10 15
 [1455] His Met Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
 [1456] 20 25
 [1457] <210>18
 [1458] <211>45
 [1459] <212>PRT
 [1460] <213> 人工序列
 [1461] <220>
 [1462] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
 [1463] <220>
 [1464] <221>misc_feature
 [1465] <222>(45).. (45)
 [1466] <223>Xaa = Fc
 [1467] <400>18
 [1468] Met Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly
 [1469] 1 5 10 15
 [1470] Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser
 [1471] 20 25 30
 [1472] Gly Ser Ala Thr His Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
 [1473] 35 40 45
 [1474] <210>19
 [1475] <211>62
 [1476] <212>PRT

- [1477] <213> 人工序列
- [1478] <220>
- [1479] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
- [1480] <220>
- [1481] <221>misc_feature
- [1482] <222>(62)..(62)
- [1483] <223>Xaa = Fc
- [1484] <400>19
- [1485] Met Gly Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu
- [1486] 1 5 10 15
- [1487] His Met Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser
- [1488] 20 25 30
- [1489] Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro
- [1490] 35 40 45
- [1491] Trp Thr Cys Glu His Met Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
- [1492] 50 55 60
- [1493] <210>20
- [1494] <211>31
- [1495] <212>PRT
- [1496] <213> 人工序列
- [1497] <220>
- [1498] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
- [1499] <220>
- [1500] <221>misc_feature
- [1501] <222>(2)..(2)
- [1502] <223>Xaa = Fc
- [1503] <400>20
- [1504] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu
- [1505] 1 5 10 15
- [1506] Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Leu Glu
- [1507] 20 25 30
- [1508] <210>21
- [1509] <211>53
- [1510] <212>PRT
- [1511] <213> 人工序列
- [1512] <220>
- [1513] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
- [1514] <220>
- [1515] <221>misc_feature

- [1516] <222>(2).. (2)
- [1517] <223>Xaa = Fc
- [1518] <400>21
- [1519] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly
- [1520] 1 5 10 15
- [1521] Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Lys
- [1522] 20 25 30
- [1523] Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr
- [1524] 35 40 45
- [1525] Phe Gln Gln Leu Glu
- [1526] 50
- [1527] <210>22
- [1528] <211>59
- [1529] <212>PRT
- [1530] <213> 人工序列
- [1531] <220>
- [1532] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
- [1533] <220>
- [1534] <221>misc_feature
- [1535] <222>(2).. (2)
- [1536] <223>Xaa = Fc
- [1537] <400>22
- [1538] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu
- [1539] 1 5 10 15
- [1540] Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Gly Gly Gly
- [1541] 20 25 30
- [1542] Gly Gly Gly Gly Gly Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr
- [1543] 35 40 45
- [1544] Leu Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Leu Glu
- [1545] 50 55
- [1546] <210>23
- [1547] <211>25
- [1548] <212>PRT
- [1549] <213> 人工序列
- [1550] <220>
- [1551] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
- [1552] <220>
- [1553] <221>misc_feature
- [1554] <222>(2).. (2)

- [1555] <223>Xaa = Fc
- [1556] <400>23
- [1557] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp
- [1558] 1 5 10 15
- [1559] Pro Trp Thr Cys Glu His Met Leu Glu
- [1560] 20 25
- [1561] <210>24
- [1562] <211>47
- [1563] <212>PRT
- [1564] <213> 人工序列
- [1565] <220>
- [1566] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
- [1567] <220>
- [1568] <221>misc_feature
- [1569] <222>(2)..(2)
- [1570] <223>Xaa = Fc
- [1571] <400>24
- [1572] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly
- [1573] 1 5 10 15
- [1574] Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Gln
- [1575] 20 25 30
- [1576] Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Leu Glu
- [1577] 35 40 45
- [1578] <210>25
- [1579] <211>61
- [1580] <212>PRT
- [1581] <213> 人工序列
- [1582] <220>
- [1583] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
- [1584] <220>
- [1585] <221>misc_feature
- [1586] <222>(2)..(2)
- [1587] <223>Xaa = Fc
- [1588] <400>25
- [1589] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Gln Glu Cys Glu Trp Asp
- [1590] 1 5 10 15
- [1591] Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser
- [1592] 20 25 30
- [1593] Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Gln Glu Glu

[1594]	35	40	45
[1595]	Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Leu Glu		
[1596]	50	55	60
[1597]	<210>26		
[1598]	<211>75		
[1599]	<212>PRT		
[1600]	<213> 人工序列		
[1601]	<220>		
[1602]	<223> 能结合 Ang-2 的肽抗体		
[1603]	<220>		
[1604]	<221>misc_feature		
[1605]	<222>(75).. (75)		
[1606]	<223>Xaa = Fc		
[1607]	<400>26		
[1608]	Met Gly Ala Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His		
[1609]	1 5 10 15		
[1610]	Met Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu		
[1611]	20 25 30		
[1612]	Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr Phe Gln Gln Gly Ser Gly		
[1613]	35 40 45		
[1614]	Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser		
[1615]	50 55 60		
[1616]	Ala Thr His Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa		
[1617]	65 70 75		
[1618]	<210>27		
[1619]	<211>72		
[1620]	<212>PRT		
[1621]	<213> 人工序列		
[1622]	<220>		
[1623]	<223> 能结合 Ang-2 的肽抗体		
[1624]	<220>		
[1625]	<221>misc_feature		
[1626]	<222>(2).. (2)		
[1627]	<223>Xaa = Fc		
[1628]	<400>27		
[1629]	Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly		
[1630]	1 5 10 15		
[1631]	Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Lys		
[1632]	20 25 30		

[1633] Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Glu Gln Phe Thr
[1634] 35 40 45
[1635] Phe Gln Gln Gly Gly Gly Gly Gly Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro
[1636] 50 55 60
[1637] Trp Thr Cys Glu His Met Leu Glu
[1638] 65 70
[1639] <210>28
[1640] <211>30
[1641] <212>PRT
[1642] <213> 人工序列
[1643] <220>
[1644] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[1645] <220>
[1646] <221>misc_feature
[1647] <222>(30).. (30)
[1648] <223>Xaa = Fc
[1649] <400>28
[1650] Met Gly Ala Gln Phe Asp Tyr Cys Glu Gly Val Glu Asp Pro Phe Thr
[1651] 1 5 10 15
[1652] Phe Gly Cys Asp Asn His Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
[1653] 20 25 30
[1654] <210>29
[1655] <211>26
[1656] <212>PRT
[1657] <213> 人工序列
[1658] <220>
[1659] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[1660] <220>
[1661] <221>misc_feature
[1662] <222>(26).. (26)
[1663] <223>Xaa = Fc
[1664] <400>29
[1665] Met Gly Ala Gln Gln Tyr Gly Cys Asp Gly Phe Leu Tyr Gly Cys Met
[1666] 1 5 10 15
[1667] Ile Asn Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
[1668] 20 25
[1669] <210>30
[1670] <211>26
[1671] <212>PRT

- [1672] <213> 人工序列
[1673] <220>
[1674] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[1675] <220>
[1676] <221>misc_feature
[1677] <222>(26).. (26)
[1678] <223>Xaa = Fc
[1679] <400>30
[1680] Met Gly Ala Gln Lys Arg Pro Cys Glu Glu Met Trp Gly Gly Cys Asn
[1681] 1 5 10 15
[1682] Tyr Asp Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
[1683] 20 25
[1684] <210>31
[1685] <211>26
[1686] <212>PRT
[1687] <213> 人工序列
[1688] <220>
[1689] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[1690] <220>
[1691] <221>misc_feature
[1692] <222>(26).. (26)
[1693] <223>Xaa = Fc
[1694] <400>31
[1695] Met Gly Ala Gln His Gln Ile Cys Lys Trp Asp Pro Trp Thr Cys Lys
[1696] 1 5 10 15
[1697] His Trp Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
[1698] 20 25
[1699] <210>32
[1700] <211>26
[1701] <212>PRT
[1702] <213> 人工序列
[1703] <220>
[1704] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[1705] <220>
[1706] <221>misc_feature
[1707] <222>(26).. (26)
[1708] <223>Xaa = Fc
[1709] <400>32
[1710] Met Gly Ala Gln Lys Arg Pro Cys Glu Glu Ile Phe Gly Gly Cys Thr

[1711]	1	5	10	15
[1712]	Tyr Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa			
[1713]	20	25		
[1714]	<210>33			
[1715]	<211>784			
[1716]	<212>DNA			
[1717]	<213> 人工序列			
[1718]	<220>			
[1719]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽抗体的 DNA			
[1720]	<400>33			
[1721]	atgggtgcac agaaattcaa cccgctggac gaactggaag aaactctgta cgaacagttc	60		
[1722]	actttccagc agctcgaggg tggaggcggg ggggacaaaa ctcacacatg tccaccttgc	120		
[1723]	ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gttttcctct tcccccaaa acccaaggac	180		
[1724]	accctcatga tctcccgac ccctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa	240		
[1725]	gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca	300		
[1726]	aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg	360		
[1727]	caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgaagg tctccaacaa agccctccca	420		
[1728]	gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac	480		
[1729]	accctgcccc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc	540		
[1730]	aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC	600		
[1731]	aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ctttcttct ctacagcaag	660		
[1732]	ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat	720		
[1733]	gaggctctgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaataatgg	780		
[1734]	atcc	784		
[1735]	<210>34			
[1736]	<211>768			
[1737]	<212>DNA			
[1738]	<213> 人工序列			
[1739]	<220>			
[1740]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽抗体的 DNA			
[1741]	<400>34			
[1742]	atgaaattca acccgctgga cgaactggaa gaaactctgt acgaacagtt cactttccag	60		
[1743]	cagctcgagg gtggaggcgg tggggacaaa actcacacat gtccaccttg cccagcacct	120		
[1744]	gaactcctgg ggggaccgtc agttttctct tcccccaaa aaccaagga caccctcatg	180		
[1745]	atctcccgga cccctgaggc cacatgcgtg gtgggtggacg tgagccacga agaccctgag	240		
[1746]	gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg	300		
[1747]	gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac	360		
[1748]	tggtctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agccccatc	420		
[1749]	gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc	480		

[1750]	ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc	540
[1751]	tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag	600
[1752]	accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg	660
[1753]	gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg	720
[1754]	cacaaccact acacgcagaa gaggcctctcc ctgtctccgg gtaaataa	768
[1755]	<210>35	
[1756]	<211>834	
[1757]	<212>DNA	
[1758]	<213> 人工序列	
[1759]	<220>	
[1760]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽抗体的 DNA	
[1761]	<400>35	
[1762]	atgaaattca acccgctgga cgaactggaa gaaactctgt acgaacagtt cactttccag	60
[1763]	cagggatccg gttctgctac tgggtggttc ggctccaccg caagctctgg ttcaggcagt	120
[1764]	gcgactcatc tcgagggtgg aggcgggtggg gacaaaactc acacatgtcc accttgccca	180
[1765]	gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtt ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc	240
[1766]	ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac	300
[1767]	cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggctggagg tgcataatgc caagacaaag	360
[1768]	ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac	420
[1769]	caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc	480
[1770]	cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc	540
[1771]	ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa	600
[1772]	ggctttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac	660
[1773]	tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttctctta cagcaagctc	720
[1774]	accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag	780
[1775]	gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa ataa	834
[1776]	<210>36	
[1777]	<211>861	
[1778]	<212>DNA	
[1779]	<213> 人工序列	
[1780]	<220>	
[1781]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽抗体的 DNA	
[1782]	<400>36	
[1783]	atgggtgcac agaaattcaa cccgctggac gaactggaag aaactctgta cgaacagttc	60
[1784]	actttccagc aggggtggtg tgggtggtggc ggttgtaagt tcaaccact ggatgagctg	120
[1785]	gaagagactc tgtatgaaca gtacacttcc cagcaactcg aggggtggagg cgggtggggac	180
[1786]	aaaactcaca catgtccacc ttgccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagttttc	240
[1787]	cttttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc	300
[1788]	gtgggtggtg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc	360

[1789]	gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt	420
[1790]	gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc	480
[1791]	aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg	540
[1792]	cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac	600
[1793]	caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg	660
[1794]	gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac	720
[1795]	ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac	780
[1796]	gtctttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc	840
[1797]	tcctgtctc cgggtaaata a	861
[1798]	<210>37	
[1799]	<211>849	
[1800]	<212>DNA	
[1801]	<213> 人工序列	
[1802]	<220>	
[1803]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽抗体的 DNA	
[1804]	<400>37	
[1805]	atgaaattca acccgctgga cgaactggaa gaaactctgt acgaacagtt cactttccag	60
[1806]	cagggtggtg gtggtggcgg tggtaagttc aaccactgg atgagctgga agagactctg	120
[1807]	tatgaacagt tcactttcca gcaactcgag ggtggaggcg gtggggacaa aactcacaca	180
[1808]	tgtccacctt gccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagttttcct cttcccccca	240
[1809]	aaaccaagg acaccctcat gatctcccg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac	300
[1810]	gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat	360
[1811]	aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc	420
[1812]	ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac	480
[1813]	aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa	540
[1814]	ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg	600
[1815]	acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatgcgct tggagtggga gagcaatggg	660
[1816]	cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctctttcttc	720
[1817]	ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc	780
[1818]	tcctgtgatgc atgaggtctt gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg	840
[1819]	ggtaaataa	849
[1820]	<210>38	
[1821]	<211>759	
[1822]	<212>DNA	
[1823]	<213> 人工序列	
[1824]	<220>	
[1825]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽抗体的 DNA	
[1826]	<400>38	
[1827]	atgggtgcac agcaggaaga atgcgaatgg gaccatgga cttgcgaaca catgctcgag	60

[1828]	ggtggaggcg gtggggacaa aactcacaca tgtccacctt gcccagcacc tgaactcctg	120
[1829]	gggggaccgt cagttttcct cttccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg	180
[1830]	accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc	240
[1831]	aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaa caaagccgcg ggaggagcag	300
[1832]	tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat	360
[1833]	ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc	420
[1834]	atctccaaag ccaaaggga gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg	480
[1835]	gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc	540
[1836]	gacatgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct	600
[1837]	cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc	660
[1838]	aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac	720
[1839]	tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataa	759
[1840]	<210>39	
[1841]	<211>816	
[1842]	<212>DNA	
[1843]	<213> 人工序列	
[1844]	<220>	
[1845]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽抗体的 DNA	
[1846]	<400>39	
[1847]	atgcaggaag aatgcgaatg ggaccatgg acttgcaac acatgggatc cggttctgct	60
[1848]	actggtggtt ccggctccac cgcaagctct ggttcaggca gtgcgactca tctcagggt	120
[1849]	ggaggcgggtg gggacaaaac tcacacatgt ccaccttgcc cagcacctga actcctgggg	180
[1850]	ggaccgtcag ttttctctt cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc	240
[1851]	cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	300
[1852]	tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac	360
[1853]	aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc	420
[1854]	aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc	480
[1855]	tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca cctgcccc atcccgggat	540
[1856]	gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttggtca aaggttctta tcccagcagc	600
[1857]	atgcccggtg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc	660
[1858]	gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg	720
[1859]	tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac	780
[1860]	acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaataa	816
[1861]	<210>40	
[1862]	<211>867	
[1863]	<212>DNA	
[1864]	<213> 人工序列	
[1865]	<220>	
[1866]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽抗体的 DNA	

[1867]	<400>40	
[1868]	atgggtgcac agcaggaaga atgcgaatgg gacctatgga cttgcgaaca catgggatcc	60
[1869]	ggttctgcta ctggtggttc cggtccacc gcaagctctg gttcaggcag tgcgactcat	120
[1870]	caggaagaat gcgaatggga cccatggact tgccaacaca tgctcgaggg tggaggcggt	180
[1871]	ggggacaaaa ctcacacatg tccaccttgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	240
[1872]	gttttctctt tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccgga cctgagggtc	300
[1873]	acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	360
[1874]	gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	420
[1875]	taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	480
[1876]	aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc	540
[1877]	aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc	600
[1878]	aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	660
[1879]	gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	720
[1880]	tccgacggct ctttcttct ctacagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	780
[1881]	gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtcttgc acaaccacta cacgcagaag	840
[1882]	agcctctccc tgtctccggg taaataa	867
[1883]	<210>41	
[1884]	<211>774	
[1885]	<212>DNA	
[1886]	<213> 人工序列	
[1887]	<220>	
[1888]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽抗体的 DNA	
[1889]	<400>41	
[1890]	atggacaaaa ctcacacatg tccaccttgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	60
[1891]	gttttctctt tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccgga cctgagggtc	120
[1892]	acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	180
[1893]	gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	240
[1894]	taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	300
[1895]	aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc	360
[1896]	aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc	420
[1897]	aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	480
[1898]	gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	540
[1899]	tccgacggct ctttcttct ctacagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	600
[1900]	gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtcttgc acaaccacta cacgcagaag	660
[1901]	agcctctccc tgtctccggg taaagggtga ggtggtggtg cacagaaatt caaccgctg	720
[1902]	gacgagctgg aagagactct gtacgaacag ttacttttc aacagctcga gtaa	774
[1903]	<210>42	
[1904]	<211>840	
[1905]	<212>DNA	

[1906]	<213> 人工序列	
[1907]	<220>	
[1908]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽抗体的 DNA	
[1909]	<400>42	
[1910]	atggacaaaa ctcacacatg tccaccttgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	60
[1911]	gttttctctt tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccgga ccttgaggtc	120
[1912]	acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	180
[1913]	gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	240
[1914]	taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	300
[1915]	aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc	360
[1916]	aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc	420
[1917]	aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	480
[1918]	gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	540
[1919]	tccgacggct ctttcttct ctacagcaag ctaccctgg acaagagcag gtggcagcag	600
[1920]	gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtcttgc acaaccacta cacgcagaag	660
[1921]	agcctctccc tgtctccggg taaaggtgga ggtgggtgtg cacagggatc cggttctgct	720
[1922]	actggtggtt ccggctccac cgcaagctct ggttcaggca gtgcgactca taaattcaac	780
[1923]	ccgctggacg aactggaaga aactctgtac gaacagttca ctttcagca actcgagtaa	840
[1924]	<210>43	
[1925]	<211>858	
[1926]	<212>DNA	
[1927]	<213> 人工序列	
[1928]	<220>	
[1929]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽抗体的 DNA	
[1930]	<400>43	
[1931]	atggacaaaa ctcacacatg tccaccttgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	60
[1932]	gttttctctt tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccgga ccttgaggtc	120
[1933]	acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	180
[1934]	gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	240
[1935]	taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	300
[1936]	aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc	360
[1937]	aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc	420
[1938]	aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	480
[1939]	gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	540
[1940]	tccgacggct ctttcttct ctacagcaag ctaccctgg acaagagcag gtggcagcag	600
[1941]	gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtcttgc acaaccacta cacgcagaag	660
[1942]	agcctctccc tgtctccggg taaaggtgga ggtgggtgtg cacagaaatt caaccgctg	720
[1943]	gacgaactgg aagaaactct gtacgaacag ttactttcc agcagggtgg tgggtggtgt	780
[1944]	ggcgggtggt agttcaaccc actggatgag ctggaagaga ctctgtatga acagttcact	840

[1945]	ttccagcaac tcgagtaa	858
[1946]	<210>44	
[1947]	<211>756	
[1948]	<212>DNA	
[1949]	<213> 人工序列	
[1950]	<220>	
[1951]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽抗体的 DNA	
[1952]	<400>44	
[1953]	atggacaaaa ctcacacatg tccaccttgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	60
[1954]	gttttctctt tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc	120
[1955]	acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	180
[1956]	gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	240
[1957]	taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	300
[1958]	aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc	360
[1959]	aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc	420
[1960]	aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	480
[1961]	gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	540
[1962]	tccgacggct ctttcttct ctacagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	600
[1963]	gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtcttgc acaaccacta cacgcagaag	660
[1964]	agcctctccc tgtctccggg taaaggtgga ggtgggtgtg cacagcagga agaatgcgaa	720
[1965]	tgggacctat ggacttgca acacatgctc gagtaa	756
[1966]	<210>45	
[1967]	<211>822	
[1968]	<212>DNA	
[1969]	<213> 人工序列	
[1970]	<220>	
[1971]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽抗体的 DNA	
[1972]	<400>45	
[1973]	atggacaaaa ctcacacatg tccaccttgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	60
[1974]	gttttctctt tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc	120
[1975]	acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	180
[1976]	gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	240
[1977]	taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	300
[1978]	aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc	360
[1979]	aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc	420
[1980]	aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	480
[1981]	gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	540
[1982]	tccgacggct ctttcttct ctacagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	600
[1983]	gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtcttgc acaaccacta cacgcagaag	660

[1984]	agcctctccc tgtctccggg taaaggtgga ggtggtggtg cacagggatc cggttctgct	720
[1985]	actggtggtt cggctccac cgcaagctct ggttcaggca gtgcgactca tcaggaagaa	780
[1986]	tgcgaatggg acccatggac ttgcgaacac atgctcgagt aa	822
[1987]	<210>46	
[1988]	<211>864	
[1989]	<212>DNA	
[1990]	<213> 人工序列	
[1991]	<220>	
[1992]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽抗体的 DNA	
[1993]	<400>46	
[1994]	atggacaaaa ctcacacatg tccaccttgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	60
[1995]	gttttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc	120
[1996]	acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	180
[1997]	gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	240
[1998]	taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	300
[1999]	aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc	360
[2000]	aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc	420
[2001]	aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	480
[2002]	gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	540
[2003]	tccgacggct ctttcttct ctacagcaag ctaccctgg acaagagcag gtggcagcag	600
[2004]	gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtcttgc acaaccacta cacgcagaag	660
[2005]	agcctctccc tgtctccggg taaaggtgga ggtggtggtg cacagcagga agaatgcgaa	720
[2006]	tgggacctat ggacttgca acacatggga tccggttctg ctactggtgg ttccggctcc	780
[2007]	accgcaagct ctggttcagg cagegcgact catcaggaag aatgcgaatg ggacctatgg	840
[2008]	acttgcaac acatgctcga gtaa	864
[2009]	<210>47	
[2010]	<211>906	
[2011]	<212>DNA	
[2012]	<213> 人工序列	
[2013]	<220>	
[2014]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽抗体的 DNA	
[2015]	<400>47	
[2016]	atgggtgcac aggaagaatg cgaatgggac ccatggactt gcgaacacat ggggtggtggt	60
[2017]	ggtggtggcg gtggtaaatt caaccgctg gacgaactgg aagaaactct gtacgaacag	120
[2018]	ttactttcc agcaggatc cggttctgct actggtggtt ccggtccac cgcaagctct	180
[2019]	ggttcaggca gtgcgactca tctcgagggt ggaggcgggt gggacaaaac tcacacatgt	240
[2020]	ccaccttgcc cagcacctga actcctgggg ggacctcag ttttctctt cccccaaaa	300
[2021]	cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg	360
[2022]	agccacgaag accctgaggt caagttcaac tgggtacgtg acggcgtgga ggtgcataat	420

[2023]	gccaaagacaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc	480
[2024]	accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa	540
[2025]	gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca	600
[2026]	caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc	660
[2027]	tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag	720
[2028]	ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc	780
[2029]	tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcattgctcc	840
[2030]	gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt	900
[2031]	aaataa	906
[2032]	<210>48	
[2033]	<211>897	
[2034]	<212>DNA	
[2035]	<213> 人工序列	
[2036]	<220>	
[2037]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽抗体的 DNA	
[2038]	<400>48	
[2039]	atggacaaaa ctcacacatg tccaccttgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	60
[2040]	gttttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc	120
[2041]	acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	180
[2042]	gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	240
[2043]	taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	300
[2044]	aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc	360
[2045]	aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc	420
[2046]	aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggte aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	480
[2047]	gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	540
[2048]	tccgacggct ctttcttct ctacagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	600
[2049]	gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtcttgc acaaccacta cacgcagaag	660
[2050]	agcctctccc tgtctccggg taaaggtgga ggtgggtgtg cacagggate cggttctgct	720
[2051]	actggtggtt ccggctccac cgcaagctct ggttcaggca gtgcgactca taaattcaac	780
[2052]	ccgctggacg aactggaaga aactctgtac gaacagttca ctttcagca ggggtgtggc	840
[2053]	ggtggtcagg aagaatgcga atgggaccca tggacttgcg aacacatgct cgagtaa	897
[2054]	<210>49	
[2055]	<211>771	
[2056]	<212>DNA	
[2057]	<213> 人工序列	
[2058]	<220>	
[2059]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽抗体的 DNA	
[2060]	<400>49	
[2061]	atgggtgcac agttcgacta ctgcgaaggt gttgaagacc cgttcacttt cggttgcgac	60

[2062]	aaccacctcg aggggtggagg cgggtggggac aaaactcaca catgtccacc ttgcccagca	120
[2063]	cctgaactcc tgggggggacc gtcagttttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc	180
[2064]	atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtgggtggagg acgtgagcca cgaagaccct	240
[2065]	gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg	300
[2066]	cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag	360
[2067]	gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc	420
[2068]	atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg	480
[2069]	ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc	540
[2070]	ttctatccca gcgacatgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac	600
[2071]	aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc	660
[2072]	gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct	720
[2073]	ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaata a	771
[2074]	<210>50	
[2075]	<211>759	
[2076]	<212>DNA	
[2077]	<213> 人工序列	
[2078]	<220>	
[2079]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽抗体的 DNA	
[2080]	<400>50	
[2081]	atgggtgcac agcagtacgg ttgcgacggg tttctgtacg gttgcatgat caacctcgag	60
[2082]	ggtggaggcg gtggggacaa aactcacaca tgtccacctt gccagcacc tgaactcctg	120
[2083]	gggggaccgt cagttttcct ctcccccca aaacccaagg acacctcat gatctcccgg	180
[2084]	accttgagg tcacatgcgt ggtgggtggac gtgagccacg aagacctga ggtcaagttc	240
[2085]	aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag	300
[2086]	tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat	360
[2087]	ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cageccccc atcgagaaaacc	420
[2088]	atctccaaag ccaaagggca gcccagagaa ccacaggtgt acacctgcc cccatcccgg	480
[2089]	gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc	540
[2090]	gacatgcccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct	600
[2091]	cccgtgctgg actccgacgg ctctttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc	660
[2092]	aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac	720
[2093]	tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataa	759
[2094]	<210>51	
[2095]	<211>759	
[2096]	<212>DNA	
[2097]	<213> 人工序列	
[2098]	<220>	
[2099]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽抗体的 DNA	
[2100]	<400>51	

[2101]	atgggtgcac agaaacgccc atgcgaagaa atgtggggtg gttgcaacta cgacctcgag	60
[2102]	ggtggaggcg gtggggacaa aactcacaca tgtccacctt gcccagcacc tgaactcctg	120
[2103]	gggggaccgt cagttttcct cttcccccca aaaccaaggg acaccctcat gatctcccgg	180
[2104]	acccttgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc	240
[2105]	aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag	300
[2106]	tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat	360
[2107]	ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc	420
[2108]	atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg	480
[2109]	gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc	540
[2110]	gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct	600
[2111]	cccgtgctgg actccgacgg ctctttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc	660
[2112]	aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac	720
[2113]	tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataa	759
[2114]	<210>52	
[2115]	<211>759	
[2116]	<212>DNA	
[2117]	<213> 人工序列	
[2118]	<220>	
[2119]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽抗体的 DNA	
[2120]	<400>52	
[2121]	atgggtgcac agcaccagat ctgcaaattgg gaccctgga cctgcaaaca ctggctcgag	60
[2122]	ggtggaggcg gtggggacaa aactcacaca tgtccacctt gcccagcacc tgaactcctg	120
[2123]	gggggaccgt cagttttcct cttcccccca aaaccaaggg acaccctcat gatctcccgg	180
[2124]	acccttgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc	240
[2125]	aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag	300
[2126]	tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat	360
[2127]	ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc	420
[2128]	atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg	480
[2129]	gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc	540
[2130]	gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct	600
[2131]	cccgtgctgg actccgacgg ctctttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc	660
[2132]	aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac	720
[2133]	tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataa	759
[2134]	<210>53	
[2135]	<211>759	
[2136]	<212>DNA	
[2137]	<213> 人工序列	
[2138]	<220>	
[2139]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽抗体的 DNA	

[2140]	<400>53	
[2141]	atgggtgcac agaaacgtcc atgcgaagaa atcttcggtg gttgcaccta ccagctcgag	60
[2142]	ggtggaggcg gtggggacaa aactcacaca tgtccacctt gcccagcacc tgaactcctg	120
[2143]	gggggaccgt cagttttcct cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg	180
[2144]	acccttgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc	240
[2145]	aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag	300
[2146]	tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat	360
[2147]	ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc	420
[2148]	atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg	480
[2149]	gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccage	540
[2150]	gacatgcccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct	600
[2151]	cccgtgctgg actccgacgg ctctttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc	660
[2152]	aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac	720
[2153]	tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataa	759
[2154]	<210>54	
[2155]	<211>25	
[2156]	<212>DNA	
[2157]	<213> 人工序列	
[2158]	<220>	
[2159]	<223> 寡核苷酸	
[2160]	<400>54	
[2161]	cggcgcaact atcggatatca agctg	25
[2162]	<210>55	
[2163]	<211>26	
[2164]	<212>DNA	
[2165]	<213> 人工序列	
[2166]	<220>	
[2167]	<223> 寡核苷酸	
[2168]	<400>55	
[2169]	catgtaccgt aacactgagt ttcgtc	26
[2170]	<210>56	
[2171]	<211>14	
[2172]	<212>PRT	
[2173]	<213> 人工序列	
[2174]	<220>	
[2175]	<223> 从 TN8-IX 文库产生的共有基序	
[2176]	<220>	
[2177]	<221>misc_feature	
[2178]	<222>(7,12 和).. (14)	

- [2179] <223>Xaa 指任何天然存在的氨基酸
- [2180] <400>56
- [2181] Lys Arg Pro Cys Glu Glu Xaa Trp Gly Gly Cys Xaa Tyr Xaa
- [2182] 1 5 10
- [2183] <210>57
- [2184] <211>14
- [2185] <212>PRT
- [2186] <213> 人工序列
- [2187] <220>
- [2188] <223> 从 TN8-IX 文库产生的共有基序
- [2189] <220>
- [2190] <221>misc_feature
- [2191] <222>(7,12 和).. (14)
- [2192] <223>Xaa 指任何天然存在的氨基酸 .
- [2193] <400>57
- [2194] Lys Arg Pro Cys Glu Glu Xaa Phe Gly Gly Cys Xaa Tyr Xaa
- [2195] 1 5 10
- [2196] <210>58
- [2197] <211>14
- [2198] <212>PRT
- [2199] <213> 人工序列
- [2200] <220>
- [2201] <223> 从 TN8-IX 文库产生的共有基序
- [2202] <220>
- [2203] <221>misc_feature
- [2204] <222>(1,2,3,5 和).. (13)
- [2205] <223>Xaa 指任何天然存在的氨基酸 .
- [2206] <400>58
- [2207] Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu Xaa Met
- [2208] 1 5 10
- [2209] <210>59
- [2210] <211>18
- [2211] <212>PRT
- [2212] <213> 人工序列
- [2213] <220>
- [2214] <223> 从 TN12-I 文库产生的共有基序
- [2215] <220>
- [2216] <221>misc_feature
- [2217] <222>(3,8,10-14 和).. (18)

- [2218] <223>Xaa 指任何天然存在的氨基酸。
- [2219] <400>59
- [2220] Trp Ser Xaa Cys Ala Trp Phe Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Arg
- [2221] 1 5 10 15
- [2222] Arg Xaa
- [2223] <210>60
- [2224] <211>227
- [2225] <212>PRT
- [2226] <213> 人工序列
- [2227] <220>
- [2228] <223> 人 Fc IgG1
- [2229] <400>60
- [2230] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
- [2231] 1 5 10 15
- [2232] Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
- [2233] 20 25 30
- [2234] Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
- [2235] 35 40 45
- [2236] Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
- [2237] 50 55 60
- [2238] His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
- [2239] 65 70 75 80
- [2240] Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
- [2241] 85 90 95
- [2242] Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
- [2243] 100 105 110
- [2244] Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
- [2245] 115 120 125
- [2246] Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
- [2247] 130 135 140
- [2248] Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
- [2249] 145 150 155 160
- [2250] Trp Glu Set Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
- [2251] 165 170 175
- [2252] Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
- [2253] 180 185 190
- [2254] Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
- [2255] 195 200 205
- [2256] His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

[2257]	210	215	220
[2258]	Pro Gly Lys		
[2259]	225		
[2260]	<210>61		
[2261]	<211>14		
[2262]	<212>PRT		
[2263]	<213> 人工序列		
[2264]	<220>		
[2265]	<223> 从 TN8-IX 文库产生的共有基序		
[2266]	<220>		
[2267]	<221>misc_feature		
[2268]	<222>(1-3,5,7,12,13 和)..(14)		
[2269]	<223>Xaa 指任何天然存在的氨基酸.		
[2270]	<400>61		
[2271]	Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Asp Xaa Tyr Trp Tyr Cys Xaa Xaa Xaa		
[2272]	1	5	10
[2273]	<210>62		
[2274]	<211>14		
[2275]	<212>PRT		
[2276]	<213> 人工序列		
[2277]	<220>		
[2278]	<223> 从 TN8-IX 文库产生的共有基序		
[2279]	<220>		
[2280]	<221>misc_feature		
[2281]	<222>(1-3,5,7,12,13 和)..(14)		
[2282]	<223>Xaa 指任何天然存在的氨基酸.		
[2283]	<400>62		
[2284]	Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Asp Xaa Tyr Thr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa		
[2285]	1	5	10
[2286]	<210>63		
[2287]	<211>14		
[2288]	<212>PRT		
[2289]	<213> 人工序列		
[2290]	<220>		
[2291]	<223> 从 TN8-IX 文库产生的共有基序		
[2292]	<220>		
[2293]	<221>misc_feature		
[2294]	<222>(1-3,5,7,12,13 和)..(14)		
[2295]	<223>Xaa 指任何天然存在的氨基酸.		

- [2296] <400>63
[2297] Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Asp Xaa Phe Trp Tyr Cys Xaa Xaa Xaa
[2298] 1 5 10
[2299] <210>64
[2300] <211>14
[2301] <212>PRT
[2302] <213> 人工序列
[2303] <220>
[2304] <223> 从 TN8-IX 文库产生的共有基序
[2305] <220>
[2306] <221>misc_feature
[2307] <222>(1-3,5,7,12,13 和).. (14)
[2308] <223>Xaa 指任何天然存在的氨基酸。
[2309] <400>64
[2310] Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Asp Xaa Phe Thr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa
[2311] 1 5 10
[2312] <210>65
[2313] <211>5
[2314] <212>PRT
[2315] <213> 人工序列
[2316] <220>
[2317] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2318] <400>65
[2319] Trp Asp Pro Trp Thr
[2320] 1 5
[2321] <210>66
[2322] <211>6
[2323] <212>PRT
[2324] <213> 人工序列
[2325] <220>
[2326] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2327] <400>66
[2328] Trp Asp Pro Trp Thr Cys
[2329] 1 5
[2330] <210>67
[2331] <211>7
[2332] <212>PRT
[2333] <213> 人工序列
[2334] <220>

- [2335] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
- [2336] <220>
- [2337] <221>misc_feature
- [2338] <222>(2)..(2)
- [2339] <223>Xaa 是酸性或中性极性氨基酸残基
- [2340] <400>67
- [2341] Cys Xaa Trp Asp Pro Trp Thr
- [2342] 1 5
- [2343] <210>68
- [2344] <211>8
- [2345] <212>PRT
- [2346] <213> 人工序列
- [2347] <220>
- [2348] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
- [2349] <220>
- [2350] <221>misc_feature
- [2351] <222>(2)..(2)
- [2352] <223>Xaa 是酸性或中性极性氨基酸残基
- [2353] <400>68
- [2354] Cys Xaa Trp Asp Pro Trp Thr Cys
- [2355] 1 5
- [2356] <210>69
- [2357] <211>14
- [2358] <212>PRT
- [2359] <213> 人工序列
- [2360] <220>
- [2361] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
- [2362] <220>
- [2363] <221>misc_feature
- [2364] <222>(1,2 和)..(3)
- [2365] <223>Xaa 各自独立地是氨基酸残基
- [2366] <220>
- [2367] <221>misc_feature
- [2368] <222>(5)..(5)
- [2369] <223>Xaa 是氨基酸残基
- [2370] <220>
- [2371] <221>misc_feature
- [2372] <222>(12)..(12)
- [2373] <223>Xaa 不存在或者是氨基酸残基

- [2374] <220>
- [2375] <221>misc_feature
- [2376] <222>(13)..(13)
- [2377] <223>Xaa 不存在或者是中性疏水,中性极性,或碱性氨基酸残基
- [2378] <220>
- [2379] <221>misc_feature
- [2380] <222>(14)..(14)
- [2381] <223>Xaa 是中性疏水或中性极性氨基酸残基
- [2382] <400>69
- [2383] Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Trp Asp Pro Trp Thr Cys Xaa Xaa Xaa
- [2384] 1 5 10
- [2385] <210>70
- [2386] <211>20
- [2387] <212>PRT
- [2388] <213>人工序列
- [2389] <220>
- [2390] <223>能结合 Ang-2 的多肽
- [2391] <220>
- [2392] <221>misc_feature
- [2393] <222>(1 和)..(15)
- [2394] <223>Xaa 不存在或者是氨基酸残基
- [2395] <220>
- [2396] <221>misc_feature
- [2397] <222>(2 和)..(16)
- [2398] <223>Xaa 不存在或者是中性疏水,中性极性,或碱性氨基酸残基
- [2399] <220>
- [2400] <221>misc_feature
- [2401] <222>(3-6,18,19 和)..(20)
- [2402] <223>Xaa 各自独立地不存在或者是氨基酸残基
- [2403] <220>
- [2404] <221>misc_feature
- [2405] <222>(8)..(8)
- [2406] <223>Xaa 是氨基酸残基
- [2407] <220>
- [2408] <221>misc_feature
- [2409] <222>(17)..(17)
- [2410] <223>Xaa 不存在或者是中性疏水或中性极性氨基酸残基
- [2411] <400>70
- [2412] Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Trp Asp Pro Trp Thr Cys Xaa Xaa

[2413]	1	5	10	15
[2414]	Xaa Xaa Xaa Xaa			
[2415]	20			
[2416]	<210>71			
[2417]	<211>10			
[2418]	<212>PRT			
[2419]	<213> 人工序列			
[2420]	<220>			
[2421]	<223> 能结合 Ang-2 的多肽			
[2422]	<220>			
[2423]	<221>misc_feature			
[2424]	<222>(2)..(2)			
[2425]	<223>Xaa 是中性疏水氨基酸残基			
[2426]	<220>			
[2427]	<221>misc_feature			
[2428]	<222>(4)..(4)			
[2429]	<223>Xaa 是 A, D, 或 E.			
[2430]	<220>			
[2431]	<221>misc_feature			
[2432]	<222>(6)..(6)			
[2433]	<223>Xaa 是酸性氨基酸残基			
[2434]	<220>			
[2435]	<221>misc_feature			
[2436]	<222>(7)..(7)			
[2437]	<223>Xaa 是氨基酸残基			
[2438]	<220>			
[2439]	<221>misc_feature			
[2440]	<222>(8)..(8)			
[2441]	<223>Xaa 是中性疏水, 中性极性, 或碱性氨基酸残基			
[2442]	<400>71			
[2443]	Pro Xaa Asp Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Leu Tyr			
[2444]	1	5	10	
[2445]	<210>72			
[2446]	<211>22			
[2447]	<212>PRT			
[2448]	<213> 人工序列			
[2449]	<220>			
[2450]	<223> 能结合 Ang-2 的多肽			
[2451]	<220>			

- [2452] <221>misc_feature
 [2453] <222>(1,4 和).. (20)
 [2454] <223>Xaa 不存在或者是氨基酸残基
 [2455] <220>
 [2456] <221>misc_feature
 [2457] <222>(2,15,16 和).. (21)
 [2458] <223>Xaa 不存在,或者是中性极性,酸性,或碱性氨基酸残基
 [2459] <220>
 [2460] <221>misc_feature
 [2461] <222>(3,17 和).. (18)
 [2462] <223>Xaa 不存在,或者是中性疏水,或中性极性氨基酸残基
 [2463] <220>
 [2464] <221>misc_feature
 [2465] <222>(6).. (6)
 [2466] <223>Xaa 是中性疏水氨基酸残基
 [2467] <220>
 [2468] <221>misc_feature
 [2469] <222>(8).. (8)
 [2470] <223>Xaa 是 A, D, 或 E.
 [2471] <220>
 [2472] <221>misc_feature
 [2473] <222>(10).. (10)
 [2474] <223>Xaa 是酸性氨基酸残基
 [2475] <220>
 [2476] <221>misc_feature
 [2477] <222>(11).. (11)
 [2478] <223>Xaa 是氨基酸残基
 [2479] <220>
 [2480] <221>misc_feature
 [2481] <222>(12).. (12)
 [2482] <223>Xaa 是中性疏水,中性极性,或碱性氨基酸残基
 [2483] <220>
 [2484] <221>misc_feature
 [2485] <222>(19 和).. (22)
 [2486] <223>Xaa 不存在,或者是中性疏水,中性极性,或碱性氨基酸残基
 [2487] <400>72
 [2488] Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Asp Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Leu Tyr Xaa Xaa
 [2489] 1 5 10 15
 [2490] Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

[2491]	20
[2492]	<210>73
[2493]	<211>8
[2494]	<212>PRT
[2495]	<213> 人工序列
[2496]	<220>
[2497]	<223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2498]	<220>
[2499]	<221>misc_feature
[2500]	<222>(3)..(3)
[2501]	<223>Xaa 是中性极性氨基酸残基
[2502]	<220>
[2503]	<221>misc_feature
[2504]	<222>(4)..(4)
[2505]	<223>Xaa 是酸性氨基酸残基 .
[2506]	<220>
[2507]	<221>misc_feature
[2508]	<222>(5)..(5)
[2509]	<223>Xaa 是中性极性或酸性氨基酸残基
[2510]	<220>
[2511]	<221>misc_feature
[2512]	<222>(6 和)..(7)
[2513]	<223>Xaa 是中性疏水氨基酸残基
[2514]	<400>73
[2515]	Arg Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly
[2516]	1 5
[2517]	<210>74
[2518]	<211>20
[2519]	<212>PRT
[2520]	<213> 人工序列
[2521]	<220>
[2522]	<223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2523]	<220>
[2524]	<221>misc_feature
[2525]	<222>(1,2,4,13,14,19 和)..(20)
[2526]	<223>Xaa 是中性疏水或中性极性氨基酸残基
[2527]	<220>
[2528]	<221>misc_feature
[2529]	<222>(3,9 和)..(17)

- [2530] <223>Xaa 是中极性或酸性氨基酸残基
- [2531] <220>
- [2532] <221>misc_feature
- [2533] <222>(7,15 和)..(16)
- [2534] <223>Xaa 是中极性氨基酸残基
- [2535] <220>
- [2536] <221>misc_feature
- [2537] <222>(8)..(8)
- [2538] <223>Xaa 是酸性氨基酸残基
- [2539] <220>
- [2540] <221>misc_feature
- [2541] <222>(10 和)..(11)
- [2542] <223>Xaa 是中疏水性氨基酸残基
- [2543] <220>
- [2544] <221>misc_feature
- [2545] <222>(18)..(18)
- [2546] <223>Xaa 是中疏水性或碱性氨基酸残基
- [2547] <400>74
- [2548] Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa
- [2549] 1 5 10 15
- [2550] Xaa Xaa Xaa Xaa
- [2551] 20
- [2552] <210>75
- [2553] <211>13
- [2554] <212>PRT
- [2555] <213>人工序列
- [2556] <220>
- [2557] <223>能结合 Ang-2 的多肽
- [2558] <220>
- [2559] <221>misc_feature
- [2560] <222>(2)..(2)
- [2561] <223>Xaa 是酸性氨基酸残基
- [2562] <220>
- [2563] <221>misc_feature
- [2564] <222>(4)..(4)
- [2565] <223>Xaa 是中疏水性或碱性氨基酸残基
- [2566] <220>
- [2567] <221>misc_feature
- [2568] <222>(5)..(5)

- [2569] <223>Xaa 是 E, D, 或 Q
- [2570] <220>
- [2571] <221>misc_feature
- [2572] <222>(10)..(10)
- [2573] <223>Xaa 是中性疏水性或中性极性氨基酸残基
- [2574] <220>
- [2575] <221>misc_feature
- [2576] <222>(13)..(13)
- [2577] <223>Xaa 是酸性残基
- [2578] <400>75
- [2579] Cys Xaa Gly Xaa Xaa Asp Pro Phe Thr Xaa Gly Cys Xaa
- [2580] 1 5 10
- [2581] <210>76
- [2582] <211>20
- [2583] <212>PRT
- [2584] <213> 人工序列
- [2585] <220>
- [2586] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
- [2587] <400>76
- [2588] Pro Ile Arg Gln Glu Glu Cys Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
- [2589] 1 5 10 15
- [2590] Met Trp Glu Val
- [2591] 20
- [2592] <210>77
- [2593] <211>20
- [2594] <212>PRT
- [2595] <213> 人工序列
- [2596] <220>
- [2597] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
- [2598] <400>77
- [2599] Thr Asn Ile Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His
- [2600] 1 5 10 15
- [2601] Met Pro Gly Lys
- [2602] 20
- [2603] <210>78
- [2604] <211>20
- [2605] <212>PRT
- [2606] <213> 人工序列
- [2607] <220>

- [2608] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
- [2609] <400>78
- [2610] Trp Tyr Glu Gln Asp Ala Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
- [2611] 1 5 10 15
- [2612] Met Ala Glu Val
- [2613] 20
- [2614] <210>79
- [2615] <211>20
- [2616] <212>PRT
- [2617] <213> 人工序列
- [2618] <220>
- [2619] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
- [2620] <400>79
- [2621] Asn Arg Leu Gln Glu Val Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
- [2622] 1 5 10 15
- [2623] Met Glu Asn Val
- [2624] 20
- [2625] <210>80
- [2626] <211>20
- [2627] <212>PRT
- [2628] <213> 人工序列
- [2629] <220>
- [2630] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
- [2631] <400>80
- [2632] Ala Ala Thr Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
- [2633] 1 5 10 15
- [2634] Met Pro Arg Ser
- [2635] 20
- [2636] <210>81
- [2637] <211>20
- [2638] <212>PRT
- [2639] <213> 人工序列
- [2640] <220>
- [2641] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
- [2642] <400>81
- [2643] Leu Arg His Gln Glu Gly Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
- [2644] 1 5 10 15
- [2645] Met Phe Asp Trp
- [2646] 20

- [2647] <210>82
[2648] <211>20
[2649] <212>PRT
[2650] <213> 人工序列
[2651] <220>
[2652] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2653] <400>82
[2654] Val Pro Arg Gln Lys Asp Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
[2655] 1 5 10 15
[2656] Met Tyr Val Gly
[2657] 20
[2658] <210>83
[2659] <211>20
[2660] <212>PRT
[2661] <213> 人工序列
[2662] <220>
[2663] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2664] <400>83
[2665] Ser Ile Ser His Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
[2666] 1 5 10 15
[2667] Met Gln Val Gly
[2668] 20
[2669] <210>84
[2670] <211>20
[2671] <212>PRT
[2672] <213> 人工序列
[2673] <220>
[2674] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2675] <400>84
[2676] Trp Ala Ala Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
[2677] 1 5 10 15
[2678] Met Gly Arg Met
[2679] 20
[2680] <210>85
[2681] <211>20
[2682] <212>PRT
[2683] <213> 人工序列
[2684] <220>
[2685] <223> 能结合 Ang-2 的多肽

- [2686] <400>85
[2687] Thr Trp Pro Gln Asp Lys Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
[2688] 1 5 10 15
[2689] Met Gly Ser Thr
[2690] 20
[2691] <210>86
[2692] <211>20
[2693] <212>PRT
[2694] <213> 人工序列
[2695] <220>
[2696] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2697] <400>86
[2698] Gly His Ser Gln Glu Glu Cys Gly Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
[2699] 1 5 10 15
[2700] Met Gly Thr Ser
[2701] 20
[2702] <210>87
[2703] <211>20
[2704] <212>PRT
[2705] <213> 人工序列
[2706] <220>
[2707] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2708] <400>87
[2709] Gln His Trp Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His
[2710] 1 5 10 15
[2711] Met Pro Ser Lys
[2712] 20
[2713] <210>88
[2714] <211>20
[2715] <212>PRT
[2716] <213> 人工序列
[2717] <220>
[2718] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2719] <400>88
[2720] Asn Val Arg Gln Glu Lys Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
[2721] 1 5 10 15
[2722] Met Pro Val Arg
[2723] 20
[2724] <210>89

- [2725] <211>20
[2726] <212>PRT
[2727] <213> 人工序列
[2728] <220>
[2729] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2730] <400>89
[2731] Lys Ser Gly Gln Val Glu Cys Asn Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
[2732] 1 5 10 15
[2733] Met Pro Arg Asn
[2734] 20
[2735] <210>90
[2736] <211>20
[2737] <212>PRT
[2738] <213> 人工序列
[2739] <220>
[2740] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2741] <400>90
[2742] Val Lys Thr Gln Glu His Cys Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
[2743] 1 5 10 15
[2744] Met Arg Glu Trp
[2745] 20
[2746] <210>91
[2747] <211>20
[2748] <212>PRT
[2749] <213> 人工序列
[2750] <220>
[2751] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2752] <400>91
[2753] Ala Trp Gly Gln Glu Gly Cys Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
[2754] 1 5 10 15
[2755] Met Leu Pro Met
[2756] 20
[2757] <210>92
[2758] <211>20
[2759] <212>PRT
[2760] <213> 人工序列
[2761] <220>
[2762] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2763] <400>92

[2764]	Pro Val Asn Gln Glu Asp Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
[2765]	1 5 10 15
[2766]	Met Pro Pro Met
[2767]	20
[2768]	<210>93
[2769]	<211>20
[2770]	<212>PRT
[2771]	<213> 人工序列
[2772]	<220>
[2773]	<223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2774]	<400>93
[2775]	Arg Ala Pro Gln Glu Asp Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His
[2776]	1 5 10 15
[2777]	Met Asp Ile Lys
[2778]	20
[2779]	<210>94
[2780]	<211>20
[2781]	<212>PRT
[2782]	<213> 人工序列
[2783]	<220>
[2784]	<223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2785]	<400>94
[2786]	His Gly Gln Asn Met Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
[2787]	1 5 10 15
[2788]	Met Phe Arg Tyr
[2789]	20
[2790]	<210>95
[2791]	<211>20
[2792]	<212>PRT
[2793]	<213> 人工序列
[2794]	<220>
[2795]	<223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2796]	<400>95
[2797]	Pro Arg Leu Gln Glu Glu Cys Val Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
[2798]	1 5 10 15
[2799]	Met Pro Leu Arg
[2800]	20
[2801]	<210>96
[2802]	<211>20

- [2803] <212>PRT
[2804] <213> 人工序列
[2805] <220>
[2806] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2807] <400>96
[2808] Arg Thr Thr Gln Glu Lys Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
[2809] 1 5 10 15
[2810] Met Glu Ser Gln
[2811] 20
[2812] <210>97
[2813] <211>20
[2814] <212>PRT
[2815] <213> 人工序列
[2816] <220>
[2817] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2818] <400>97
[2819] Gln Thr Ser Gln Glu Asp Cys Val Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His
[2820] 1 5 10 15
[2821] Met Val Ser Ser
[2822] 20
[2823] <210>98
[2824] <211>20
[2825] <212>PRT
[2826] <213> 人工序列
[2827] <220>
[2828] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2829] <400>98
[2830] Gln Val Ile Gly Arg Pro Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
[2831] 1 5 10 15
[2832] Leu Glu Gly Leu
[2833] 20
[2834] <210>99
[2835] <211>20
[2836] <212>PRT
[2837] <213> 人工序列
[2838] <220>
[2839] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2840] <400>99
[2841] Trp Ala Gln Gln Glu Glu Cys Ala Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His

[2842]	1	5	10	15
[2843]	Met Val Gly Leu			
[2844]	20			
[2845]	<210>100			
[2846]	<211>20			
[2847]	<212>PRT			
[2848]	<213> 人工序列			
[2849]	<220>			
[2850]	<223> 能结合 Ang-2 的多肽			
[2851]	<400>100			
[2852]	Leu Pro Gly Gln Glu Asp Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His			
[2853]	1	5	10	15
[2854]	Met Val Arg Ser			
[2855]	20			
[2856]	<210>101			
[2857]	<211>20			
[2858]	<212>PRT			
[2859]	<213> 人工序列			
[2860]	<220>			
[2861]	<223> 能结合 Ang-2 的多肽			
[2862]	<400>101			
[2863]	Pro Met Asn Gln Val Glu Cys Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His			
[2864]	1	5	10	15
[2865]	Met Pro Arg Ser			
[2866]	20			
[2867]	<210>102			
[2868]	<211>20			
[2869]	<212>PRT			
[2870]	<213> 人工序列			
[2871]	<220>			
[2872]	<223> 能结合 Ang-2 的多肽			
[2873]	<400>102			
[2874]	Phe Gly Trp Ser His Gly Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His			
[2875]	1	5	10	15
[2876]	Met Gly Ser Thr			
[2877]	20			
[2878]	<210>103			
[2879]	<211>20			
[2880]	<212>PRT			

- [2881] <213> 人工序列
[2882] <220>
[2883] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2884] <400>103
[2885] Lys Ser Thr Gln Asp Asp Cys Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
[2886] 1 5 10 15
[2887] Met Val Gly Pro
[2888] 20
[2889] <210>104
[2890] <211>20
[2891] <212>PRT
[2892] <213> 人工序列
[2893] <220>
[2894] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2895] <400>104
[2896] Gly Pro Arg Ile Ser Thr Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
[2897] 1 5 10 15
[2898] Met Asp Gln Leu
[2899] 20
[2900] <210>105
[2901] <211>20
[2902] <212>PRT
[2903] <213> 人工序列
[2904] <220>
[2905] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2906] <400>105
[2907] Ser Thr Ile Gly Asp Met Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His
[2908] 1 5 10 15
[2909] Met Gln Val Asp
[2910] 20
[2911] <210>106
[2912] <211>20
[2913] <212>PRT
[2914] <213> 人工序列
[2915] <220>
[2916] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2917] <400>106
[2918] Val Leu Gly Gly Gln Gly Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu
[2919] 1 5 10 15

- [2920] Leu Gln Gly Trp
[2921] 20
[2922] <210>107
[2923] <211>20
[2924] <212>PRT
[2925] <213> 人工序列
[2926] <220>
[2927] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2928] <400>107
[2929] Val Leu Gly Gly Gln Gly Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His
[2930] 1 5 10 15
[2931] Leu Glu Asp Gly
[2932] 20
[2933] <210>108
[2934] <211>20
[2935] <212>PRT
[2936] <213> 人工序列
[2937] <220>
[2938] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2939] <400>108
[2940] Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His
[2941] 1 5 10 15
[2942] Met Gln Gly Gly
[2943] 20
[2944] <210>109
[2945] <211>20
[2946] <212>PRT
[2947] <213> 人工序列
[2948] <220>
[2949] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2950] <400>109
[2951] Thr Lys Gly Lys Ser Val Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His
[2952] 1 5 10 15
[2953] Met Gln Ser Gly
[2954] 20
[2955] <210>110
[2956] <211>20
[2957] <212>PRT
[2958] <213> 人工序列

- [2959] <220>
[2960] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2961] <400>110
[2962] Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His
[2963] 1 5 10 15
[2964] Met Gln Gly Gly
[2965] 20
[2966] <210>111
[2967] <211>20
[2968] <212>PRT
[2969] <213> 人工序列
[2970] <220>
[2971] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2972] <400>111
[2973] Trp Val Asn Glu Val Val Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asn His
[2974] 1 5 10 15
[2975] Trp Asp Thr Pro
[2976] 20
[2977] <210>112
[2978] <211>20
[2979] <212>PRT
[2980] <213> 人工序列
[2981] <220>
[2982] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2983] <400>112
[2984] Val Val Gln Val Gly Met Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Lys His
[2985] 1 5 10 15
[2986] Met Arg Leu Gln
[2987] 20
[2988] <210>113
[2989] <211>20
[2990] <212>PRT
[2991] <213> 人工序列
[2992] <220>
[2993] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[2994] <400>113
[2995] Ala Val Gly Ser Gln Thr Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His
[2996] 1 5 10 15
[2997] Leu Val Glu Val

- [2998] 20
- [2999] <210>114
- [3000] <211>20
- [3001] <212>PRT
- [3002] <213> 人工序列
- [3003] <220>
- [3004] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
- [3005] <400>114
- [3006] Gln Gly Met Lys Met Phe Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His
- [3007] 1 5 10 15
- [3008] Ile Val Tyr Arg
- [3009] 20
- [3010] <210>115
- [3011] <211>20
- [3012] <212>PRT
- [3013] <213> 人工序列
- [3014] <220>
- [3015] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
- [3016] <400>115
- [3017] Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
- [3018] 1 5 10 15
- [3019] Met Gln Gly Gly
- [3020] 20
- [3021] <210>116
- [3022] <211>20
- [3023] <212>PRT
- [3024] <213> 人工序列
- [3025] <220>
- [3026] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
- [3027] <400>116
- [3028] Thr Ser Gln Arg Val Gly Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln His
- [3029] 1 5 10 15
- [3030] Leu Thr Tyr Thr
- [3031] 20
- [3032] <210>117
- [3033] <211>20
- [3034] <212>PRT
- [3035] <213> 人工序列
- [3036] <220>

- [3037] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3038] <400>117
[3039] Gln Trp Ser Trp Pro Pro Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln Thr
[3040] 1 5 10 15
[3041] Val Trp Pro Ser
[3042] 20
[3043] <210>118
[3044] <211>20
[3045] <212>PRT
[3046] <213> 人工序列
[3047] <220>
[3048] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3049] <400>118
[3050] Gly Thr Ser Pro Ser Phe Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His
[3051] 1 5 10 15
[3052] Met Val Gln Gly
[3053] 20
[3054] <210>119
[3055] <211>22
[3056] <212>PRT
[3057] <213> 人工序列
[3058] <220>
[3059] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3060] <400>119
[3061] Gln Asn Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Ala Thr Leu Tyr Glu His
[3062] 1 5 10 15
[3063] Phe Ile Phe His Tyr Thr
[3064] 20
[3065] <210>120
[3066] <211>22
[3067] <212>PRT
[3068] <213> 人工序列
[3069] <220>
[3070] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3071] <400>120
[3072] Leu Asn Phe Thr Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
[3073] 1 5 10 15
[3074] Trp Thr Leu Gln Gln Ser
[3075] 20

- [3076] <210>121
[3077] <211>22
[3078] <212>PRT
[3079] <213> 人工序列
[3080] <220>
[3081] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3082] <400>121
[3083] Thr Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
[3084] 1 5 10 15
[3085] Trp Thr Leu Gln His Gln
[3086] 20
[3087] <210>122
[3088] <211>22
[3089] <212>PRT
[3090] <213> 人工序列
[3091] <220>
[3092] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3093] <400>122
[3094] Val Lys Phe Lys Pro Leu Asp Ala Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu His
[3095] 1 5 10 15
[3096] Trp Met Phe Gln Gln Ala
[3097] 20
[3098] <210>123
[3099] <211>22
[3100] <212>PRT
[3101] <213> 人工序列
[3102] <220>
[3103] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3104] <400>123
[3105] Val Lys Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Ile Leu Tyr Glu Gln
[3106] 1 5 10 15
[3107] Gln Thr Phe Gln Glu Arg
[3108] 20
[3109] <210>124
[3110] <211>22
[3111] <212>PRT
[3112] <213> 人工序列
[3113] <220>
[3114] <223> 能结合 Ang-2 的多肽

- [3115] <400>124
[3116] Thr Asn Phe Met Pro Met Asp Asp Leu Glu Gln Arg Leu Tyr Glu Gln
[3117] 1 5 10 15
[3118] Phe Ile Leu Gln Gln Gly
[3119] 20
[3120] <210>125
[3121] <211>22
[3122] <212>PRT
[3123] <213> 人工序列
[3124] <220>
[3125] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3126] <400>125
[3127] Ser Lys Phe Lys Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
[3128] 1 5 10 15
[3129] Trp Thr Leu Gln His Ala
[3130] 20
[3131] <210>126
[3132] <211>22
[3133] <212>PRT
[3134] <213> 人工序列
[3135] <220>
[3136] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3137] <400>126
[3138] Gln Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
[3139] 1 5 10 15
[3140] Phe Met Leu Gln Gln Ala
[3141] 20
[3142] <210>127
[3143] <211>22
[3144] <212>PRT
[3145] <213> 人工序列
[3146] <220>
[3147] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3148] <400>127
[3149] Gln Asn Phe Lys Pro Met Asp Glu Leu Glu Asp Thr Leu Tyr Lys Gln
[3150] 1 5 10 15
[3151] Phe Leu Phe Gln His Ser
[3152] 20
[3153] <210>128

- [3154] <211>22
[3155] <212>PRT
[3156] <213> 人工序列
[3157] <220>
[3158] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3159] <400>128
[3160] Tyr Lys Phe Thr Pro Leu Asp Asp Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
[3161] 1 5 10 15
[3162] Trp Thr Leu Gln His Val
[3163] 20
[3164] <210>129
[3165] <211>22
[3166] <212>PRT
[3167] <213> 人工序列
[3168] <220>
[3169] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3170] <400>129
[3171] Gln Glu Tyr Glu Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Thr Leu Tyr Asn Gln
[3172] 1 5 10 15
[3173] Trp Met Phe His Gln Arg
[3174] 20
[3175] <210>130
[3176] <211>22
[3177] <212>PRT
[3178] <213> 人工序列
[3179] <220>
[3180] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3181] <400>130
[3182] Ser Asn Phe Met Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
[3183] 1 5 10 15
[3184] Phe Met Leu Gln His Gln
[3185] 20
[3186] <210>131
[3187] <211>22
[3188] <212>PRT
[3189] <213> 人工序列
[3190] <220>
[3191] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3192] <400>131

- [3193] Gln Lys Tyr Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Lys Thr Leu Tyr Asp Gln
 [3194] 1 5 10 15
 [3195] Phe Met Leu Gln Gln Gly
 [3196] 20
 [3197] <210>132
 [3198] <211>22
 [3199] <212>PRT
 [3200] <213> 人工序列
 [3201] <220>
 [3202] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
 [3203] <400>132
 [3204] Gln Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Lys Gln
 [3205] 1 5 10 15
 [3206] Trp Thr Leu Gln Gln Arg
 [3207] 20
 [3208] <210>133
 [3209] <211>22
 [3210] <212>PRT
 [3211] <213> 人工序列
 [3212] <220>
 [3213] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
 [3214] <400>133
 [3215] Val Lys Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Trp Leu Tyr His Gln
 [3216] 1 5 10 15
 [3217] Phe Thr Leu His His Gln
 [3218] 20
 [3219] <210>134
 [3220] <211>22
 [3221] <212>PRT
 [3222] <213> 人工序列
 [3223] <220>
 [3224] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
 [3225] <400>134
 [3226] Gln Lys Phe Met Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Ile Leu Tyr Glu Gln
 [3227] 1 5 10 15
 [3228] Phe Met Phe Gln Gln Ser
 [3229] 20
 [3230] <210>135
 [3231] <211>22

- [3232] <212>PRT
[3233] <213> 人工序列
[3234] <220>
[3235] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3236] <400>135
[3237] Gln Thr Phe Gln Pro Leu Asp Asp Leu Glu Glu Tyr Leu Tyr Glu Gln
[3238] 1 5 10 15
[3239] Trp Ile Arg Arg Tyr His
[3240] 20
[3241] <210>136
[3242] <211>22
[3243] <212>PRT
[3244] <213> 人工序列
[3245] <220>
[3246] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3247] <400>136
[3248] Glu Asp Tyr Met Pro Leu Asp Ala Leu Asp Ala Gln Leu Tyr Glu Gln
[3249] 1 5 10 15
[3250] Phe Ile Leu Leu His Gly
[3251] 20
[3252] <210>137
[3253] <211>22
[3254] <212>PRT
[3255] <213> 人工序列
[3256] <220>
[3257] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3258] <400>137
[3259] His Thr Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Tyr Gln
[3260] 1 5 10 15
[3261] Trp Leu Tyr Asp Gln Leu
[3262] 20
[3263] <210>138
[3264] <211>22
[3265] <212>PRT
[3266] <213> 人工序列
[3267] <220>
[3268] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3269] <400>138
[3270] Tyr Lys Phe Asn Pro Met Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Glu

[3271]	1	5	10	15
[3272]	Phe Leu Phe Gln His Ala			
[3273]	20			
[3274]	<210>139			
[3275]	<211>22			
[3276]	<212>PRT			
[3277]	<213> 人工序列			
[3278]	<220>			
[3279]	<223> 能结合 Ang-2 的多肽			
[3280]	<400>139			
[3281]	Thr Asn Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Ala Thr Leu Tyr Glu His			
[3282]	1	5	10	15
[3283]	Trp Ile Leu Gln His Ser			
[3284]	20			
[3285]	<210>140			
[3286]	<211>22			
[3287]	<212>PRT			
[3288]	<213> 人工序列			
[3289]	<220>			
[3290]	<223> 能结合 Ang-2 的多肽			
[3291]	<400>140			
[3292]	Gln Lys Phe Lys Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln			
[3293]	1	5	10	15
[3294]	Trp Thr Leu Gln Gln Arg			
[3295]	20			
[3296]	<210>141			
[3297]	<211>22			
[3298]	<212>PRT			
[3299]	<213> 人工序列			
[3300]	<220>			
[3301]	<223> 能结合 Ang-2 的多肽			
[3302]	<400>141			
[3303]	Thr Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Gln Thr Leu Tyr Glu Gln			
[3304]	1	5	10	15
[3305]	Trp Thr Leu Gln Gln Arg			
[3306]	20			
[3307]	<210>142			
[3308]	<211>22			
[3309]	<212>PRT			

- [3310] <213> 人工序列
[3311] <220>
[3312] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3313] <400>142
[3314] Thr Asn Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
[3315] 1 5 10 15
[3316] Trp Thr Leu Gln Gln Arg
[3317] 20
[3318] <210>143
[3319] <211>20
[3320] <212>PRT
[3321] <213> 人工序列
[3322] <220>
[3323] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3324] <400>143
[3325] Ala Gly Gly Met Arg Pro Tyr Asp Gly Met Leu Gly Trp Pro Asn Tyr
[3326] 1 5 10 15
[3327] Asp Val Gln Ala
[3328] 20
[3329] <210>144
[3330] <211>20
[3331] <212>PRT
[3332] <213> 人工序列
[3333] <220>
[3334] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3335] <400>144
[3336] Gln Thr Trp Asp Asp Pro Cys Met His Ile Leu Gly Pro Val Thr Trp
[3337] 1 5 10 15
[3338] Arg Arg Cys Ile
[3339] 20
[3340] <210>145
[3341] <211>20
[3342] <212>PRT
[3343] <213> 人工序列
[3344] <220>
[3345] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3346] <400>145
[3347] Ala Pro Gly Gln Arg Pro Tyr Asp Gly Met Leu Gly Trp Pro Thr Tyr
[3348] 1 5 10 15

- [3349] Gln Arg Ile Val
[3350] 20
[3351] <210>146
[3352] <211>20
[3353] <212>PRT
[3354] <213> 人工序列
[3355] <220>
[3356] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3357] <400>146
[3358] Ser Gly Gln Leu Arg Pro Cys Glu Glu Ile Phe Gly Cys Gly Thr Gln
[3359] 1 5 10 15
[3360] Asn Leu Ala Leu
[3361] 20
[3362] <210>147
[3363] <211>20
[3364] <212>PRT
[3365] <213> 人工序列
[3366] <220>
[3367] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3368] <400>147
[3369] Phe Gly Asp Lys Arg Pro Leu Glu Cys Met Phe Gly Gly Pro Ile Gln
[3370] 1 5 10 15
[3371] Leu Cys Pro Arg
[3372] 20
[3373] <210>148
[3374] <211>20
[3375] <212>PRT
[3376] <213> 人工序列
[3377] <220>
[3378] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3379] <400>148
[3380] Gly Gln Asp Leu Arg Pro Cys Glu Asp Met Phe Gly Cys Gly Thr Lys
[3381] 1 5 10 15
[3382] Asp Trp Tyr Gly
[3383] 20
[3384] <210>149
[3385] <211>20
[3386] <212>PRT
[3387] <213> 人工序列

- [3388] <220>
[3389] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3390] <400>149
[3391] Gly Phe Glu Tyr Cys Asp Gly Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
[3392] 1 5 10 15
[3393] Asp Lys Gln Thr
[3394] 20
[3395] <210>150
[3396] <211>20
[3397] <212>PRT
[3398] <213> 人工序列
[3399] <220>
[3400] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3401] <400>150
[3402] Lys Leu Glu Tyr Cys Asp Gly Met Glu Asp Pro Phe Thr Gln Gly Cys
[3403] 1 5 10 15
[3404] Asp Asn Gln Ser
[3405] 20
[3406] <210>151
[3407] <211>20
[3408] <212>PRT
[3409] <213> 人工序列
[3410] <220>
[3411] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3412] <400>151
[3413] Leu Gln Glu Trp Cys Glu Gly Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
[3414] 1 5 10 15
[3415] Glu Lys Gln Arg
[3416] 20
[3417] <210>152
[3418] <211>20
[3419] <212>PRT
[3420] <213> 人工序列
[3421] <220>
[3422] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
[3423] <400>152
[3424] Ala Gln Asp Tyr Cys Glu Gly Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
[3425] 1 5 10 15
[3426] Glu Met Gln Lys

- [3427] 20
- [3428] <210>153
- [3429] <211>20
- [3430] <212>PRT
- [3431] <213> 人工序列
- [3432] <220>
- [3433] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
- [3434] <400>153
- [3435] Leu Leu Asp Tyr Cys Glu Gly Val Gln Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
- [3436] 1 5 10 15
- [3437] Glu Asn Leu Asp
- [3438] 20
- [3439] <210>154
- [3440] <211>20
- [3441] <212>PRT
- [3442] <213> 人工序列
- [3443] <220>
- [3444] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
- [3445] <400>154
- [3446] His Gln Glu Tyr Cys Glu Gly Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
- [3447] 1 5 10 15
- [3448] Glu Tyr Gln Gly
- [3449] 20
- [3450] <210>155
- [3451] <211>20
- [3452] <212>PRT
- [3453] <213> 人工序列
- [3454] <220>
- [3455] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
- [3456] <400>155
- [3457] Met Leu Asp Tyr Cys Glu Gly Met Asp Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
- [3458] 1 5 10 15
- [3459] Asp Lys Gln Met
- [3460] 20
- [3461] <210>156
- [3462] <211>20
- [3463] <212>PRT
- [3464] <213> 人工序列
- [3465] <220>

- [3466] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
- [3467] <400>156
- [3468] Leu Gln Asp Tyr Cys Glu Gly Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
- [3469] 1 5 10 15
- [3470] Glu Asn Gln Arg
- [3471] 20
- [3472] <210>157
- [3473] <211>20
- [3474] <212>PRT
- [3475] <213> 人工序列
- [3476] <220>
- [3477] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
- [3478] <400>157
- [3479] Leu Gln Asp Tyr Cys Glu Gly Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
- [3480] 1 5 10 15
- [3481] Glu Lys Gln Arg
- [3482] 20
- [3483] <210>158
- [3484] <211>20
- [3485] <212>PRT
- [3486] <213> 人工序列
- [3487] <220>
- [3488] <223> 能结合 Ang-2 的多肽
- [3489] <220>
- [3490] <221>misc_feature
- [3491] <222>(1)..(1)
- [3492] <223>Xaa 不存在或者是中性疏水性, 中性极性, 或碱性氨基酸残基
- [3493] <220>
- [3494] <221>misc_feature
- [3495] <222>(2,4,14)..(19)
- [3496] <223>Xaa 是中性疏水性或中性极性氨基酸残基
- [3497] <220>
- [3498] <221>misc_feature
- [3499] <222>(3,6)..(17)
- [3500] <223>Xaa 是酸性氨基酸残基
- [3501] <220>
- [3502] <221>misc_feature
- [3503] <222>(8)..(8)
- [3504] <223>Xaa 中性疏水性氨基酸残基

- [3505] <220>
- [3506] <221>misc_feature
- [3507] <222>(9)..(9)
- [3508] <223>Xaa 是 E, D, 或 Q
- [3509] <220>
- [3510] <221>misc_feature
- [3511] <222>(18)..(18)
- [3512] <223>Xaa 是中性疏水性, 中性极性, 或碱性氨基酸残基
- [3513] <220>
- [3514] <221>misc_feature
- [3515] <222>(20)..(20)
- [3516] <223>Xaa 不存在或者是氨基酸残基
- [3517] <400>158
- [3518] Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Gly Xaa Xaa Asp Pro Phe Thr Xaa Gly Cys
- [3519] 1 5 10 15
- [3520] Xaa Xaa Xaa Xaa
- [3521] 20
- [3522] <210>159
- [3523] <211>60
- [3524] <212>DNA
- [3525] <213> 人工序列
- [3526] <220>
- [3527] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
- [3528] <400>159
- [3529] ccgatccgtc aggaagaatg cgactgggac ccgtggacct gcgaacacat gtgggaagtt 60
- [3530] <210>160
- [3531] <211>60
- [3532] <212>DNA
- [3533] <213> 人工序列
- [3534] <220>
- [3535] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
- [3536] <400>160
- [3537] accaacatcc aggaagaatg cgaatgggac ccgtggacct gcgaccacat gccgggtaaa 60
- [3538] <210>161
- [3539] <211>60
- [3540] <212>DNA
- [3541] <213> 人工序列
- [3542] <220>
- [3543] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA

- [3544] <400>161
- [3545] tggtacgaac aggacgcttg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat ggctgaagtt 60
- [3546] <210>162
- [3547] <211>60
- [3548] <212>DNA
- [3549] <213> 人工序列
- [3550] <220>
- [3551] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
- [3552] <400>162
- [3553] aaccgtctgc aggaagtttg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat ggaaaacgtt 60
- [3554] <210>163
- [3555] <211>60
- [3556] <212>DNA
- [3557] <213> 人工序列
- [3558] <220>
- [3559] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
- [3560] <400>163
- [3561] gctgctaccc aggaagaatg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat gccgcgttcc 60
- [3562] <210>164
- [3563] <211>60
- [3564] <212>DNA
- [3565] <213> 人工序列
- [3566] <220>
- [3567] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
- [3568] <400>164
- [3569] ctgcgtcacc aggaaggttg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat gttcgactgg 60
- [3570] <210>165
- [3571] <211>60
- [3572] <212>DNA
- [3573] <213> 人工序列
- [3574] <220>
- [3575] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
- [3576] <400>165
- [3577] gttccgcgtc agaaagactg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat gtacgttggt 60
- [3578] <210>166
- [3579] <211>60
- [3580] <212>DNA
- [3581] <213> 人工序列
- [3582] <220>

- [3583] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3584] <400>166
[3585] tgggctgctc aggaagaatg cgaatgggat ccgtggactt gcgaacacat gggtcgtatg 60
[3586] <210>167
[3587] <211>60
[3588] <212>DNA
[3589] <213> 人工序列
[3590] <220>
[3591] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3592] <400>167
[3593] acttggccgc aggacaaatg cgaatgggat ccgtggactt gcgaacacat gggttctact 60
[3594] <210>168
[3595] <211>60
[3596] <212>DNA
[3597] <213> 人工序列
[3598] <220>
[3599] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3600] <400>168
[3601] ggtcactccc aggaagaatg cggttgggac ccgtggacct gcgaacacat gggtagctcc 60
[3602] <210>169
[3603] <211>60
[3604] <212>DNA
[3605] <213> 人工序列
[3606] <220>
[3607] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3608] <400>169
[3609] cagcactggc aggaagaatg cgaatgggac ccgtggacct gcgaccacat gccgtccaaa 60
[3610] <210>170
[3611] <211>60
[3612] <212>DNA
[3613] <213> 人工序列
[3614] <220>
[3615] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3616] <400>170
[3617] aacgttcgctc aggaaaaatg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat gccggttcgt 60
[3618] <210>171
[3619] <211>60
[3620] <212>DNA
[3621] <213> 人工序列

- [3622] <220>
[3623] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3624] <400>171
[3625] aaatccggtc aggttgaatg caactgggac ccgtggacct gcgaacacat gccgcgtaac 60
[3626] <210>172
[3627] <211>60
[3628] <212>DNA
[3629] <213> 人工序列
[3630] <220>
[3631] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3632] <400>172
[3633] gttaaaaccc aggaacactg cgactgggac ccgtggacct gcgaacacat gcgtgaatgg 60
[3634] <210>173
[3635] <211>60
[3636] <212>DNA
[3637] <213> 人工序列
[3638] <220>
[3639] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3640] <400>173
[3641] gcttggggtc aggaaggttg cgactgggac ccgtggacct gcgaacacat gctgccgatg 60
[3642] <210>174
[3643] <211>60
[3644] <212>DNA
[3645] <213> 人工序列
[3646] <220>
[3647] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3648] <400>174
[3649] ccggttaacc aggaagactg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat gccgccgatg 60
[3650] <210>175
[3651] <211>60
[3652] <212>DNA
[3653] <213> 人工序列
[3654] <220>
[3655] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3656] <400>175
[3657] cgtgctccgc aggaagactg cgaatgggac ccgtggacct gcgtcacat ggacatcaaa 60
[3658] <210>176
[3659] <211>60
[3660] <212>DNA

- [3661] <213> 人工序列
[3662] <220>
[3663] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3664] <400>176
[3665] cacggtcaga acatggaatg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat gttccgttac 60
[3666] <210>177
[3667] <211>60
[3668] <212>DNA
[3669] <213> 人工序列
[3670] <220>
[3671] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3672] <400>177
[3673] ccgcgtctgc aggaagaatg cgtttgggac ccgtggacct gcgaacacat gccgctgcgt 60
[3674] <210>178
[3675] <211>60
[3676] <212>DNA
[3677] <213> 人工序列
[3678] <220>
[3679] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3680] <400>178
[3681] cgtaccaccc aggaaaaatg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat ggaatcccag 60
[3682] <210>179
[3683] <211>60
[3684] <212>DNA
[3685] <213> 人工序列
[3686] <220>
[3687] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3688] <400>179
[3689] cagacctccc aggaagactg cgtttgggac ccgtggacct gcgaccacat ggtttcctcc 60
[3690] <210>180
[3691] <211>60
[3692] <212>DNA
[3693] <213> 人工序列
[3694] <220>
[3695] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3696] <400>180
[3697] caggttatcg gtcgtccgtg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacct ggaaggtctg 60
[3698] <210>181
[3699] <211>60

- [3700] <212>DNA
[3701] <213> 人工序列
[3702] <220>
[3703] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3704] <400>181
[3705] tgggctcagc aggaagaatg cgcttgggac ccgtggacct gcgaccacat ggttggtctg 60
[3706] <210>182
[3707] <211>60
[3708] <212>DNA
[3709] <213> 人工序列
[3710] <220>
[3711] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3712] <400>182
[3713] ctgccgggctc aggaagactg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat ggttcgttcc 60
[3714] <210>183
[3715] <211>60
[3716] <212>DNA
[3717] <213> 人工序列
[3718] <220>
[3719] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3720] <400>183
[3721] ccgatgaacc aggttgaatg cgactgggac ccgtggacct gcgaacacat gccgcgttcc 60
[3722] <210>184
[3723] <211>60
[3724] <212>DNA
[3725] <213> 人工序列
[3726] <220>
[3727] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3728] <400>184
[3729] ttcggttggt ctcacggttg cgaatgggat ccgtggactt gcgaacacat gggttctacc 60
[3730] <210>185
[3731] <211>60
[3732] <212>DNA
[3733] <213> 人工序列
[3734] <220>
[3735] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3736] <400>185
[3737] aaatccaccc aggacgactg cgactgggac ccgtggacct gcgaacacat ggttggtccg 60
[3738] <210>186

- [3739] <211>60
[3740] <212>DNA
[3741] <213> 人工序列
[3742] <220>
[3743] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3744] <400>186
[3745] ggtccgcgta tctccacctg ccagtgggac ccgtggacct gcgaacacat ggaccagctg 60
[3746] <210>187
[3747] <211>60
[3748] <212>DNA
[3749] <213> 人工序列
[3750] <220>
[3751] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3752] <400>187
[3753] tccaccatcg gtgacatgtg cgaatgggac ccgtggacct gcgctcacat gcaggttgac 60
[3754] <210>188
[3755] <211>60
[3756] <212>DNA
[3757] <213> 人工序列
[3758] <220>
[3759] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3760] <400>188
[3761] gttctgggtg gtcagggttg cgaatgggac ccgtggacct gccgtctgct gcagggttgg 60
[3762] <210>189
[3763] <211>60
[3764] <212>DNA
[3765] <213> 人工序列
[3766] <220>
[3767] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3768] <400>189
[3769] gttctgggtg gtcagggttg ccagtgggac ccgtggacct gtcgccacct ggaagacggt 60
[3770] <210>190
[3771] <211>60
[3772] <212>DNA
[3773] <213> 人工序列
[3774] <220>
[3775] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3776] <400>190
[3777] accaccatcg gttccatgtg cgaatgggac ccgtggacct gcgctcacat gcagggtggt 60

- [3778] <210>191
[3779] <211>60
[3780] <212>DNA
[3781] <213> 人工序列
[3782] <220>
[3783] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3784] <400>191
[3785] accaaaggta aatccgtttg ccagtgggac ccgtggacct gctcccacat gcagtccggt 60
[3786] <210>192
[3787] <211>60
[3788] <212>DNA
[3789] <213> 人工序列
[3790] <220>
[3791] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3792] <400>192
[3793] accaccatcg gttccatgtg ccagtgggac ccgtggacct gcgctcacat gcagggtggt 60
[3794] <210>193
[3795] <211>60
[3796] <212>DNA
[3797] <213> 人工序列
[3798] <220>
[3799] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3800] <400>193
[3801] tgggttaacg aagttgtttg cgaatgggac ccgtggacct gcaaccactg ggacaccccg 60
[3802] <210>194
[3803] <211>60
[3804] <212>DNA
[3805] <213> 人工序列
[3806] <220>
[3807] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3808] <400>194
[3809] gttgttcagg ttggtatgtg ccagtgggac ccgtggacct gcaaacacat gcgtctgcag 60
[3810] <210>195
[3811] <211>60
[3812] <212>DNA
[3813] <213> 人工序列
[3814] <220>
[3815] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[3816] <400>195

- [3817] gctgttggtt cccagacctg cgaatgggac ccgtggacct gcgctcacct ggttgaagtt 60
- [3818] <210>196
- [3819] <211>60
- [3820] <212>DNA
- [3821] <213> 人工序列
- [3822] <220>
- [3823] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
- [3824] <400>196
- [3825] cagggtatga aaatgttctg cgaatgggac ccgtggacct gcgctcacat cgtttaccgt 60
- [3826] <210>197
- [3827] <211>60
- [3828] <212>DNA
- [3829] <213> 人工序列
- [3830] <220>
- [3831] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
- [3832] <400>197
- [3833] accaccatcg gttccatgtg ccagtgggac ccgtggacct gcgaacacat gcagggtggt 60
- [3834] <210>198
- [3835] <211>60
- [3836] <212>DNA
- [3837] <213> 人工序列
- [3838] <220>
- [3839] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
- [3840] <400>198
- [3841] acctcccagc gtgttggttg cgaatgggac ccgtggacct gccagcacct gacctacacc 60
- [3842] <210>199
- [3843] <211>60
- [3844] <212>DNA
- [3845] <213> 人工序列
- [3846] <220>
- [3847] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
- [3848] <400>199
- [3849] cagtggtcct ggccgccgtg cgaatgggac ccgtggacct gccagaccgt ttggccgtcc 60
- [3850] <210>200
- [3851] <211>60
- [3852] <212>DNA
- [3853] <213> 人工序列
- [3854] <220>
- [3855] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA

[3856]	<400>200	
[3857]	ggtacctccc cgtccttctg ccagtgggac ccgtggacct gctcccacat ggttcagggt	60
[3858]	<210>201	
[3859]	<211>42	
[3860]	<212>DNA	
[3861]	<213> 人工序列	
[3862]	<220>	
[3863]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA	
[3864]	<400>201	
[3865]	caggaagaat gcgaatggga cccatggact tgccaacaca tg	42
[3866]	<210>202	
[3867]	<211>66	
[3868]	<212>DNA	
[3869]	<213> 人工序列	
[3870]	<220>	
[3871]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA	
[3872]	<400>202	
[3873]	cagaactaca aaccgctgga cgaactggac gctaccctgt acgaacactt catcttccac	60
[3874]	tacacc	66
[3875]	<210>203	
[3876]	<211>66	
[3877]	<212>DNA	
[3878]	<213> 人工序列	
[3879]	<220>	
[3880]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA	
[3881]	<400>203	
[3882]	ctgaacttca ccccgtgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag	60
[3883]	cagtcc	66
[3884]	<210>204	
[3885]	<211>66	
[3886]	<212>DNA	
[3887]	<213> 人工序列	
[3888]	<220>	
[3889]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA	
[3890]	<400>204	
[3891]	accaaattca acccgtgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag	60
[3892]	caccag	66
[3893]	<210>205	
[3894]	<211>66	

[3895]	<212>DNA	
[3896]	<213> 人工序列	
[3897]	<220>	
[3898]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA	
[3899]	<400>205	
[3900]	gttaaattca aaccgctgga cgctctggaa cagaccctgt acgaacactg gatgttccag	60
[3901]	caggct	66
[3902]	<210>206	
[3903]	<211>66	
[3904]	<212>DNA	
[3905]	<213> 人工序列	
[3906]	<220>	
[3907]	<223> 编码能结合 Aug-2 的肽的 DNA	
[3908]	<400>206	
[3909]	gttaaataca aaccgctgga cgaactggac gaaatcctgt acgaacagca gaccttccag	60
[3910]	gaacgt	66
[3911]	<210>207	
[3912]	<211>66	
[3913]	<212>DNA	
[3914]	<213> 人工序列	
[3915]	<220>	
[3916]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA	
[3917]	<400>207	
[3918]	accaacttca tgccgatgga cgacctggaa cagcgtctgt acgaacagtt catcctgcag	60
[3919]	cagggt	66
[3920]	<210>208	
[3921]	<211>66	
[3922]	<212>DNA	
[3923]	<213> 人工序列	
[3924]	<220>	
[3925]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA	
[3926]	<400>208	
[3927]	tccaaattca aaccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtg gacctgcag	60
[3928]	cacgt	66
[3929]	<210>209	
[3930]	<211>66	
[3931]	<212>DNA	
[3932]	<213> 人工序列	
[3933]	<220>	

[3934]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA	
[3935]	<400>209	
[3936]	cagaaattcc agccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtt catgctgcag	60
[3937]	caggct	66
[3938]	<210>210	
[3939]	<211>66	
[3940]	<212>DNA	
[3941]	<213> 人工序列	
[3942]	<220>	
[3943]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA	
[3944]	<400>210	
[3945]	cagaacttca aaccgatgga cgaattggaa gacaccctgt acaaacagtt cctgttccag	60
[3946]	cactcc	66
[3947]	<210>211	
[3948]	<211>66	
[3949]	<212>DNA	
[3950]	<213> 人工序列	
[3951]	<220>	
[3952]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA	
[3953]	<400>211	
[3954]	tacaaattca ccccgctgga cgacctggaa cagaccctgt acgaacagtg gacctgcag	60
[3955]	cacgtt	66
[3956]	<210>212	
[3957]	<211>65	
[3958]	<212>DNA	
[3959]	<213> 人工序列	
[3960]	<220>	
[3961]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA	
[3962]	<400>212	
[3963]	aggaatacga accgctggac gaactggacg aaacctgta caaccagtgg atgttccacc	60
[3964]	agcgt	65
[3965]	<210>213	
[3966]	<211>66	
[3967]	<212>DNA	
[3968]	<213> 人工序列	
[3969]	<220>	
[3970]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA	
[3971]	<400>213	
[3972]	tccaacttca tgccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtt catgctgcag	60

[3973]	caccag	66
[3974]	<210>214	
[3975]	<211>66	
[3976]	<212>DNA	
[3977]	<213> 人工序列	
[3978]	<220>	
[3979]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA	
[3980]	<400>214	
[3981]	cagaaatacc agccgctgga cgaactggac aaaaccctgt acgatcagtt catgctgcag	60
[3982]	cagggt	66
[3983]	<210>215	
[3984]	<211>66	
[3985]	<212>DNA	
[3986]	<213> 人工序列	
[3987]	<220>	
[3988]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA	
[3989]	<400>215	
[3990]	cagaaattcc agccgctgga cgaactggaa gaaaccctgt acaaacagtg gaccctgcag	60
[3991]	cagcgt	66
[3992]	<210>216	
[3993]	<211>66	
[3994]	<212>DNA	
[3995]	<213> 人工序列	
[3996]	<220>	
[3997]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA	
[3998]	<400>216	
[3999]	gttaaataca aaccgctgga cgaactggac gaatggctgt accaccagtt caccctgcac	60
[4000]	caccag	66
[4001]	<210>217	
[4002]	<211>67	
[4003]	<212>DNA	
[4004]	<213> 人工序列	
[4005]	<220>	
[4006]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA	
[4007]	<400>217	
[4008]	cagaaattca tgccgctgga cgaactggac gaaatcctgt acgaacagtt catgttccag	60
[4009]	cagtccc	67
[4010]	<210>218	
[4011]	<211>66	

[4012]	<212>DNA	
[4013]	<213> 人工序列	
[4014]	<220>	
[4015]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA	
[4016]	<400>218	
[4017]	cagaccttcc agccgctgga cgacctggaa gaatacttgt acgaacagtg gatccgtcgt	60
[4018]	taccac	66
[4019]	<210>219	
[4020]	<211>66	
[4021]	<212>DNA	
[4022]	<213> 人工序列	
[4023]	<220>	
[4024]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA	
[4025]	<400>219	
[4026]	gaagactaca tgccgctgga cgctctggac gctcagctgt acgaacagtt catcctgctg	60
[4027]	cacggt	66
[4028]	<210>220	
[4029]	<211>66	
[4030]	<212>DNA	
[4031]	<213> 人工序列	
[4032]	<220>	
[4033]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA	
[4034]	<400>220	
[4035]	cacaccttcc agccgctgga cgaactggaa gaaacctgt actaccagtg gctgtacgac	60
[4036]	cagctg	66
[4037]	<210>221	
[4038]	<211>66	
[4039]	<212>DNA	
[4040]	<213> 人工序列	
[4041]	<220>	
[4042]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA	
[4043]	<400>221	
[4044]	tacaaattca acccgatgga cgaactggaa cagacctgt acgaagaatt cctgttccag	60
[4045]	cacgct	66
[4046]	<210>222	
[4047]	<211>66	
[4048]	<212>DNA	
[4049]	<213> 人工序列	
[4050]	<220>	

[4051]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA	
[4052]	<400>222	
[4053]	accaactaca aaccgctgga cgaactggac gctaccctgt acgaacactg gatcctgcag	60
[4054]	cactcc	66
[4055]	<210>223	
[4056]	<211>66	
[4057]	<212>DNA	
[4058]	<213> 人工序列	
[4059]	<220>	
[4060]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA	
[4061]	<400>223	
[4062]	cagaaattca aaccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag	60
[4063]	cagcgt	66
[4064]	<210>224	
[4065]	<211>66	
[4066]	<212>DNA	
[4067]	<213> 人工序列	
[4068]	<220>	
[4069]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA	
[4070]	<400>224	
[4071]	accaaattcc agccgctgga cgaactggac cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag	60
[4072]	cagcgt	66
[4073]	<210>225	
[4074]	<211>66	
[4075]	<212>DNA	
[4076]	<213> 人工序列	
[4077]	<220>	
[4078]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA	
[4079]	<400>225	
[4080]	accaacttcc agccgctgga cgaactggac cagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag	60
[4081]	cagcgt	66
[4082]	<210>226	
[4083]	<211>60	
[4084]	<212>DNA	
[4085]	<213> 人工序列	
[4086]	<220>	
[4087]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA	
[4088]	<400>226	
[4089]	aaattcaacc cgctggacga gctggaagag actctgtacg aacagtttac ttttcaacag	60

- [4090] <210>227
[4091] <211>60
[4092] <212>DNA
[4093] <213> 人工序列
[4094] <220>
[4095] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[4096] <400>227
[4097] gctggtggta tgcgtccgta cgacggtatg ctgggttggc cgaactacga cgttcaggct 60
[4098] <210>228
[4099] <211>60
[4100] <212>DNA
[4101] <213> 人工序列
[4102] <220>
[4103] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[4104] <400>228
[4105] cagacttggg acgatccgtg catgcacatt ctgggtccgg ttacttggcg tcgttgcatac 60
[4106] <210>229
[4107] <211>60
[4108] <212>DNA
[4109] <213> 人工序列
[4110] <220>
[4111] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[4112] <400>229
[4113] gctccgggtc agcgtccgta cgacggtatg ctgggttggc cgacctacca gcgtatcggtt 60
[4114] <210>230
[4115] <211>60
[4116] <212>DNA
[4117] <213> 人工序列
[4118] <220>
[4119] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[4120] <400>230
[4121] tccggtcagc tgcgtccgtg cgaagaaatc ttcggttgcg gtacccagaa cctggctctg 60
[4122] <210>231
[4123] <211>60
[4124] <212>DNA
[4125] <213> 人工序列
[4126] <220>
[4127] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[4128] <400>231

- [4129] ttcggtgaca aacgtccgct ggaatgcatg ttcggttggtc cgatccagct gtgcccgcgt 60
- [4130] <210>232
- [4131] <211>60
- [4132] <212>DNA
- [4133] <213> 人工序列
- [4134] <220>
- [4135] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
- [4136] <400>232
- [4137] ggtcaggacc tgcgtccgtg cgaagacatg ttcggttggtc gtaccaaaga ctggtacggt 60
- [4138] <210>233
- [4139] <211>60
- [4140] <212>DNA
- [4141] <213> 人工序列
- [4142] <220>
- [4143] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
- [4144] <400>233
- [4145] ggtttcgaat actgcgacgg tatggaagac ccgttcacct tcggttgcca caaacagacc 60
- [4146] <210>234
- [4147] <211>60
- [4148] <212>DNA
- [4149] <213> 人工序列
- [4150] <220>
- [4151] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
- [4152] <400>234
- [4153] aaactggaat actgcgacgg tatggaagac ccgttcaccc agggttgcga caaccagtcc 60
- [4154] <210>235
- [4155] <211>60
- [4156] <212>DNA
- [4157] <213> 人工序列
- [4158] <220>
- [4159] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
- [4160] <400>235
- [4161] ctgcaggaat ggtgcgaagg tgttgaagac ccgttcacct tcggttgcca aaaacagcgt 60
- [4162] <210>236
- [4163] <211>60
- [4164] <212>DNA
- [4165] <213> 人工序列
- [4166] <220>
- [4167] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA

- [4168] <400>236
[4169] gctcaggact actgcgaagg tatggaagac ccgttcacct tcggttgcca aatgcagaaa 60
[4170] <210>237
[4171] <211>60
[4172] <212>DNA
[4173] <213> 人工序列
[4174] <220>
[4175] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[4176] <400>237
[4177] ctgctggact actgcgaagg tgttcaggac ccgttcacct tcggttgcca aaacctggac 60
[4178] <210>238
[4179] <211>60
[4180] <212>DNA
[4181] <213> 人工序列
[4182] <220>
[4183] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[4184] <400>238
[4185] caccaggaat actgcgaagg tatggaagac ccgttcacct tcggttgcca ataccagggt 60
[4186] <210>239
[4187] <211>60
[4188] <212>DNA
[4189] <213> 人工序列
[4190] <220>
[4191] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[4192] <400>239
[4193] atgctggact actgcgaagg tatggacgac ccgttcacct tcggttgcca caaacagatg 60
[4194] <210>240
[4195] <211>60
[4196] <212>DNA
[4197] <213> 人工序列
[4198] <220>
[4199] <223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA
[4200] <400>240
[4201] ctgcaggact actgcgaagg tgttgaagac ccgttcacct tcggttgcca aaaccagcgt 60
[4202] <210>241
[4203] <211>60
[4204] <212>DNA
[4205] <213> 人工序列
[4206] <220>

[4207]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA	
[4208]	<400>241	
[4209]	ctgcaggact actgcgaagg tgttgaagac ccgttcacct tcggttgcca aaaacagcgt	60
[4210]	<210>242	
[4211]	<211>54	
[4212]	<212>DNA	
[4213]	<213> 人工序列	
[4214]	<220>	
[4215]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA	
[4216]	<400>242	
[4217]	ttcgactact gcgaaggtgt tgaagaccgc ttcactttcg gctgtgataa ccac	54
[4218]	<210>243	
[4219]	<211>250	
[4220]	<212>PRT	
[4221]	<213> 人工序列	
[4222]	<220>	
[4223]	<223> 编码能结合 Ang-2 的肽的 DNA	
[4224]	<400>243	
[4225]	Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu	
[4226]	1 5 10 15	
[4227]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu	
[4228]	20 25 30	
[4229]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser	
[4230]	35 40 45	
[4231]	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu	
[4232]	50 55 60	
[4233]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr	
[4234]	65 70 75 80	
[4235]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn	
[4236]	85 90 95	
[4237]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro	
[4238]	100 105 110	
[4239]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln	
[4240]	115 120 125	
[4241]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val	
[4242]	130 135 140	
[4243]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val	
[4244]	145 150 155 160	
[4245]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro	

[4246]	165	170	175
[4247]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		
[4248]	180	185	190
[4249]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
[4250]	195	200	205
[4251]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
[4252]	210	215	220
[4253]	Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Cys Thr Ala Gly Tyr His Trp		
[4254]	225	230	235
[4255]	Asn Ser Asp Cys Glu Cys Cys Arg Arg Asn		
[4256]	245	250	
[4257]	<210>244		
[4258]	<211>29		
[4259]	<212>DNA		
[4260]	<213> 人工序列		
[4261]	<220>		
[4262]	<223> 寡核苷酸		
[4263]	<400>244		
[4264]	caaacgaatg gatcctcatt aaagccaga		29
[4265]	<210>245		
[4266]	<211>42		
[4267]	<212>DNA		
[4268]	<213> 人工序列		
[4269]	<220>		
[4270]	<223> 寡核苷酸		
[4271]	<400>245		
[4272]	ggtggtgcgg ccgcactcga gactgttgaa agttgttttag ca		42
[4273]	<210>246		
[4274]	<211>29		
[4275]	<212>DNA		
[4276]	<213> 人工序列		
[4277]	<220>		
[4278]	<223> 寡核苷酸		
[4279]	<400>246		
[4280]	caaacgaatg gatcctcatt aaagccaga		29
[4281]	<210>247		
[4282]	<211>43		
[4283]	<212>DNA		
[4284]	<213> 人工序列		

- [4285] <220>
- [4286] <223> 寡核苷酸
- [4287] <400>247
- [4288] aacacaaaag tgcacagggt ggaggtggtg gtgcggccgc act 43
- [4289] <210>248
- [4290] <211>91
- [4291] <212>PRT
- [4292] <213> 人工序列
- [4293] <220>
- [4294] <223> 寡核苷酸
- [4295] <400>248
- [4296] Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn
- [4297] 1 5 10 15
- [4298] Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn
- [4299] 20 25 30
- [4300] Lys Asn Asn Lys Ser Ala Arg Thr Gly Gly Gly Ala Thr Cys Cys Gly
- [4301] 35 40 45
- [4302] Thr Gly Gly Ala Ser Cys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn
- [4303] 50 55 60
- [4304] Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Cys Ala Thr Thr Cys
- [4305] 65 70 75 80
- [4306] Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala
- [4307] 85 90
- [4308] <210>249
- [4309] <211>91
- [4310] <212>PRT
- [4311] <213> 人工序列
- [4312] <220>
- [4313] <223> 寡核苷酸
- [4314] <400>249
- [4315] Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn
- [4316] 1 5 10 15
- [4317] Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Ala Ala Lys Cys Gly Lys Cys Cys
- [4318] 20 25 30
- [4319] Lys Asn Asn Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys Ala Thr Lys Thr Thr Lys
- [4320] 35 40 45
- [4321] Gly Gly Lys Gly Gly Lys Asn Asn Lys Ala Cys Lys Thr Ala Lys Cys
- [4322] 50 55 60
- [4323] Ala Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Cys Ala Thr Thr Cys

[4324]	65	70	75	80
[4325]	Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala			
[4326]		85	90	
[4327]	<210>250			
[4328]	<211>95			
[4329]	<212>PRT			
[4330]	<213> 人工序列			
[4331]	<220>			
[4332]	<223> 寡核苷酸			
[4333]	<400>250			
[4334]	Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn			
[4335]	1	5	10	15
[4336]	Asn Lys Ala Ala Lys Thr Thr Lys Ala Ala Lys Cys Cys Lys Cys Thr			
[4337]		20	25	30
[4338]	Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys Cys Thr Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys			
[4339]		35	40	45
[4340]	Ala Cys Lys Cys Thr Lys Thr Ala Lys Gly Ala Lys Cys Ala Lys Thr			
[4341]		50	55	60
[4342]	Thr Lys Ala Cys Lys Thr Thr Lys Cys Ala Lys Cys Ala Lys Asn Asn			
[4343]	65	70	75	80
[4344]	Lys Cys Ala Thr Thr Cys Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr			
[4345]		85	90	95
[4346]	<210>251			
[4347]	<211>91			
[4348]	<212>PRT			
[4349]	<213> 人工序列			
[4350]	<220>			
[4351]	<223> 寡核苷酸			
[4352]	<400>251			
[4353]	Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn			
[4354]	1	5	10	15
[4355]	Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Cys Ala Lys Gly Ala Lys Gly Ala			
[4356]		20	25	30
[4357]	Lys Thr Gly Cys Gly Ala Lys Thr Gly Lys Gly Ala Lys Cys Cys Lys			
[4358]		35	40	45
[4359]	Thr Gly Lys Ala Cys Lys Thr Gly Cys Gly Ala Lys Cys Ala Lys Ala			
[4360]		50	55	60
[4361]	Thr Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Cys Ala Thr Thr Cys			
[4362]	65	70	75	80

[4363] Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala
 [4364] 85 90
 [4365] <210>252
 [4366] <211>89
 [4367] <212>PRT
 [4368] <213> 人工序列
 [4369] <220>
 [4370] <223> 寡核苷酸
 [4371] <400>252
 [4372] Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn
 [4373] 1 5 10 15
 [4374] Asn Lys Thr Thr Lys Gly Ala Lys Thr Ala Lys Asn Asn Lys Gly Ala
 [4375] 20 25 30
 [4376] Lys Gly Gly Lys Gly Thr Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys Cys Cys Lys
 [4377] 35 40 45
 [4378] Thr Thr Lys Ala Cys Lys Thr Thr Lys Gly Gly Lys Asn Asn Lys Gly
 [4379] 50 55 60
 [4380] Ala Lys Ala Ala Lys Cys Ala Lys Asn Asn Lys Cys Ala Thr Thr Cys
 [4381] 65 70 75 80
 [4382] Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr
 [4383] 85
 [4384] <210>253
 [4385] <211>95
 [4386] <212>PRT
 [4387] <213> 人工序列
 [4388] <220>
 [4389] <223> 寡核苷酸
 [4390] <400>253
 [4391] Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn
 [4392] 1 5 10 15
 [4393] Asn Lys Ala Ala Lys Thr Thr Lys Ala Ala Lys Cys Cys Lys Cys Thr
 [4394] 20 25 30
 [4395] Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys Cys Thr Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys
 [4396] 35 40 45
 [4397] Ala Cys Lys Cys Thr Lys Thr Ala Lys Gly Ala Lys Cys Ala Lys Thr
 [4398] 50 55 60
 [4399] Thr Lys Ala Cys Lys Thr Thr Lys Cys Ala Lys Cys Ala Lys Asn Asn
 [4400] 65 70 75 80
 [4401] Lys Cys Ala Thr Thr Cys Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr

[4402]		85	90	95
[4403]	<210>254			
[4404]	<211>15			
[4405]	<212>DNA			
[4406]	<213> 人工序列			
[4407]	<220>			
[4408]	<223> 寡核苷酸			
[4409]	<400>254			
[4410]	cacagtgcac aggggt			15
[4411]	<210>255			
[4412]	<211>16			
[4413]	<212>DNA			
[4414]	<213> 人工序列			
[4415]	<220>			
[4416]	<223> 寡核苷酸			
[4417]	<400>255			
[4418]	tgatctcgag agaattg			16
[4419]	<210>256			
[4420]	<211>21			
[4421]	<212>DNA			
[4422]	<213> 人工序列			
[4423]	<220>			
[4424]	<223> 寡核苷酸			
[4425]	<400>256			
[4426]	gttagctcac tcattaggca c			21
[4427]	<210>257			
[4428]	<211>21			
[4429]	<212>DNA			
[4430]	<213> 人工序列			
[4431]	<220>			
[4432]	<223> 寡核苷酸			
[4433]	<400>257			
[4434]	gtaccgtaac actgagtttc g			21
[4435]	<210>258			
[4436]	<211>18			
[4437]	<212>DNA			
[4438]	<213> 人工序列			
[4439]	<220>			
[4440]	<223> 寡核苷酸			

- [4441] <400>258
[4442] ttacacttta tgcttcg 18
[4443] <210>259
[4444] <211>31
[4445] <212>PRT
[4446] <213> 人工序列
[4447] <220>
[4448] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[4449] <220>
[4450] <221>misc_feature
[4451] <222>(2)..(2)
[4452] <223>Xaa = Fc
[4453] <400>259
[4454] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Pro Ile Arg Gln Glu Glu Cys
[4455] 1 5 10 15
[4456] Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Trp Glu Val Leu Glu
[4457] 20 25 30
[4458] <210>260
[4459] <211>31
[4460] <212>PRT
[4461] <213> 人工序列
[4462] <220>
[4463] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[4464] <220>
[4465] <221>misc_feature
[4466] <222>(2)..(2)
[4467] <223>Xaa = Fc
[4468] <400>260
[4469] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Asn Ile Gln Glu Glu Cys
[4470] 1 5 10 15
[4471] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His Met Pro Gly Lys Leu Glu
[4472] 20 25 30
[4473] <210>261
[4474] <211>31
[4475] <212>PRT
[4476] <213> 人工序列
[4477] <220>
[4478] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[4479] <220>

[4480] <221>misc_feature
[4481] <222>(2)..(2)
[4482] <223>Xaa = Fc
[4483] <400>261
[4484] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Tyr Glu Gln Asp Ala Cys
[4485] 1 5 10 15
[4486] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Ala Glu Val Leu Glu
[4487] 20 25 30
[4488] <210>262
[4489] <211>31
[4490] <212>PRT
[4491] <213> 人工序列
[4492] <220>
[4493] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[4494] <220>
[4495] <221>misc_feature
[4496] <222>(2)..(2)
[4497] <223>Xaa = Fc
[4498] <400>262
[4499] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Asn Arg Leu Gln Glu Val Cys
[4500] 1 5 10 15
[4501] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Glu Asn Val Leu Glu
[4502] 20 25 30
[4503] <210>263
[4504] <211>31
[4505] <212>PRT
[4506] <213> 人工序列
[4507] <220>
[4508] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[4509] <220>
[4510] <221>misc_feature
[4511] <222>(2)..(2)
[4512] <223>Xaa = Fc
[4513] <400>263
[4514] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Ala Thr Gln Glu Glu Cys
[4515] 1 5 10 15
[4516] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Arg Ser Leu Glu
[4517] 20 25 30
[4518] <210>264

- [4519] <211>31
[4520] <212>PRT
[4521] <213> 人工序列
[4522] <220>
[4523] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[4524] <220>
[4525] <221>misc_feature
[4526] <222>(2).. (2)
[4527] <223>Xaa = Fc
[4528] <400>264
[4529] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Arg His Gln Glu Gly Cys
[4530] 1 5 10 15
[4531] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Phe Asp Trp Leu Glu
[4532] 20 25 30
[4533] <210>265
[4534] <211>31
[4535] <212>PRT
[4536] <213> 人工序列
[4537] <220>
[4538] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[4539] <220>
[4540] <221>misc_feature
[4541] <222>(2).. (2)
[4542] <223>Xaa = Fc
[4543] <400>265
[4544] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Pro Arg Gln Lys Asp Cys
[4545] 1 5 10 15
[4546] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Tyr Val Gly Leu Glu
[4547] 20 25 30
[4548] <210>266
[4549] <211>31
[4550] <212>PRT
[4551] <213> 人工序列
[4552] <220>
[4553] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[4554] <220>
[4555] <221>misc_feature
[4556] <222>(2).. (2)
[4557] <223>Xaa = Fc

- [4558] <400>266
[4559] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ser Ile Ser His Glu Glu Cys
[4560] 1 5 10 15
[4561] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gln Val Gly Leu Glu
[4562] 20 25 30
[4563] <210>267
[4564] <211>31
[4565] <212>PRT
[4566] <213> 人工序列
[4567] <220>
[4568] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[4569] <220>
[4570] <221>misc_feature
[4571] <222>(2)..(2)
[4572] <223>Xaa = Fc
[4573] <400>267
[4574] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Ala Ala Gln Glu Glu Cys
[4575] 1 5 10 15
[4576] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Arg Met Leu Glu
[4577] 20 25 30
[4578] <210>268
[4579] <211>31
[4580] <212>PRT
[4581] <213> 人工序列
[4582] <220>
[4583] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[4584] <220>
[4585] <221>misc_feature
[4586] <222>(2)..(2)
[4587] <223>Xaa = Fc
[4588] <400>268
[4589] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Trp Pro Gln Asp Lys Cys
[4590] 1 5 10 15
[4591] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Ser Thr Leu Glu
[4592] 20 25 30
[4593] <210>269
[4594] <211>31
[4595] <212>PRT
[4596] <213> 人工序列

- [4597] <220>
- [4598] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
- [4599] <220>
- [4600] <221>misc_feature
- [4601] <222>(2).. (2)
- [4602] <223>Xaa = Fc
- [4603] <400>269
- [4604] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly His Ser Gln Glu Glu Cys
- [4605] 1 5 10 15
- [4606] Gly Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Thr Ser Leu Glu
- [4607] 20 25 30
- [4608] <210>270
- [4609] <211>31
- [4610] <212>PRT
- [4611] <213> 人工序列
- [4612] <220>
- [4613] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
- [4614] <220>
- [4615] <221>misc_feature
- [4616] <222>(2).. (2)
- [4617] <223>Xaa = Fc
- [4618] <400>270
- [4619] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln His Trp Gln Glu Glu Cys
- [4620] 1 5 10 15
- [4621] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His Met Pro Ser Lys Leu Glu
- [4622] 20 25 30
- [4623] <210>271
- [4624] <211>31
- [4625] <212>PRT
- [4626] <213> 人工序列
- [4627] <220>
- [4628] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
- [4629] <220>
- [4630] <221>misc_feature
- [4631] <222>(2).. (2)
- [4632] <223>Xaa = Fc
- [4633] <400>271
- [4634] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Asn Val Arg Gln Glu Lys Cys
- [4635] 1 5 10 15

[4636] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Val Arg Leu Glu
 [4637] 20 25 30
 [4638] <210>272
 [4639] <211>31
 [4640] <212>PRT
 [4641] <213> 人工序列
 [4642] <220>
 [4643] <223> 能结合 Aug-2 的肽抗体
 [4644] <220>
 [4645] <221>misc_feature
 [4646] <222>(2)..(2)
 [4647] <223>Xaa = Fc
 [4648] <400>272
 [4649] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Ser Gly Gln Val Glu Cys
 [4650] 1 5 10 15
 [4651] Asn Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Arg Asn Leu Glu
 [4652] 20 25 30
 [4653] <210>273
 [4654] <211>31
 [4655] <212>PRT
 [4656] <213> 人工序列
 [4657] <220>
 [4658] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
 [4659] <220>
 [4660] <221>misc_feature
 [4661] <222>(2)..(2)
 [4662] <223>Xaa = Fc
 [4663] <400>273
 [4664] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Lys Thr Gln Glu His Cys
 [4665] 1 5 10 15
 [4666] Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Arg Glu Trp Leu Glu
 [4667] 20 25 30
 [4668] <210>274
 [4669] <211>31
 [4670] <212>PRT
 [4671] <213> 人工序列
 [4672] <220>
 [4673] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
 [4674] <220>

- [4675] <221>misc_feature
 [4676] <222>(2)..(2)
 [4677] <223>Xaa = Fc
 [4678] <400>274
 [4679] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Trp Gly Gln Glu Gly Cys
 [4680] 1 5 10 15
 [4681] Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Leu Pro Met Leu Glu
 [4682] 20 25 30
 [4683] <210>275
 [4684] <211>31
 [4685] <212>PRT
 [4686] <213> 人工序列
 [4687] <220>
 [4688] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
 [4689] <220>
 [4690] <221>misc_feature
 [4691] <222>(2)..(2)
 [4692] <223>Xaa = Fc
 [4693] <400>275
 [4694] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Pro Val Asn Gln Glu Asp Cys
 [4695] 1 5 10 15
 [4696] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Pro Met Leu Glu
 [4697] 20 25 30
 [4698] <210>276
 [4699] <211>31
 [4700] <212>PRT
 [4701] <213> 人工序列
 [4702] <220>
 [4703] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
 [4704] <220>
 [4705] <221>misc_feature
 [4706] <222>(2)..(2)
 [4707] <223>Xaa = Fc
 [4708] <400>276
 [4709] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Arg Ala Pro Gln Glu Asp Cys
 [4710] 1 5 10 15
 [4711] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Met Asp Ile Lys Leu Glu
 [4712] 20 25 30
 [4713] <210>277

- [4714] <211>31
[4715] <212>PRT
[4716] <213> 人工序列
[4717] <220>
[4718] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[4719] <220>
[4720] <221>misc_feature
[4721] <222>(2).. (2)
[4722] <223>Xaa = Fc
[4723] <400>277
[4724] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln His Gly Gln Asn Met Glu Cys
[4725] 1 5 10 15
[4726] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Phe Arg Tyr Leu Glu
[4727] 20 25 30
[4728] <210>278
[4729] <211>31
[4730] <212>PRT
[4731] <213> 人工序列
[4732] <220>
[4733] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[4734] <220>
[4735] <221>misc_feature
[4736] <222>(2).. (2)
[4737] <223>Xaa = Fc
[4738] <400>278
[4739] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Pro Arg Leu Gln Glu Glu Cys
[4740] 1 5 10 15
[4741] Val Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Leu Arg Leu Glu
[4742] 20 25 30
[4743] <210>279
[4744] <211>31
[4745] <212>PRT
[4746] <213> 人工序列
[4747] <220>
[4748] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[4749] <220>
[4750] <221>misc_feature
[4751] <222>(2).. (2)
[4752] <223>Xaa = Fc

- [4753] <400>279
[4754] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Arg Thr Thr Gln Glu Lys Cys
[4755] 1 5 10 15
[4756] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Glu Ser Gln Leu Glu
[4757] 20 25 30
[4758] <210>280
[4759] <211>31
[4760] <212>PRT
[4761] <213> 人工序列
[4762] <220>
[4763] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[4764] <220>
[4765] <221>misc_feature
[4766] <222>(2)..(2)
[4767] <223>Xaa = Fc
[4768] <400>280
[4769] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Thr Ser Gln Glu Asp Cys
[4770] 1 5 10 15
[4771] Val Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His Met Val Ser Ser Leu Glu
[4772] 20 25 30
[4773] <210>281
[4774] <211>31
[4775] <212>PRT
[4776] <213> 人工序列
[4777] <220>
[4778] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[4779] <220>
[4780] <221>misc_feature
[4781] <222>(2)..(2)
[4782] <223>Xaa = Fc
[4783] <400>281
[4784] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Val Ile Gly Arg Pro Cys
[4785] 1 5 10 15
[4786] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Leu Glu Gly Leu Leu Glu
[4787] 20 25 30
[4788] <210>282
[4789] <211>31
[4790] <212>PRT
[4791] <213> 人工序列

- [4792] <220>
- [4793] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
- [4794] <220>
- [4795] <221>misc_feature
- [4796] <222>(2)..(2)
- [4797] <223>Xaa = Fc
- [4798] <400>282
- [4799] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Ala Gln Gln Glu Glu Cys
- [4800] 1 5 10 15
- [4801] Ala Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His Met Val Gly Leu Leu Glu
- [4802] 20 25 30
- [4803] <210>283
- [4804] <211>31
- [4805] <212>PRT
- [4806] <213> 人工序列
- [4807] <220>
- [4808] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
- [4809] <220>
- [4810] <221>misc_feature
- [4811] <222>(2)..(2)
- [4812] <223>Xaa = Fc
- [4813] <400>283
- [4814] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Pro Gly Gln Glu Asp Cys
- [4815] 1 5 10 15
- [4816] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Val Arg Ser Leu Glu
- [4817] 20 25 30
- [4818] <210>284
- [4819] <211>31
- [4820] <212>PRT
- [4821] <213> 人工序列
- [4822] <220>
- [4823] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
- [4824] <220>
- [4825] <221>misc_feature
- [4826] <222>(2)..(2)
- [4827] <223>Xaa = Fc
- [4828] <400>284
- [4829] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Pro Met Asn Gln Val Glu Cys
- [4830] 1 5 10 15

[4831] Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Arg Ser Leu Glu
 [4832] 20 25 30
 [4833] <210>285
 [4834] <211>31
 [4835] <212>PRT
 [4836] <213> 人工序列
 [4837] <220>
 [4838] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
 [4839] <220>
 [4840] <221>misc_feature
 [4841] <222>(2)..(2)
 [4842] <223>Xaa = Fc
 [4843] <400>285
 [4844] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Phe Gly Trp Ser His Gly Cys
 [4845] 1 5 10 15
 [4846] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Ser Thr Leu Glu
 [4847] 20 25 30
 [4848] <210>286
 [4849] <211>31
 [4850] <212>PRT
 [4851] <213> 人工序列
 [4852] <220>
 [4853] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
 [4854] <220>
 [4855] <221>misc_feature
 [4856] <222>(2)..(2)
 [4857] <223>Xaa = Fc
 [4858] <400>286
 [4859] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Ser Thr Gln Asp Asp Cys
 [4860] 1 5 10 15
 [4861] Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Val Gly Pro Leu Glu
 [4862] 20 25 30
 [4863] <210>287
 [4864] <211>31
 [4865] <212>PRT
 [4866] <213> 人工序列
 [4867] <220>
 [4868] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
 [4869] <220>

- [4870] <221>misc_feature
[4871] <222>(2)..(2)
[4872] <223>Xaa = Fc
[4873] <400>287
[4874] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Pro Arg Ile Ser Thr Cys
[4875] 1 5 10 15
[4876] Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Asp Gln Leu Leu Glu
[4877] 20 25 30
[4878] <210>288
[4879] <211>31
[4880] <212>PRT
[4881] <213> 人工序列
[4882] <220>
[4883] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[4884] <220>
[4885] <221>misc_feature
[4886] <222>(2)..(2)
[4887] <223>Xaa = Fc
[4888] <400>288
[4889] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ser Thr Ile Gly Asp Met Cys
[4890] 1 5 10 15
[4891] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Met Gln Val Asp Leu Glu
[4892] 20 25 30
[4893] <210>289
[4894] <211>31
[4895] <212>PRT
[4896] <213> 人工序列
[4897] <220>
[4898] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[4899] <220>
[4900] <221>misc_feature
[4901] <222>(2)..(2)
[4902] <223>Xaa = Fc
[4903] <400>289
[4904] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Leu Gly Gly Gln Gly Cys
[4905] 1 5 10 15
[4906] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu
[4907] 20 25 30
[4908] <210>290

- [4909] <211>31
[4910] <212>PRT
[4911] <213> 人工序列
[4912] <220>
[4913] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[4914] <220>
[4915] <221>misc_feature
[4916] <222>(2).. (2)
[4917] <223>Xaa = Fc
[4918] <400>290
[4919] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Leu Gly Gly Gln Gly Cys
[4920] 1 5 10 15
[4921] Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His Leu Glu Asp Gly Leu Glu
[4922] 20 25 30
[4923] <210>291
[4924] <211>31
[4925] <212>PRT
[4926] <213> 人工序列
[4927] <220>
[4928] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[4929] <220>
[4930] <221>misc_feature
[4931] <222>(2).. (2)
[4932] <223>Xaa = Fc
[4933] <400>291
[4934] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys
[4935] 1 5 10 15
[4936] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Met Gln Gly Gly Leu Glu
[4937] 20 25 30
[4938] <210>292
[4939] <211>31
[4940] <212>PRT
[4941] <213> 人工序列
[4942] <220>
[4943] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[4944] <220>
[4945] <221>misc_feature
[4946] <222>(2).. (2)
[4947] <223>Xaa = Fc

- [4948] <400>292
[4949] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Lys Gly Lys Ser Val Cys
[4950] 1 5 10 15
[4951] Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His Met Gln Ser Gly Leu Glu
[4952] 20 25 30
[4953] <210>293
[4954] <211>31
[4955] <212>PRT
[4956] <213> 人工序列
[4957] <220>
[4958] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[4959] <220>
[4960] <221>misc_feature
[4961] <222>(2)..(2)
[4962] <223>Xaa = Fc
[4963] <400>293
[4964] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys
[4965] 1 5 10 15
[4966] Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Met Gln Gly Gly Leu Glu
[4967] 20 25 30
[4968] <210>294
[4969] <211>31
[4970] <212>PRT
[4971] <213> 人工序列
[4972] <220>
[4973] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[4974] <220>
[4975] <221>misc_feature
[4976] <222>(2)..(2)
[4977] <223>Xaa = Fc
[4978] <400>294
[4979] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Val Asn Glu Val Val Cys
[4980] 1 5 10 15
[4981] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asn His Trp Asp Thr Pro Leu Glu
[4982] 20 25 30
[4983] <210>295
[4984] <211>31
[4985] <212>PRT
[4986] <213> 人工序列

- [4987] <220>
[4988] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[4989] <220>
[4990] <221>misc_feature
[4991] <222>(2).. (2)
[4992] <223>Xaa = Fc
[4993] <400>295
[4994] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Val Gln Val Gly Met Cys
[4995] 1 5 10 15
[4996] Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Lys His Met Arg Leu Gln Leu Glu
[4997] 20 25 30
[4998] <210>296
[4999] <211>31
[5000] <212>PRT
[5001] <213> 人工序列
[5002] <220>
[5003] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[5004] <220>
[5005] <221>misc_feature
[5006] <222>(2).. (2)
[5007] <223>Xaa = Fc
[5008] <400>296
[5009] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Val Gly Ser Gln Thr Cys
[5010] 1 5 10 15
[5011] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Leu Val Glu Val Leu Glu
[5012] 20 25 30
[5013] <210>297
[5014] <211>31
[5015] <212>PRT
[5016] <213> 人工序列
[5017] <220>
[5018] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[5019] <220>
[5020] <221>misc_feature
[5021] <222>(2).. (2)
[5022] <223>Xaa = Fc
[5023] <400>297
[5024] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Gly Met Lys Met Phe Cys
[5025] 1 5 10 15

[5026] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Ile Val Tyr Arg Leu Glu
 [5027] 20 25 30
 [5028] <210>298
 [5029] <211>31
 [5030] <212>PRT
 [5031] <213> 人工序列
 [5032] <220>
 [5033] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
 [5034] <220>
 [5035] <221>misc_feature
 [5036] <222>(2)..(2)
 [5037] <223>Xaa = Fc
 [5038] <400>298
 [5039] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys
 [5040] 1 5 10 15
 [5041] Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gln Gly Gly Leu Glu
 [5042] 20 25 30
 [5043] <210>299
 [5044] <211>31
 [5045] <212>PRT
 [5046] <213> 人工序列
 [5047] <220>
 [5048] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
 [5049] <220>
 [5050] <221>misc_feature
 [5051] <222>(2)..(2)
 [5052] <223>Xaa = Fc
 [5053] <400>299
 [5054] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Ser Gln Arg Val Gly Cys
 [5055] 1 5 10 15
 [5056] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln His Leu Thr Tyr Thr Leu Glu
 [5057] 20 25 30
 [5058] <210>300
 [5059] <211>31
 [5060] <212>PRT
 [5061] <213> 人工序列
 [5062] <220>
 [5063] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
 [5064] <220>

- [5065] <221>misc_feature
 [5066] <222>(2)..(2)
 [5067] <223>Xaa = Fc
 [5068] <400>300
 [5069] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Trp Ser Trp Pro Pro Cys
 [5070] 1 5 10 15
 [5071] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln Thr Val Trp Pro Ser Leu Glu
 [5072] 20 25 30
 [5073] <210>301
 [5074] <211>31
 [5075] <212>PRT
 [5076] <213> 人工序列
 [5077] <220>
 [5078] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
 [5079] <220>
 [5080] <221>misc_feature
 [5081] <222>(2)..(2)
 [5082] <223>Xaa = Fc
 [5083] <400>301
 [5084] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Thr Ser Pro Ser Phe Cys
 [5085] 1 5 10 15
 [5086] Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His Met Val Gln Gly Leu Glu
 [5087] 20 25 30
 [5088] <210>302
 [5089] <211>31
 [5090] <212>PRT
 [5091] <213> 人工序列
 [5092] <220>
 [5093] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
 [5094] <220>
 [5095] <221>misc_feature
 [5096] <222>(2)..(2)
 [5097] <223>Xaa = Fc
 [5098] <400>302
 [5099] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Gln Gly Leu His Gln Cys
 [5100] 1 5 10 15
 [5101] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Lys Val Leu Trp Pro Ser Leu Glu
 [5102] 20 25 30
 [5103] <210>303

- [5104] <211>31
[5105] <212>PRT
[5106] <213> 人工序列
[5107] <220>
[5108] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[5109] <220>
[5110] <221>misc_feature
[5111] <222>(2).. (2)
[5112] <223>Xaa = Fc
[5113] <400>303
[5114] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Trp Arg Ser Gln Val Cys
[5115] 1 5 10 15
[5116] Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asn Leu Gly Gly Asp Trp Leu Glu
[5117] 20 25 30
[5118] <210>304
[5119] <211>31
[5120] <212>PRT
[5121] <213> 人工序列
[5122] <220>
[5123] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[5124] <220>
[5125] <221>misc_feature
[5126] <222>(2).. (2)
[5127] <223>Xaa = Fc
[5128] <400>304
[5129] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Asp Lys Ile Leu Glu Glu Cys
[5130] 1 5 10 15
[5131] Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln Phe Phe Tyr Gly Ala Leu Glu
[5132] 20 25 30
[5133] <210>305
[5134] <211>31
[5135] <212>PRT
[5136] <213> 人工序列
[5137] <220>
[5138] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[5139] <220>
[5140] <221>misc_feature
[5141] <222>(2).. (2)
[5142] <223>Xaa = Fc

- [5143] <400>305
[5144] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Thr Phe Ala Arg Gln Cys
[5145] 1 5 10 15
[5146] Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala Leu Gly Gly Asn Trp Leu Glu
[5147] 20 25 30
[5148] <210>306
[5149] <211>31
[5150] <212>PRT
[5151] <213> 人工序列
[5152] <220>
[5153] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[5154] <220>
[5155] <221>misc_feature
[5156] <222>(2)..(2)
[5157] <223>Xaa = Fc
[5158] <400>306
[5159] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Pro Ala Gln Glu Glu Cys
[5160] 1 5 10 15
[5161] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu Pro Leu Pro Leu Met Leu Glu
[5162] 20 25 30
[5163] <210>307
[5164] <211>31
[5165] <212>PRT
[5166] <213> 人工序列
[5167] <220>
[5168] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[5169] <220>
[5170] <221>misc_feature
[5171] <222>(2)..(2)
[5172] <223>Xaa = Fc
[5173] <400>307
[5174] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Arg Pro Glu Asp Met Cys Ser
[5175] 1 5 10 15
[5176] Gln Trp Asp Pro Trp Thr Trp His Leu Gln Gly Tyr Cys Leu Glu
[5177] 20 25 30
[5178] <210>308
[5179] <211>31
[5180] <212>PRT
[5181] <213> 人工序列

- [5182] <220>
[5183] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[5184] <220>
[5185] <221>misc_feature
[5186] <222>(2)..(2)
[5187] <223>Xaa = Fc
[5188] <400>308
[5189] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Trp Gln Leu Ala Val Cys
[5190] 1 5 10 15
[5191] Gln Trp Asp Pro Gln Thr Cys Asp His Met Gly Ala Leu Leu Glu
[5192] 20 25 30
[5193] <210>309
[5194] <211>31
[5195] <212>PRT
[5196] <213> 人工序列
[5197] <220>
[5198] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[5199] <220>
[5200] <221>misc_feature
[5201] <222>(2)..(2)
[5202] <223>Xaa = Fc
[5203] <400>309
[5204] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Gln Leu Val Ser Leu Cys
[5205] 1 5 10 15
[5206] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Asp Gly Trp Leu Glu
[5207] 20 25 30
[5208] <210>310
[5209] <211>31
[5210] <212>PRT
[5211] <213> 人工序列
[5212] <220>
[5213] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[5214] <220>
[5215] <221>misc_feature
[5216] <222>(2)..(2)
[5217] <223>Xaa = Fc
[5218] <400>310
[5219] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Met Gly Gly Ala Gly Arg Cys
[5220] 1 5 10 15

[5221] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu
 [5222] 20 25 30
 [5223] <210>311
 [5224] <211>31
 [5225] <212>PRT
 [5226] <213> 人工序列
 [5227] <220>
 [5228] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
 [5229] <220>
 [5230] <221>misc_feature
 [5231] <222>(2)..(2)
 [5232] <223>Xaa = Fc
 [5233] <400>311
 [5234] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Met Phe Leu Pro Asn Glu Cys
 [5235] 1 5 10 15
 [5236] Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser Asn Leu Pro Glu Ala Leu Glu
 [5237] 20 25 30
 [5238] <210>312
 [5239] <211>31
 [5240] <212>PRT
 [5241] <213> 人工序列
 [5242] <220>
 [5243] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
 [5244] <220>
 [5245] <221>misc_feature
 [5246] <222>(2)..(2)
 [5247] <223>Xaa = Fc
 [5248] <400>312
 [5249] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Phe Gly Trp Ser His Gly Cys
 [5250] 1 5 10 15
 [5251] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu
 [5252] 20 25 30
 [5253] <210>313
 [5254] <211>31
 [5255] <212>PRT
 [5256] <213> 人工序列
 [5257] <220>
 [5258] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
 [5259] <220>

- [5260] <221>misc_feature
[5261] <222>(2)..(2)
[5262] <223>Xaa = Fc
[5263] <400>313
[5264] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Pro Gln Thr Glu Gly Cys
[5265] 1 5 10 15
[5266] Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu His Gly Trp Leu Glu
[5267] 20 25 30
[5268] <210>314
[5269] <211>31
[5270] <212>PRT
[5271] <213> 人工序列
[5272] <220>
[5273] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[5274] <220>
[5275] <221>misc_feature
[5276] <222>(2)..(2)
[5277] <223>Xaa = Fc
[5278] <400>314
[5279] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Pro Asp Thr Arg Gln Gly Cys
[5280] 1 5 10 15
[5281] Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Tyr Gly Met Trp Leu Glu
[5282] 20 25 30
[5283] <210>315
[5284] <211>31
[5285] <212>PRT
[5286] <213> 人工序列
[5287] <220>
[5288] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[5289] <220>
[5290] <221>misc_feature
[5291] <222>(2)..(2)
[5292] <223>Xaa = Fc
[5293] <400>315
[5294] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Trp Pro Gln Asp Lys Cys
[5295] 1 5 10 15
[5296] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu
[5297] 20 25 30
[5298] <210>316

- [5299] <211>31
[5300] <212>PRT
[5301] <213> 人工序列
[5302] <220>
[5303] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[5304] <220>
[5305] <221>misc_feature
[5306] <222>(2).. (2)
[5307] <223>Xaa = Fc
[5308] <400>316
[5309] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Asp Lys Ile Leu Glu Glu Cys
[5310] 1 5 10 15
[5311] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu
[5312] 20 25 30
[5313] <210>317
[5314] <211>31
[5315] <212>PRT
[5316] <213> 人工序列
[5317] <220>
[5318] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[5319] <220>
[5320] <221>misc_feature
[5321] <222>(2).. (2)
[5322] <223>Xaa = Fc
[5323] <400>317
[5324] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Ala Thr Gln Glu Glu Cys
[5325] 1 5 10 15
[5326] Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu
[5327] 20 25 30
[5328] <210>318
[5329] <211>34
[5330] <212>PRT
[5331] <213> 人工序列
[5332] <220>
[5333] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[5334] <220>
[5335] <221>misc_feature
[5336] <222>(34).. (34)
[5337] <223>Xaa = Fc

- [5338] <400>318
- [5339] Met Gly Ala Gln Thr Asn Phe Met Pro Met Asp Asp Leu Glu Gln Arg
- [5340] 1 5 10 15
- [5341] Leu Tyr Glu Gln Phe Ile Leu Gln Gln Gly Leu Glu Gly Gly Gly Gly
- [5342] 20 25 30
- [5343] Gly Xaa
- [5344] <210>319
- [5345] <211>34
- [5346] <212>PRT
- [5347] <213> 人工序列
- [5348] <220>
- [5349] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
- [5350] <220>
- [5351] <221>misc_feature
- [5352] <222>(34).. (34)
- [5353] <223>Xaa = Fc
- [5354] <400>319
- [5355] Met Gly Ala Gln Thr Asn Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Ala Thr
- [5356] 1 5 10 15
- [5357] Leu Tyr Glu His Trp Ile Leu Gln His Ser Leu Glu Gly Gly Gly Gly
- [5358] 20 25 30
- [5359] Gly Xaa
- [5360] <210>320
- [5361] <211>34
- [5362] <212>PRT
- [5363] <213> 人工序列
- [5364] <220>
- [5365] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
- [5366] <220>
- [5367] <221>misc_feature
- [5368] <222>(34).. (34)
- [5369] <223>Xaa = Fc
- [5370] <400>320
- [5371] Met Gly Ala Gln Gln Lys Tyr Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Lys Thr
- [5372] 1 5 10 15
- [5373] Leu Tyr Asp Gln Phe Met Leu Gln Gln Gly Leu Glu Gly Gly Gly Gly
- [5374] 20 25 30
- [5375] Gly Xaa
- [5376] <210>321

- [5377] <211>34
[5378] <212>PRT
[5379] <213> 人工序列
[5380] <220>
[5381] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[5382] <220>
[5383] <221>misc_feature
[5384] <222>(34).. (34)
[5385] <223>Xaa = Fc
[5386] <400>321
[5387] Met Gly Ala Gln Leu Asn Phe Thr Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr
[5388] 1 5 10 15
[5389] Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln Gln Ser Leu Glu Gly Gly Gly Gly
[5390] 20 25 30
[5391] Gly Xaa
[5392] <210>322
[5393] <211>34
[5394] <212>PRT
[5395] <213> 人工序列
[5396] <220>
[5397] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[5398] <220>
[5399] <221>misc_feature
[5400] <222>(34).. (34)
[5401] <223>Xaa = Fc
[5402] <400>322
[5403] Met Gly Ala Gln Gln Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr
[5404] 1 5 10 15
[5405] Leu Tyr Glu Gln Phe Met Leu Gln Gln Ala Leu Glu Gly Gly Gly Gly
[5406] 20 25 30
[5407] Gly Xaa
[5408] <210>323
[5409] <211>34
[5410] <212>PRT
[5411] <213> 人工序列
[5412] <220>
[5413] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[5414] <220>
[5415] <221>misc_feature

- [5416] <222>(34).. (34)
- [5417] <223>Xaa = Fc
- [5418] <400>323
- [5419] Met Gly Ala Gln Gln Glu Tyr Glu Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Thr
- [5420] 1 5 10 15
- [5421] Leu Tyr Asn Gln Trp Met Phe His Gln Arg Leu Glu Gly Gly Gly Gly
- [5422] 20 25 30
- [5423] Gly Xaa
- [5424] <210>324
- [5425] <211>34
- [5426] <212>PRT
- [5427] <213> 人工序列
- [5428] <220>
- [5429] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
- [5430] <220>
- [5431] <221>misc_feature
- [5432] <222>(34).. (34)
- [5433] <223>Xaa = Fc
- [5434] <400>324
- [5435] Met Gly Ala Gln Val Lys Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Ile
- [5436] 1 5 10 15
- [5437] Leu Tyr Glu Gln Gln Thr Phe Gln Glu Arg Leu Glu Gly Gly Gly Gly
- [5438] 20 25 30
- [5439] Gly Xaa
- [5440] <210>325
- [5441] <211>34
- [5442] <212>PRT
- [5443] <213> 人工序列
- [5444] <220>
- [5445] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
- [5446] <220>
- [5447] <221>misc_feature
- [5448] <222>(34).. (34)
- [5449] <223>Xaa = Fc
- [5450] <400>325
- [5451] Met Gly Ala Gln Thr Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Gln Thr
- [5452] 1 5 10 15
- [5453] Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln Gln Arg Leu Glu Gly Gly Gly Gly
- [5454] 20 25 30

[5455] Gly Xaa
 [5456] <210>326
 [5457] <211>34
 [5458] <212>PRT
 [5459] <213> 人工序列
 [5460] <220>
 [5461] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
 [5462] <220>
 [5463] <221>misc_feature
 [5464] <222>(34)..(34)
 [5465] <223>Xaa = Fc
 [5466] <400>326
 [5467] Met Gly Ala Gln Thr Asn Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Gln Thr
 [5468] 1 5 10 15
 [5469] Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln Gln Arg Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 [5470] 20 25 30
 [5471] Gly Xaa
 [5472] <210>327
 [5473] <211>34
 [5474] <212>PRT
 [5475] <213> 人工序列
 [5476] <220>
 [5477] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
 [5478] <220>
 [5479] <221>misc_feature
 [5480] <222>(34)..(34)
 [5481] <223>Xaa = Fc
 [5482] <220>
 [5483] <221>' misc_feature
 [5484] <222>(34)..(34)
 [5485] <223>Xaa = Fc
 [5486] <400>327
 [5487] Met Gly Ala Gln Gln Asn Phe Lys Pro Met Asp Glu Leu Glu Asp Thr
 [5488] 1 5 10 15
 [5489] Leu Tyr Lys Gln Phe Leu Phe Gln His Ser Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 [5490] 20 25 30
 [5491] Gly Xaa
 [5492] <210>328
 [5493] <211>34

- [5494] <212>PRT
[5495] <213> 人工序列
[5496] <220>
[5497] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[5498] <220>
[5499] <221>misc_feature
[5500] <222>(34).. (34)
[5501] <223>Xaa = Fc
[5502] <400>328
[5503] Met Gly Ala Gln Val Lys Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Trp
[5504] 1 5 10 15
[5505] Leu Tyr His Gln Phe Thr Leu His His Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly
[5506] 20 25 30
[5507] Gly Xaa
[5508] <210>329
[5509] <211>34
[5510] <212>PRT
[5511] <213> 人工序列
[5512] <220>
[5513] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[5514] <220>
[5515] <221>misc_feature
[5516] <222>(34).. (34)
[5517] <223>Xaa = Fc
[5518] <400>329
[5519] Met Gly Ala Gln Tyr Lys Phe Thr Pro Leu Asp Asp Leu Glu Gln Thr
[5520] 1 5 10 15
[5521] Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln His Val Leu Glu Gly Gly Gly Gly
[5522] 20 25 30
[5523] Gly Xaa
[5524] <210>330
[5525] <211>34
[5526] <212>PRT
[5527] <213> 人工序列
[5528] <220>
[5529] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[5530] <220>
[5531] <221>misc_feature
[5532] <222>(34).. (34)

- [5533] <223>Xaa = Fc
- [5534] <400>330
- [5535] Met Gly Ala Gln Gln Asn Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Ala Thr
- [5536] 1 5 10 15
- [5537] Leu Tyr Glu His Phe Ile Phe His Tyr Thr Leu Glu Gly Gly Gly Gly
- [5538] 20 25 30
- [5539] Gly Xaa
- [5540] <210>331
- [5541] <211>34
- [5542] <212>PRT
- [5543] <213> 人工序列
- [5544] <220>
- [5545] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
- [5546] <220>
- [5547] <221>misc_feature
- [5548] <222>(34).. (34)
- [5549] <223>Xaa = Fc
- [5550] <400>331
- [5551] Met Gly Ala Gln Val Lys Phe Lys Pro Leu Asp Ala Leu Glu Gln Thr
- [5552] 1 5 10 15
- [5553] Leu Tyr Glu His Trp Met Phe Gln Gln Ala Leu Glu Gly Gly Gly Gly
- [5554] 20 25 30
- [5555] Gly Xaa
- [5556] <210>332
- [5557] <211>34
- [5558] <212>PRT
- [5559] <213> 人工序列
- [5560] <220>
- [5561] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
- [5562] <220>
- [5563] <221>misc_feature
- [5564] <222>(34).. (34)
- [5565] <223>Xaa = Fc
- [5566] <400>332
- [5567] Met Gly Ala Gln Glu Asp Tyr Met Pro Leu Asp Ala Leu Asp Ala Gln
- [5568] 1 5 10 15
- [5569] Leu Tyr Glu Gln Phe Ile Leu Leu His Gly Leu Glu Gly Gly Gly Gly
- [5570] 20 25 30
- [5571] Gly Xaa

- [5572] <210>333
[5573] <211>34
[5574] <212>PRT
[5575] <213> 人工序列
[5576] <220>
[5577] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[5578] <220>
[5579] <221>misc_feature
[5580] <222>(34).. (34)
[5581] <223>Xaa = Fc
[5582] <400>333
[5583] Met Gly Ala Gln Tyr Lys Phe Asn Pro Met Asp Glu Leu Glu Gln Thr
[5584] 1 5 10 15
[5585] Leu Tyr Glu Glu Phe Leu Phe Gln His Ala Leu Glu Gly Gly Gly Gly
[5586] 20 25 30
[5587] Gly Xaa
[5588] <210>334
[5589] <211>34
[5590] <212>PRT
[5591] <213> 人工序列
[5592] <220>
[5593] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[5594] <220>
[5595] <221>misc_feature
[5596] <222>(34).. (34)
[5597] <223>Xaa = Fc
[5598] <400>334
[5599] Met Gly Ala Gln Ser Asn Phe Met Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr
[5600] 1 5 10 15
[5601] Leu Tyr Glu Gln Phe Met Leu Gln His Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly
[5602] 20 25 30
[5603] Gly Xaa
[5604] <210>335
[5605] <211>34
[5606] <212>PRT
[5607] <213> 人工序列
[5608] <220>
[5609] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[5610] <220>

- [5611] <221>misc_feature
 [5612] <222>(34).. (34)
 [5613] <223>Xaa = Fc
 [5614] <400>335
 [5615] Met Gly Ala Gln Gln Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr
 [5616] 1 5 10 15
 [5617] Leu Tyr Lys Gln Trp Thr Leu Gln Gln Arg Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 [5618] 20 25 30
 [5619] Gly Xaa
 [5620] <210>336
 [5621] <211>34
 [5622] <212>PRT
 [5623] <213> 人工序列
 [5624] <220>
 [5625] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
 [5626] <220>
 [5627] <221>misc_feature
 [5628] <222>(34).. (34)
 [5629] <223>Xaa = Fc
 [5630] <400>336
 [5631] Met Gly Ala Gln Gln Lys Phe Met Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Ile
 [5632] 1 5 10 15
 [5633] Leu Tyr Glu Gln Phe Met Phe Gln Gln Ser Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 [5634] 20 25 30
 [5635] Gly Xaa
 [5636] <210>337
 [5637] <211>34
 [5638] <212>PRT
 [5639] <213> 人工序列
 [5640] <220>
 [5641] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
 [5642] <220>
 [5643] <221>misc_feature
 [5644] <222>(34).. (34)
 [5645] <223>Xaa = Fc
 [5646] <400>337
 [5647] Met Gly Ala Gln Thr Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr
 [5648] 1 5 10 15
 [5649] Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln His Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly

[5650]		20	25	30
[5651]	Gly Xaa			
[5652]	<210>338			
[5653]	<211>34			
[5654]	<212>PRT			
[5655]	<213> 人工序列			
[5656]	<220>			
[5657]	<223> 能结合 Ang-2 的肽抗体			
[5658]	<220>			
[5659]	<221>misc_feature			
[5660]	<222>(34).. (34)			
[5661]	<223>Xaa = Fc			
[5662]	<400>338			
[5663]	Met Gly Ala Gln His Thr Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr			
[5664]	1 5 10 15			
[5665]	Leu Tyr Tyr Gln Trp Leu Tyr Asp Gln Leu Leu Glu Gly Gly Gly Gly			
[5666]	20 25 30			
[5667]	Gly Xaa			
[5668]	<210>339			
[5669]	<211>34			
[5670]	<212>PRT			
[5671]	<213> 人工序列			
[5672]	<220>			
[5673]	<223> 能结合 Ang-2 的肽抗体			
[5674]	<220>			
[5675]	<221>misc_feature			
[5676]	<222>(34).. (34)			
[5677]	<223>Xaa = Fc			
[5678]	<400>339			
[5679]	Met Gly Ala Gln Gln Lys Phe Lys Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr			
[5680]	1 5 10 15			
[5681]	Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln Gln Arg Leu Glu Gly Gly Gly Gly			
[5682]	20 25 30			
[5683]	Gly Xaa			
[5684]	<210>340			
[5685]	<211>34			
[5686]	<212>PRT			
[5687]	<213> 人工序列			
[5688]	<220>			

[5689] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[5690] <220>
[5691] <221>misc_feature
[5692] <222>(34)..(34)
[5693] <223>Xaa = Fc
[5694] <400>340
[5695] Met Gly Ala Gln Gln Thr Phe Gln Pro Leu Asp Asp Leu Glu Glu Tyr
[5696] 1 5 10 15
[5697] Leu Tyr Glu Gln Trp Ile Arg Arg Tyr His Leu Glu Gly Gly Gly Gly
[5698] 20 25 30
[5699] Gly Xaa
[5700] <210>341
[5701] <211>34
[5702] <212>PRT
[5703] <213> 人工序列
[5704] <220>
[5705] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[5706] <220>
[5707] <221>misc_feature
[5708] <222>(34)..(34)
[5709] <223>Xaa = Fc
[5710] <400>341
[5711] Met Gly Ala Gln Ser Lys Phe Lys Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr
[5712] 1 5 10 15
[5713] Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln His Ala Leu Glu Gly Gly Gly Gly
[5714] 20 25 30
[5715] Gly Xaa
[5716] <210>342
[5717] <211>31
[5718] <212>PRT
[5719] <213> 人工序列
[5720] <220>
[5721] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
[5722] <220>
[5723] <221>misc_feature
[5724] <222>(2)..(2)
[5725] <223>Xaa = Fc
[5726] <400>342
[5727] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ser Gly Gln Leu Arg Pro Cys

[5728]	1	5	10	15
[5729]	Glu Glu Ile Phe Gly Cys Gly Thr Gln Asn Leu Ala Leu Leu Glu			
[5730]		20	25	30
[5731]	<210>343			
[5732]	<211>31			
[5733]	<212>PRT			
[5734]	<213> 人工序列			
[5735]	<220>			
[5736]	<223> 能结合 Ang-2 的肽抗体			
[5737]	<220>			
[5738]	<221>misc_feature			
[5739]	<222>(2)..(2)			
[5740]	<223>Xaa = Fc			
[5741]	<400>343			
[5742]	Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Gly Gly Met Arg Pro Tyr			
[5743]	1	5	10	15
[5744]	Asp Gly Met Leu Gly Trp Pro Asn Tyr Asp Val Gln Ala Leu Glu			
[5745]		20	25	30
[5746]	<210>344			
[5747]	<211>31			
[5748]	<212>PRT			
[5749]	<213> 人工序列			
[5750]	<220>			
[5751]	<223> 能结合 Ang-2 的肽抗体			
[5752]	<220>			
[5753]	<221>misc_feature			
[5754]	<222>(2)..(2)			
[5755]	<223>Xaa = Fc			
[5756]	<400>344			
[5757]	Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Gln Asp Leu Arg Pro Cys			
[5758]	1	5	10	15
[5759]	Glu Asp Met Phe Gly Cys Gly Thr Lys Asp Trp Tyr Gly Leu Glu			
[5760]		20	25	30
[5761]	<210>345			
[5762]	<211>31			
[5763]	<212>PRT			
[5764]	<213> 人工序列			
[5765]	<220>			
[5766]	<223> 能结合 Ang-2 的肽抗体			

- [5767] <220>
[5768] <221>misc_feature
[5769] <222>(2)..(2)
[5770] <223>Xaa = Fc
[5771] <400>345
[5772] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Pro Gly Gln Arg Pro Tyr
[5773] 1 5 10 15
[5774] Asp Gly Met Leu Gly Trp Pro Thr Tyr Gln Arg Ile Val Leu Glu
[5775] 20 25 30
[5776] <210>346
[5777] <211>31
[5778] <212>PRT
[5779] <213>人工序列
[5780] <220>
[5781] <223>能结合 Ang-2 的肽抗体
[5782] <220>
[5783] <221>misc feature
[5784] <222>(2)..(2)
[5785] <223>Xaa = Fc
[5786] <400>346
[5787] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Thr Trp Asp Asp Pro Cys
[5788] 1 5 10 15
[5789] Met His Ile Leu Gly Pro Val Thr Trp Arg Arg Cys Ile Leu Glu
[5790] 20 25 30
[5791] <210>347
[5792] <211>31
[5793] <212>PRT
[5794] <213>人工序列
[5795] <220>
[5796] <223>能结合 Ang-2 的肽抗体
[5797] <220>
[5798] <221>misc_feature
[5799] <222>(2)..(2)
[5800] <223>Xaa = Fc
[5801] <400>347
[5802] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Phe Gly Asp Lys Arg Pro Leu
[5803] 1 5 10 15
[5804] Glu Cys Met Phe Gly Gly Pro Ile Gln Leu Cys Pro Arg Leu Glu
[5805] 20 25 30

- [5806] <210>348
 [5807] <211>25
 [5808] <212>PRT
 [5809] <213> 人工序列
 [5810] <220>
 [5811] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
 [5812] <220>
 [5813] <221>misc_feature
 [5814] <222>(2).. (2)
 [5815] <223>Xaa = Fc
 [5816] <400>348
 [5817] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Arg Pro Cys Glu Glu Ile
 [5818] 1 5 10 15
 [5819] Phe Gly Gly Cys Thr Tyr Gln Leu Glu
 [5820] 20 25
 [5821] <210>349
 [5822] <211>31
 [5823] <212>PRT
 [5824] <213> 人工序列
 [5825] <220>
 [5826] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
 [5827] <220>
 [5828] <221>misc_feature
 [5829] <222>(2).. (2)
 [5830] <223>Xaa = Fc
 [5831] <400>349
 [5832] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Gln Glu Trp Cys Glu Gly
 [5833] 1 5 10 15
 [5834] Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Lys Gln Arg Leu Glu
 [5835] 20 25 30
 [5836] <210>350
 [5837] <211>31
 [5838] <212>PRT
 [5839] <213> 人工序列
 [5840] <220>
 [5841] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
 [5842] <220>
 [5843] <221>misc_feature
 [5844] <222>(2).. (2)

- [5845] <223>Xaa = Fc
- [5846] <400>350
- [5847] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Met Leu Asp Tyr Cys Glu Gly
- [5848] 1 5 10 15
- [5849] Met Asp Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Asp Lys Gln Met Leu Glu
- [5850] 20 25 30
- [5851] <210>351
- [5852] <211>31
- [5853] <212>PRT
- [5854] <213> 人工序列
- [5855] <220>
- [5856] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
- [5857] <220>
- [5858] <221>misc_feature
- [5859] <222>(2)..(2)
- [5860] <223>Xaa = Fc
- [5861] <400>351
- [5862] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln His Gln Glu Tyr Cys Glu Gly
- [5863] 1 5 10 15
- [5864] Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Tyr Gln Gly Leu Glu
- [5865] 20 25 30
- [5866] <210>352
- [5867] <211>31
- [5868] <212>PRT
- [5869] <213> 人工序列
- [5870] <220>
- [5871] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
- [5872] <220>
- [5873] <221>misc_feature
- [5874] <222>(2)..(2)
- [5875] <223>Xaa = Fc
- [5876] <400>352
- [5877] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Gln Asp Tyr Cys Glu Gly
- [5878] 1 5 10 15
- [5879] Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Asn Gln Arg Leu Glu
- [5880] 20 25 30
- [5881] <210>353
- [5882] <211>31
- [5883] <212>PRT

- [5884] <213> 人工序列
- [5885] <220>
- [5886] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
- [5887] <220>
- [5888] <221>misc_feature
- [5889] <222>(2)..(2)
- [5890] <223>Xaa = Fc
- [5891] <400>353
- [5892] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Leu Asp Tyr Cys Glu Gly
- [5893] 1 5 10 15
- [5894] Val Gln Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Asn Leu Asp Leu Glu
- [5895] 20 25 30
- [5896] <210>354
- [5897] <211>31
- [5898] <212>PRT
- [5899] <213> 人工序列
- [5900] <220>
- [5901] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
- [5902] <220>
- [5903] <221>misc_feature
- [5904] <222>(2)..(2)
- [5905] <223>Xaa = Fc
- [5906] <400>354
- [5907] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Phe Glu Tyr Cys Asp Gly
- [5908] 1 5 10 15
- [5909] Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Asp Lys Gln Thr Leu Glu
- [5910] 20 25 30
- [5911] <210>355
- [5912] <211>31
- [5913] <212>PRT
- [5914] <213> 人工序列
- [5915] <220>
- [5916] <223> 能结合 Ang-2 的肽抗体
- [5917] <220>
- [5918] <221>misc_feature
- [5919] <222>(2)..(2)
- [5920] <223>Xaa = Fc
- [5921] <400>355
- [5922] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Gln Asp Tyr Cys Glu Gly

[5923]	1	5	10	15
[5924]	Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Met Gln Lys Leu Glu			
[5925]	20	25	30	
[5926]	<210>356			
[5927]	<211>31			
[5928]	<212>PRT			
[5929]	<213> 人工序列			
[5930]	<220>			
[5931]	<223> 能结合 Ang-2 的肽抗体			
[5932]	<220>			
[5933]	<221>misc_feature			
[5934]	<222>(2)..(2)			
[5935]	<223>Xaa = Fc			
[5936]	<400>356			
[5937]	Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Gln Asp Tyr Cys Glu Gly			
[5938]	1	5	10	15
[5939]	Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Lys Gln Arg Leu Glu			
[5940]	20	25	30	
[5941]	<210>357			
[5942]	<211>31			
[5943]	<212>PRT			
[5944]	<213> 人工序列			
[5945]	<220>			
[5946]	<223> 能结合 Ang-2 的肽抗体			
[5947]	<220>			
[5948]	<221>misc_feature			
[5949]	<222>(2)..(2)			
[5950]	<223>Xaa = Fc			
[5951]	<400>357			
[5952]	Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Leu Glu Tyr Cys Asp Gly			
[5953]	1	5	10	15
[5954]	Met Glu Asp Pro Phe Thr Gln Gly Cys Asp Asn Gln Ser Leu Glu			
[5955]	20	25	30	
[5956]	<210>358			
[5957]	<211>29			
[5958]	<212>PRT			
[5959]	<213> 人工序列			
[5960]	<220>			
[5961]	<223> 能结合 Ang-2 的肽抗体			

- [5962] <220>
[5963] <221>misc_feature
[5964] <222>(2)..(2)
[5965] <223>Xaa = Fc
[5966] <400>358
[5967] Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Phe Asp Tyr Cys Glu Gly Val
[5968] 1 5 10 15
[5969] Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Asp Asn His Leu Glu
[5970] 20 25
[5971] <210>359
[5972] <211>32
[5973] <212>PRT
[5974] <213>人工序列
[5975] <220>
[5976] <223>能结合 Ang-2 的多肽
[5977] <400>359
[5978] Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Asn Phe Met Pro Met Asp Asp
[5979] 1 5 10 15
[5980] Leu Glu Gln Arg Leu Tyr Glu Gln Phe Ile Leu Gln Gln Gly Leu Glu
[5981] 20 25 30

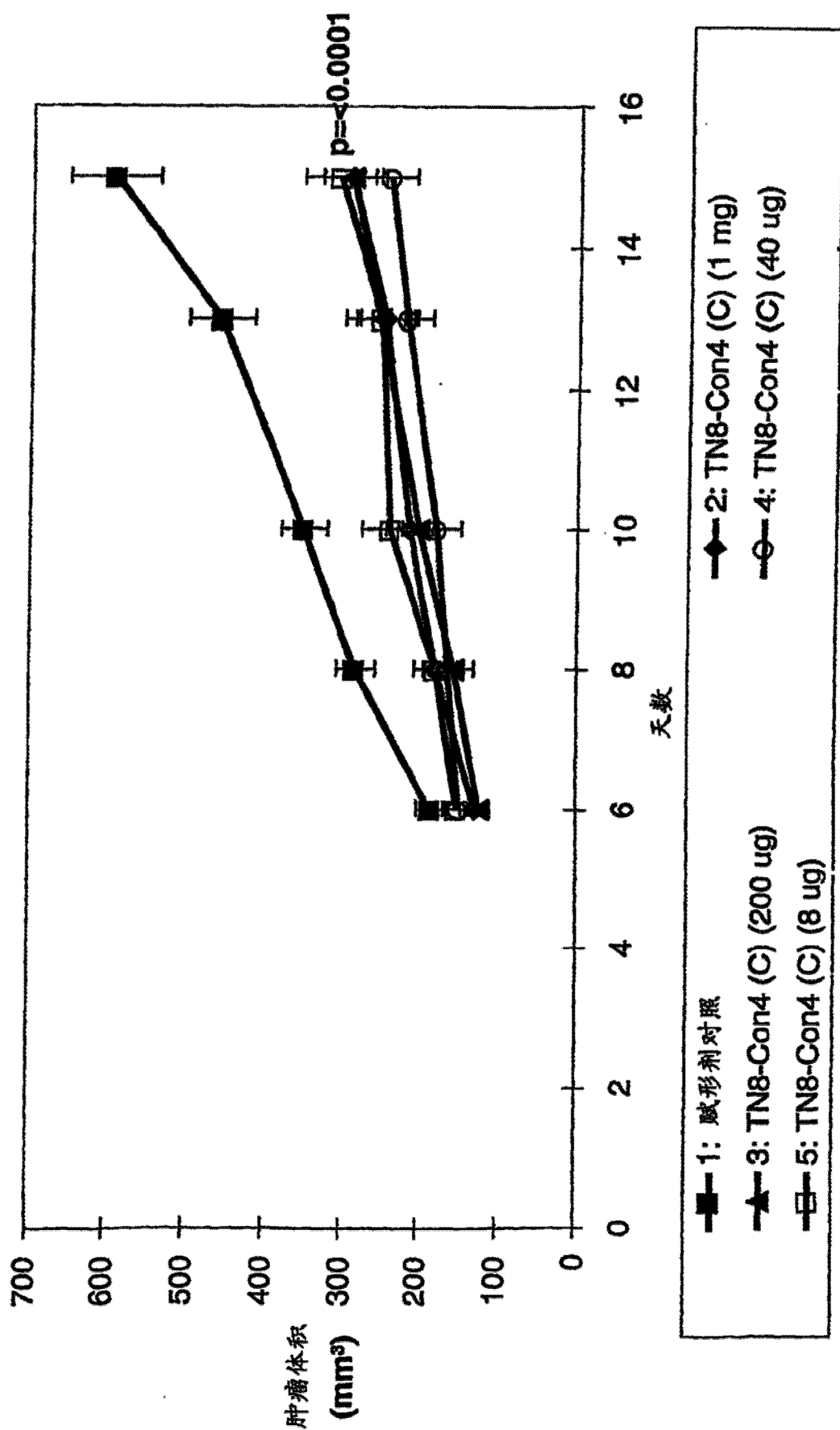


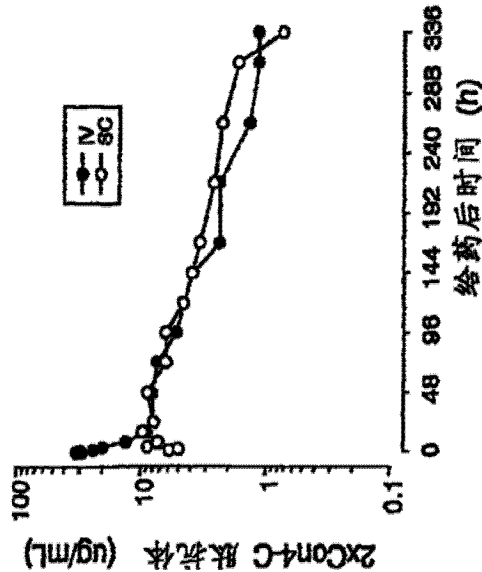
图 1

小鼠肽抗体PK (50 μ g剂量)

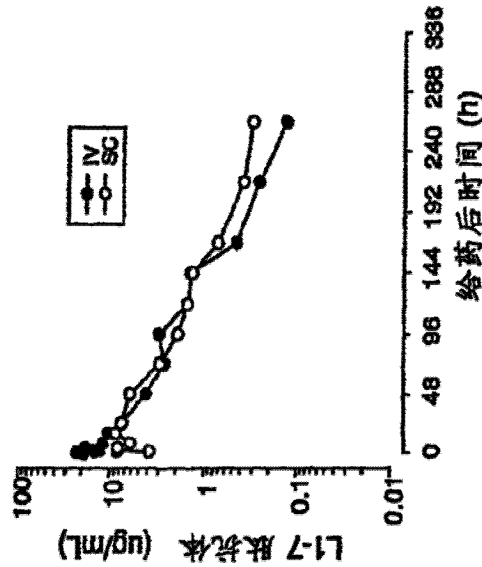
2xCon4-C

L1-7-N

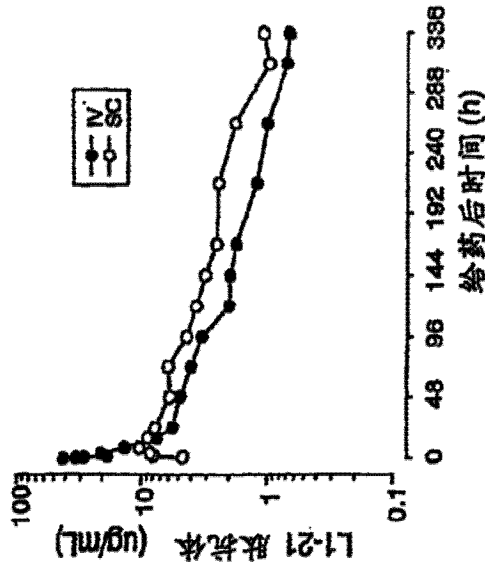
L1-21-N



$t_{1/2} = 101$ hrs
 $AUC_{inf} = 1545$ ug*hr/ml
生物利用率 (s.c.) = 96 %



$t_{1/2} = 49$ hrs
 $AUC_{inf} = 679$ ug*hr/ml
生物利用率 (s.c.) = 95 %



$t_{1/2} = 105$ hrs
 $AUC_{inf} = 1185$ ug*hr/ml
生物利用率 (s.c.) = 124 %

图 2

抗-Ang2肽抗体抑制A431肿瘤异种移植物生长

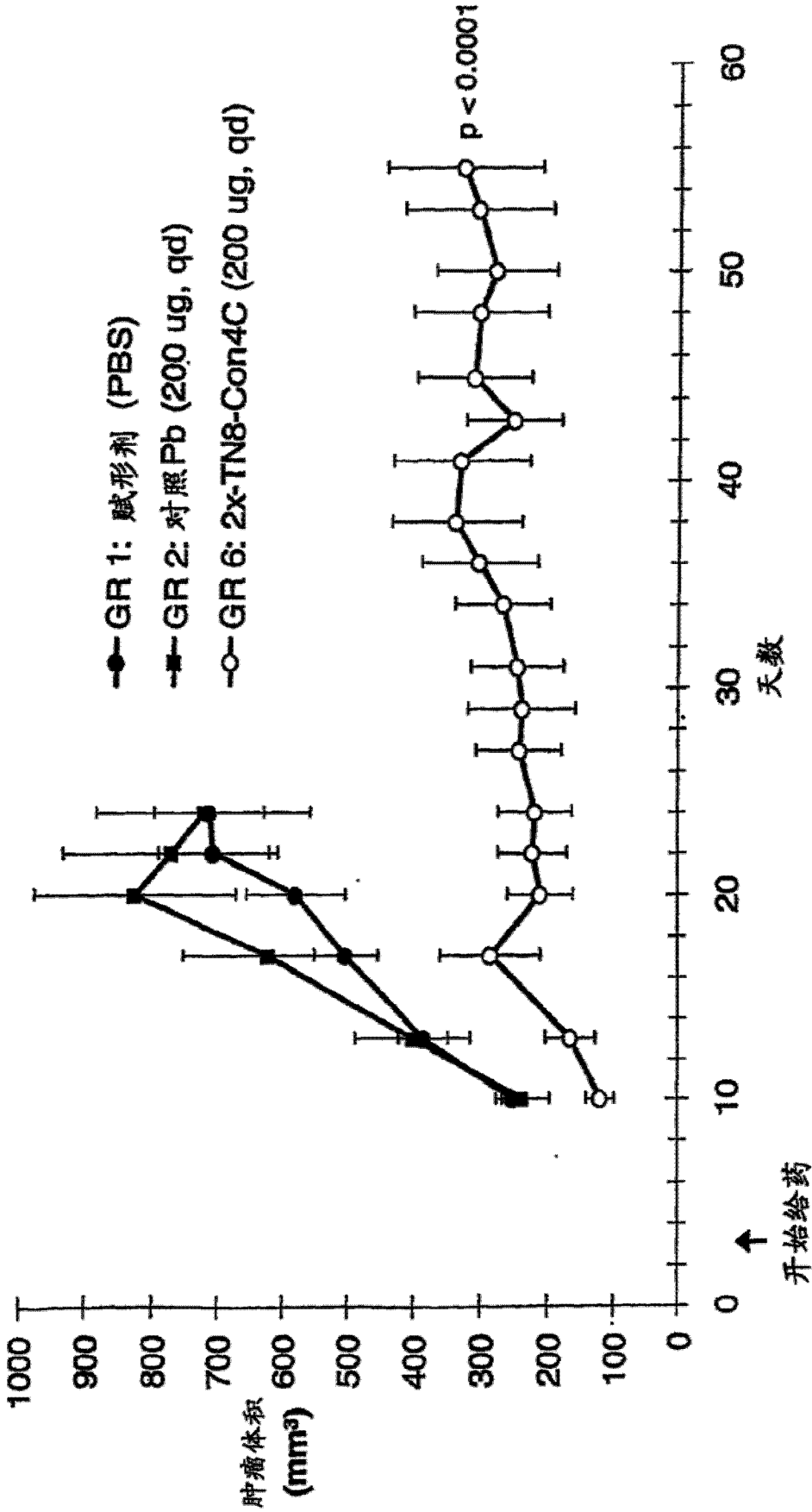


图 3

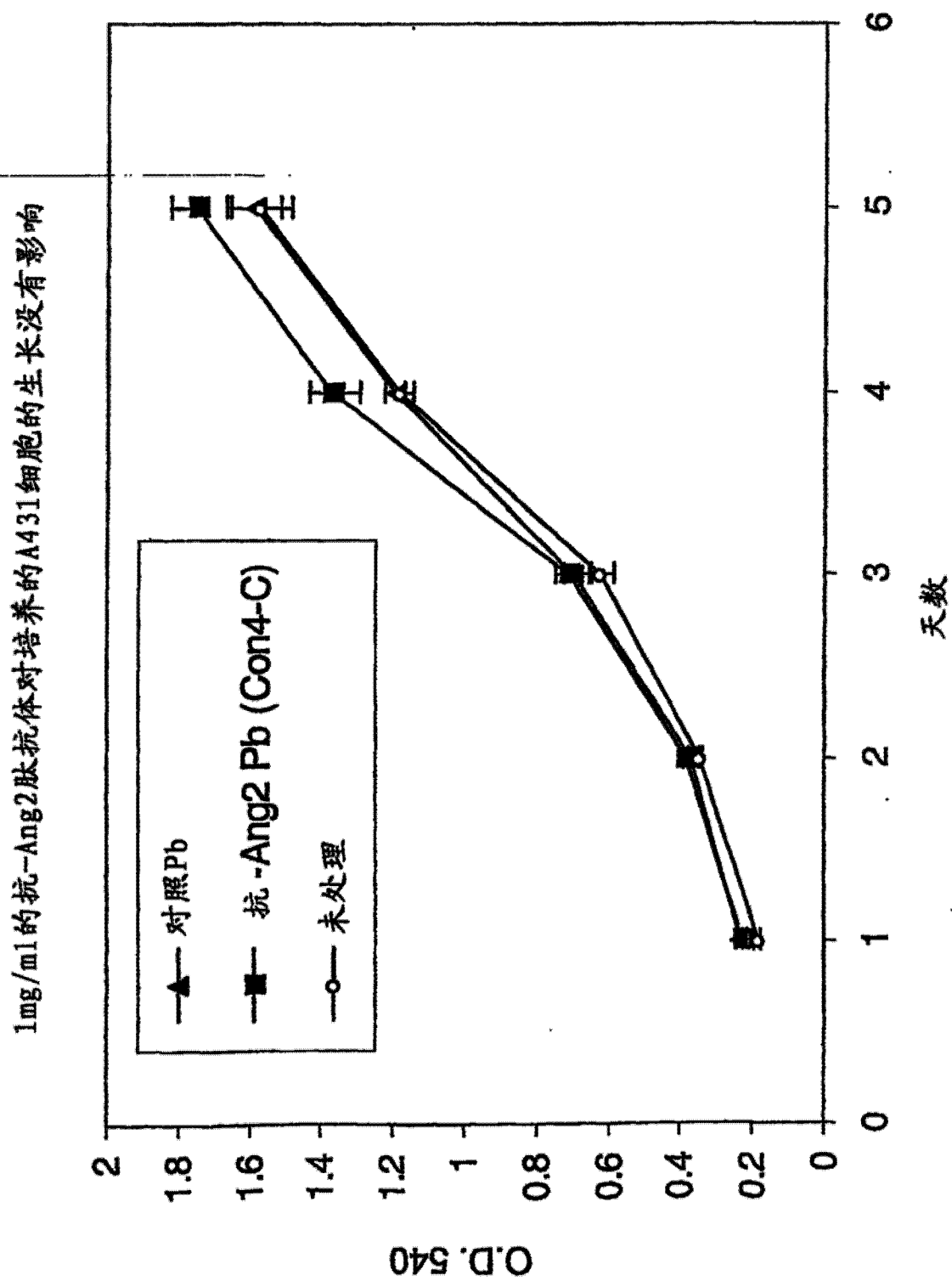


图 4

抗-Ang2肽抗体抑制Colo205肿瘤生长

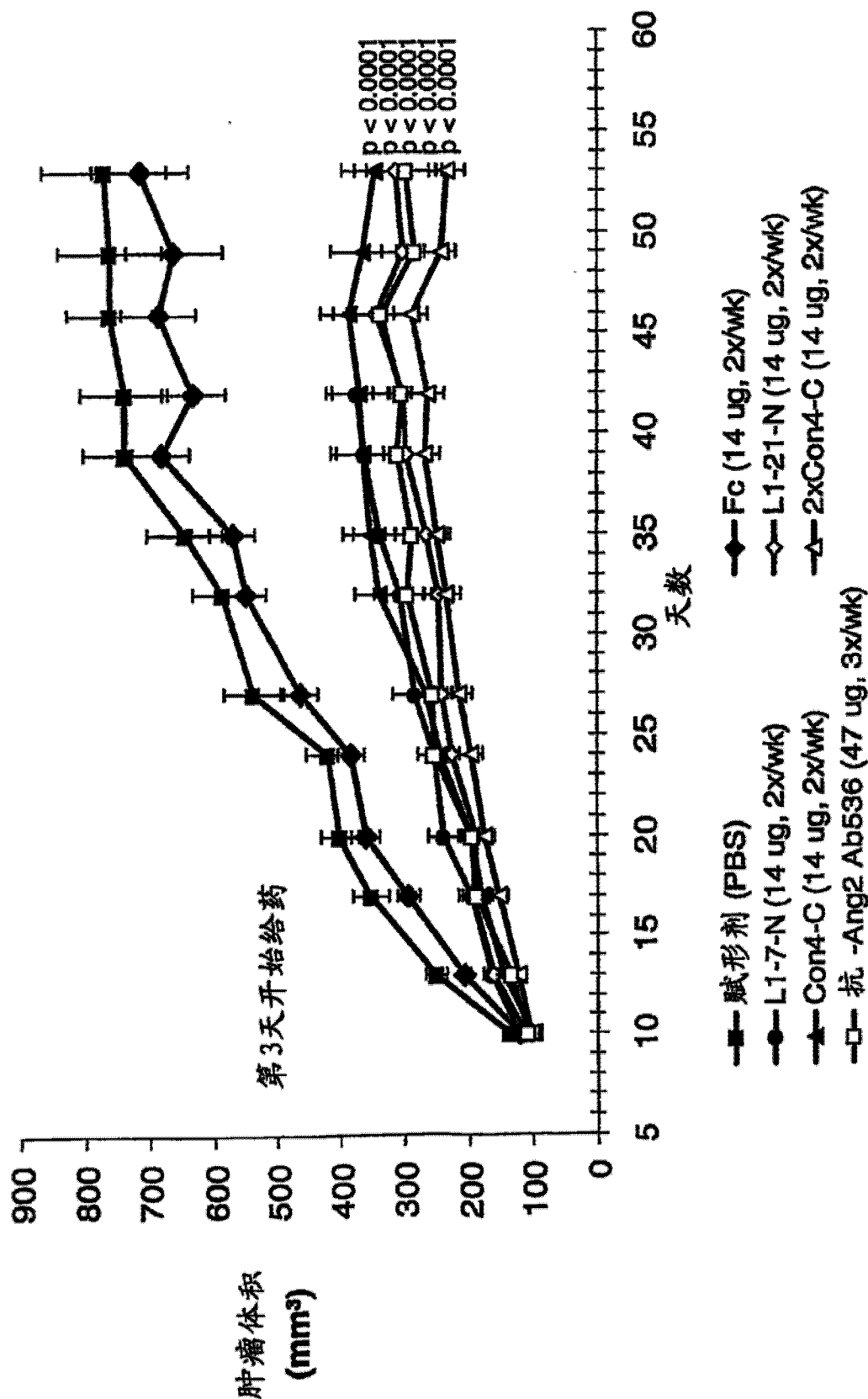


图 5

抗-Ang2肽抗体抑制Colo205肿瘤生长

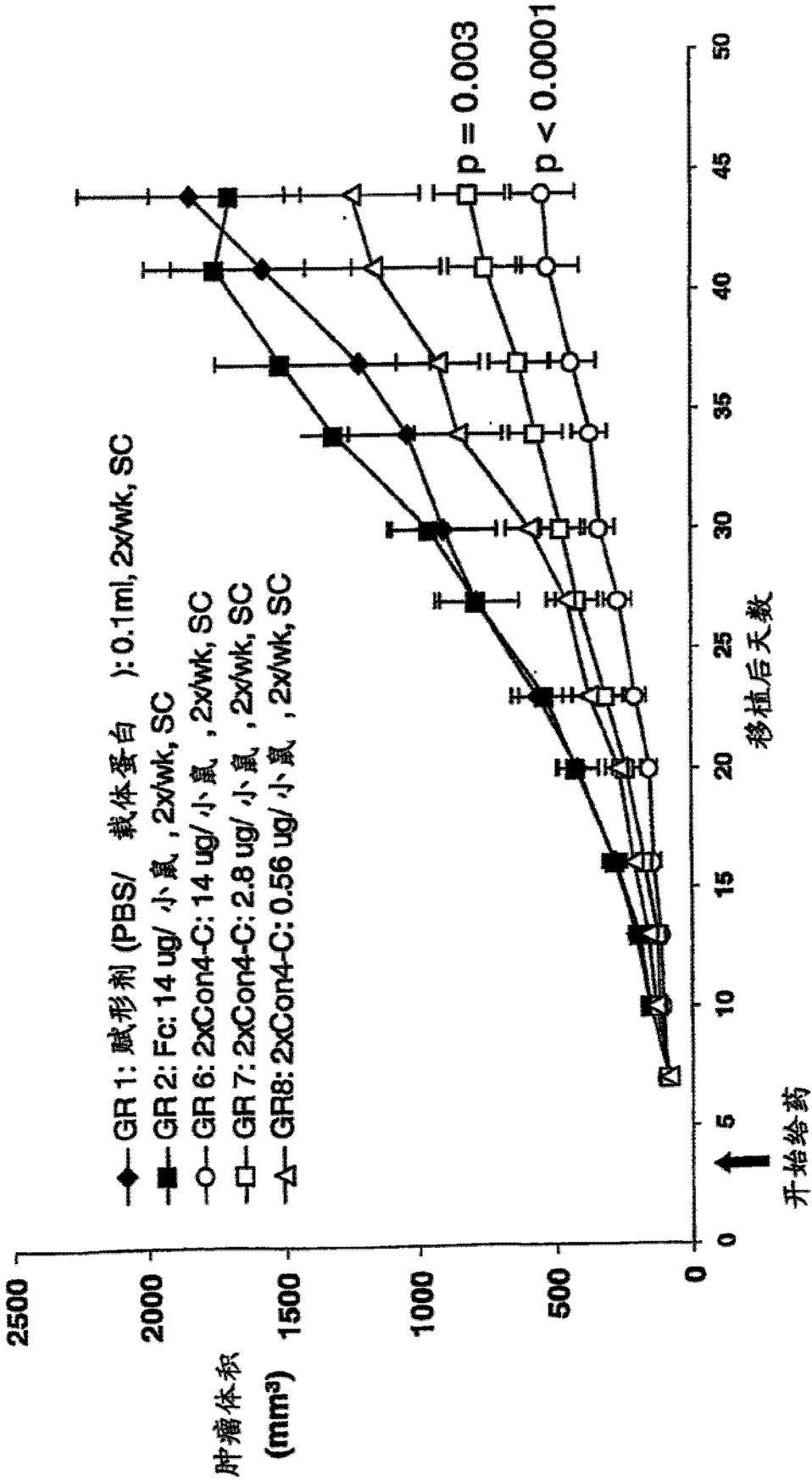


图 6

抗-Ang2肽抗体治疗减小Co1o205肿瘤异种移植物的CD31-染色密度

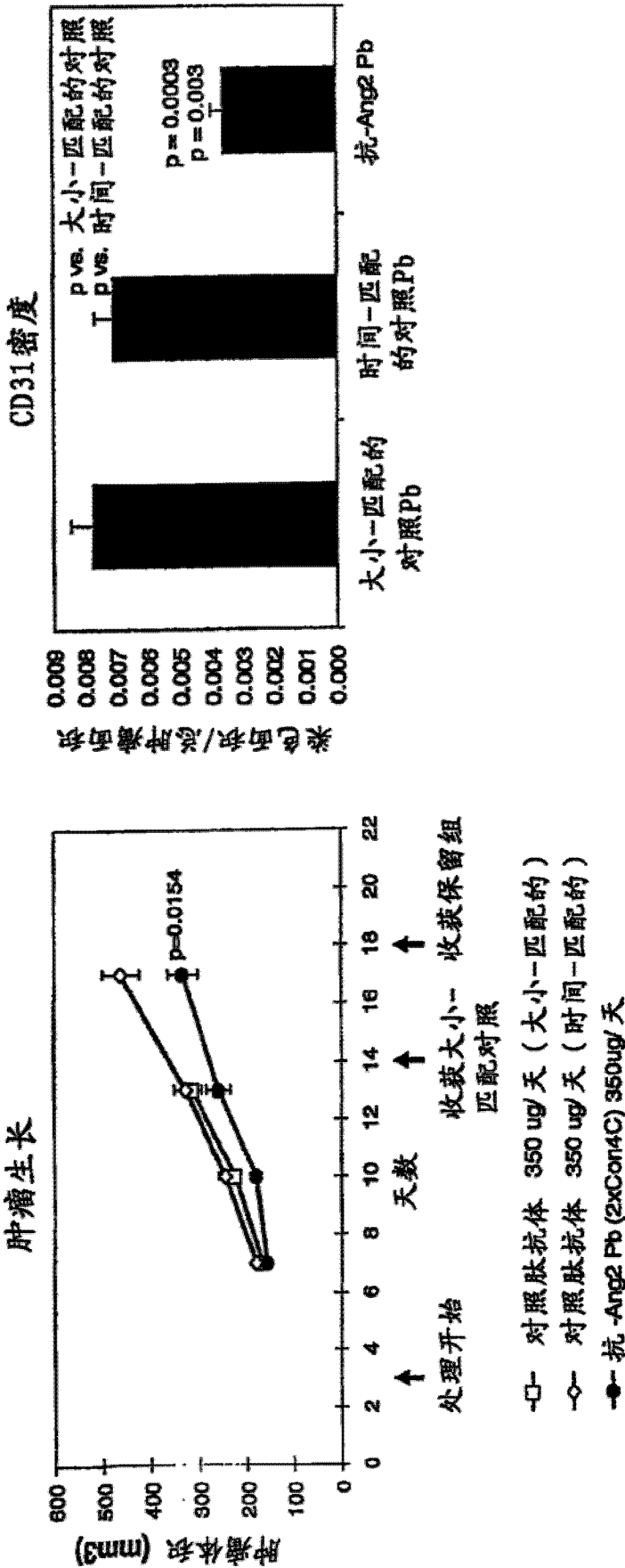


图 7

抗-Ang2 Pbs抑制Colo205肿瘤生长，与何时开始给药无关

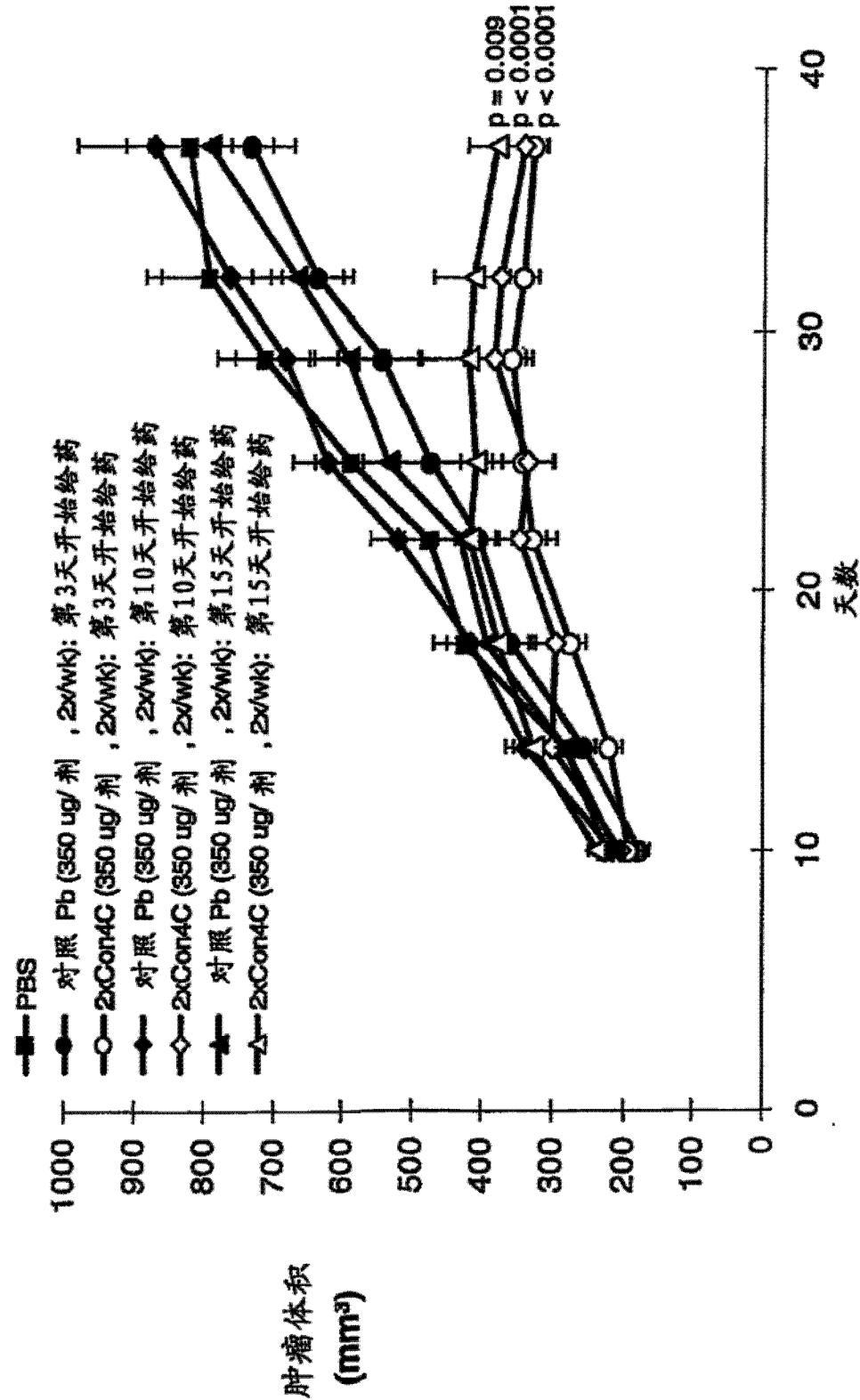


图 8

长期给药研究中的完全反应率

研究	肿瘤模型	治疗	给药方案 *	给药期 (周数)	%CR
082801	A431	Ab 536	46.7 ug, 3x/周	10	60**
100201	A431	Ab 536	46.7 ug, 3x/周	11	40**
100201	A431	2xCon4-C	200 ug/ 天	11	30**
100201	A431	2xCon4-C	40 ug/ 天	11	0
100201	A431	2xCon4-C	8 ug/ 天	11	20
012902	Colo205	Ab 536	46.7 ug, 3x/周	12	10
012902	Colo205	2xCon4-C	140 ug/周	12	0
031802	Colo205	2xCon4-C	350 ug, 2x/ 周	10	20
111901	Colo205	Ab 536	46.7 ug, 3x/周	21	20
042602	Colo205	2xCon4-C	14 ug, 2x/ 周	11	21

* 在所有的研究中，在第3天开始给药
** 实现CRs之后撤消给药，没有发现肿瘤再生长。平均随访15.3周（跨越6-27周）

图 9

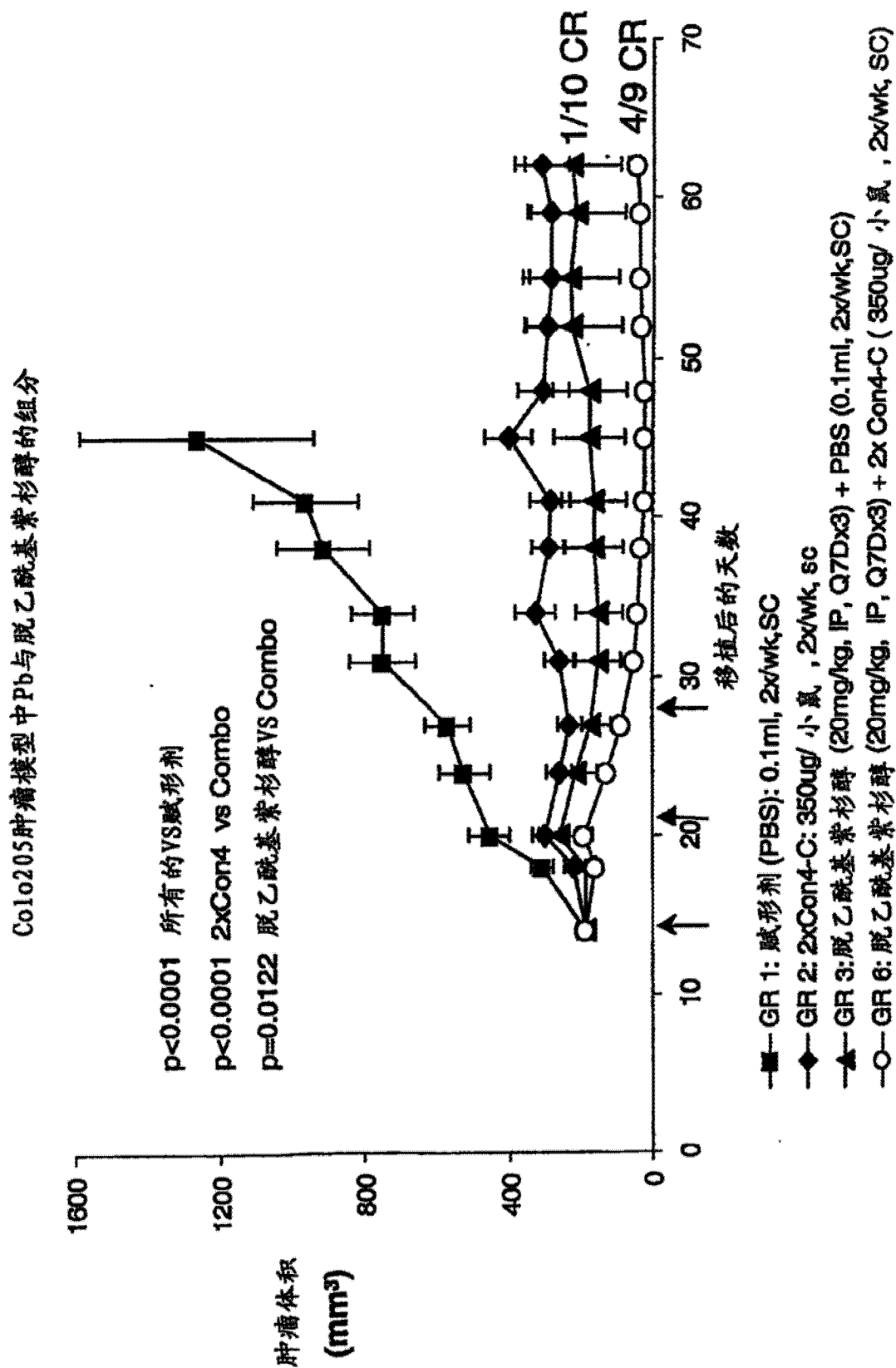


图 10a

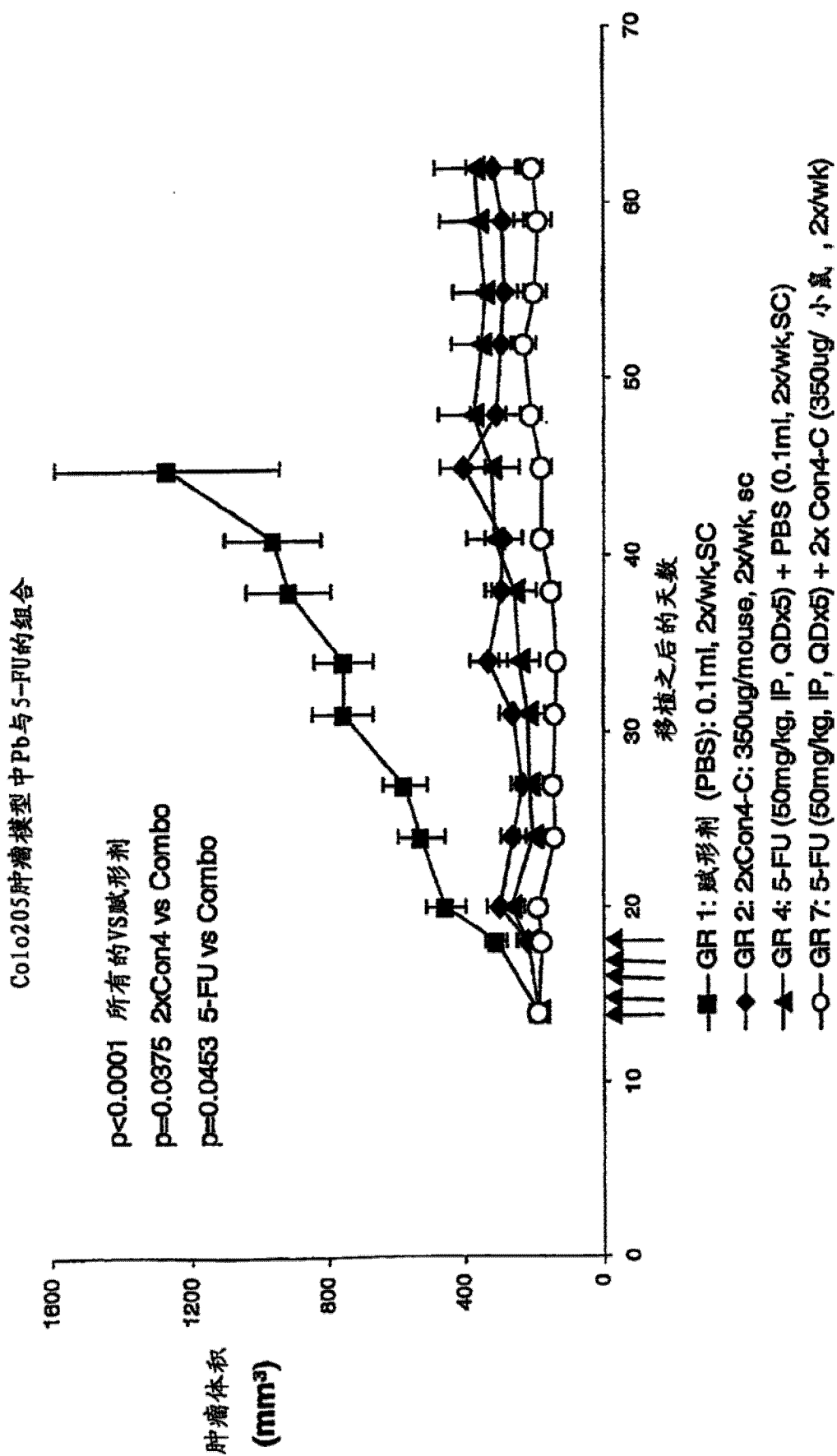


图 10b

佐剂-诱导的关节炎模型中抗-Ang2肽抗体抑制爪肿胀

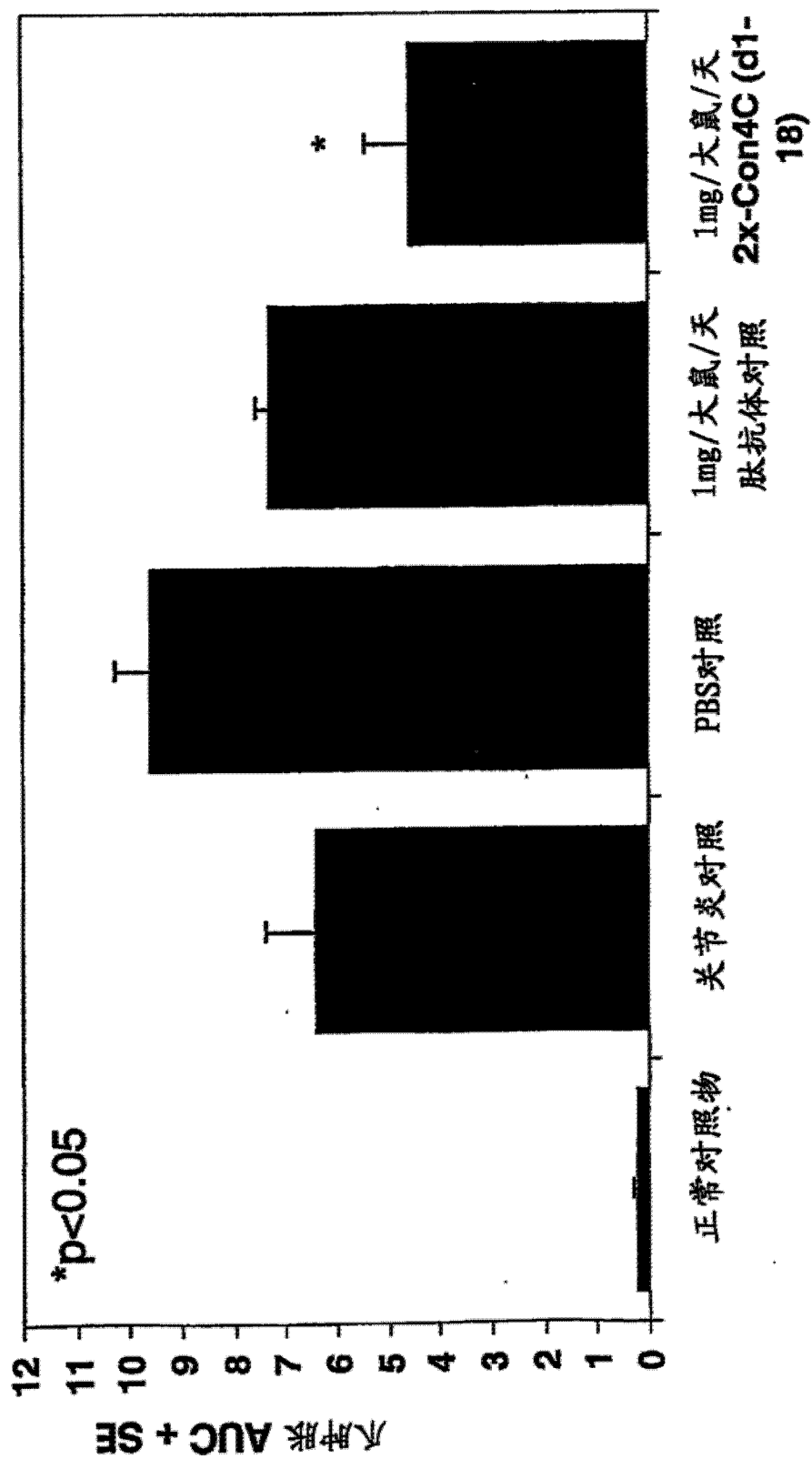


图 11a

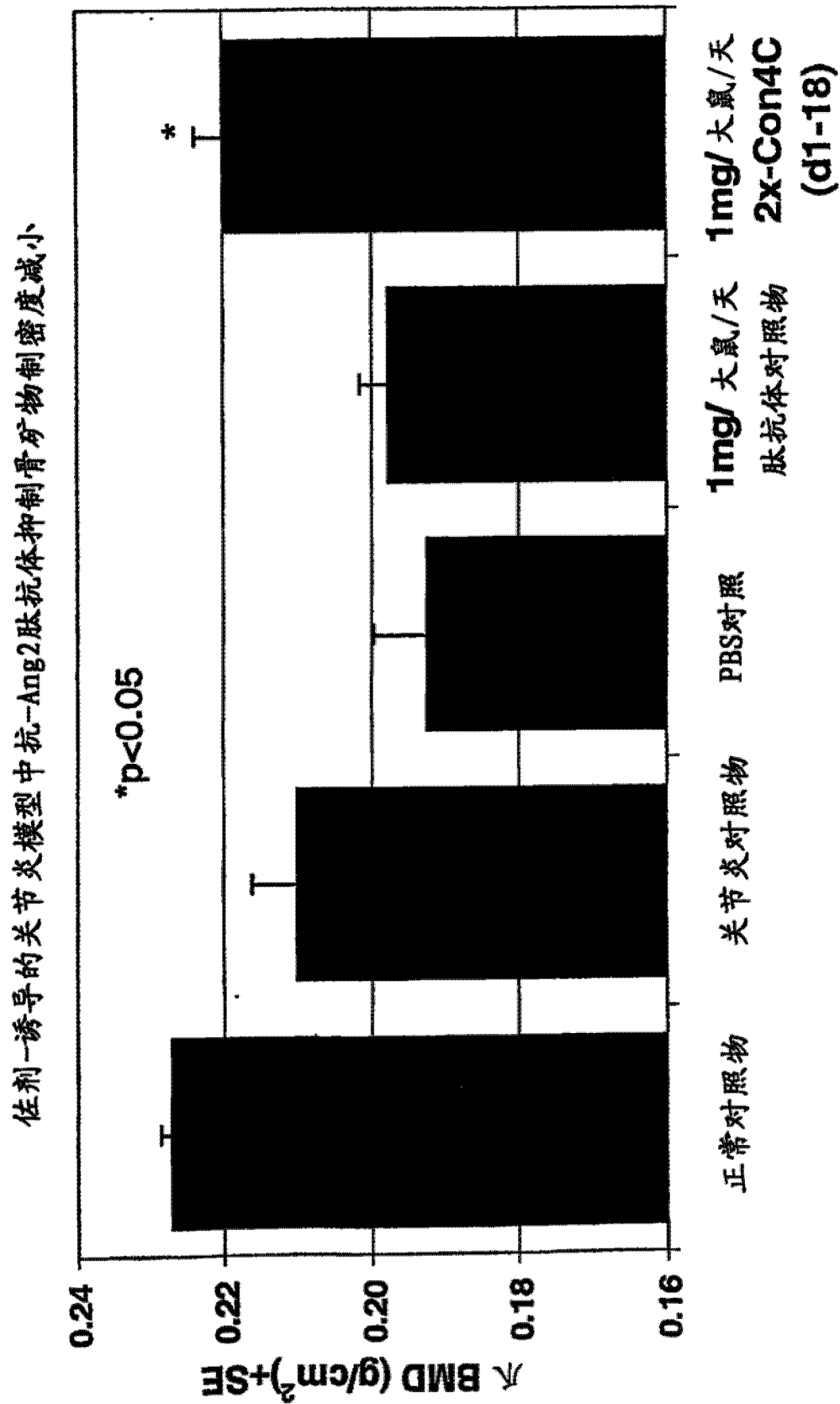


图 11b

佐剂-诱导的关节炎模型中抗Ang2肽抗体对体重减轻的影响

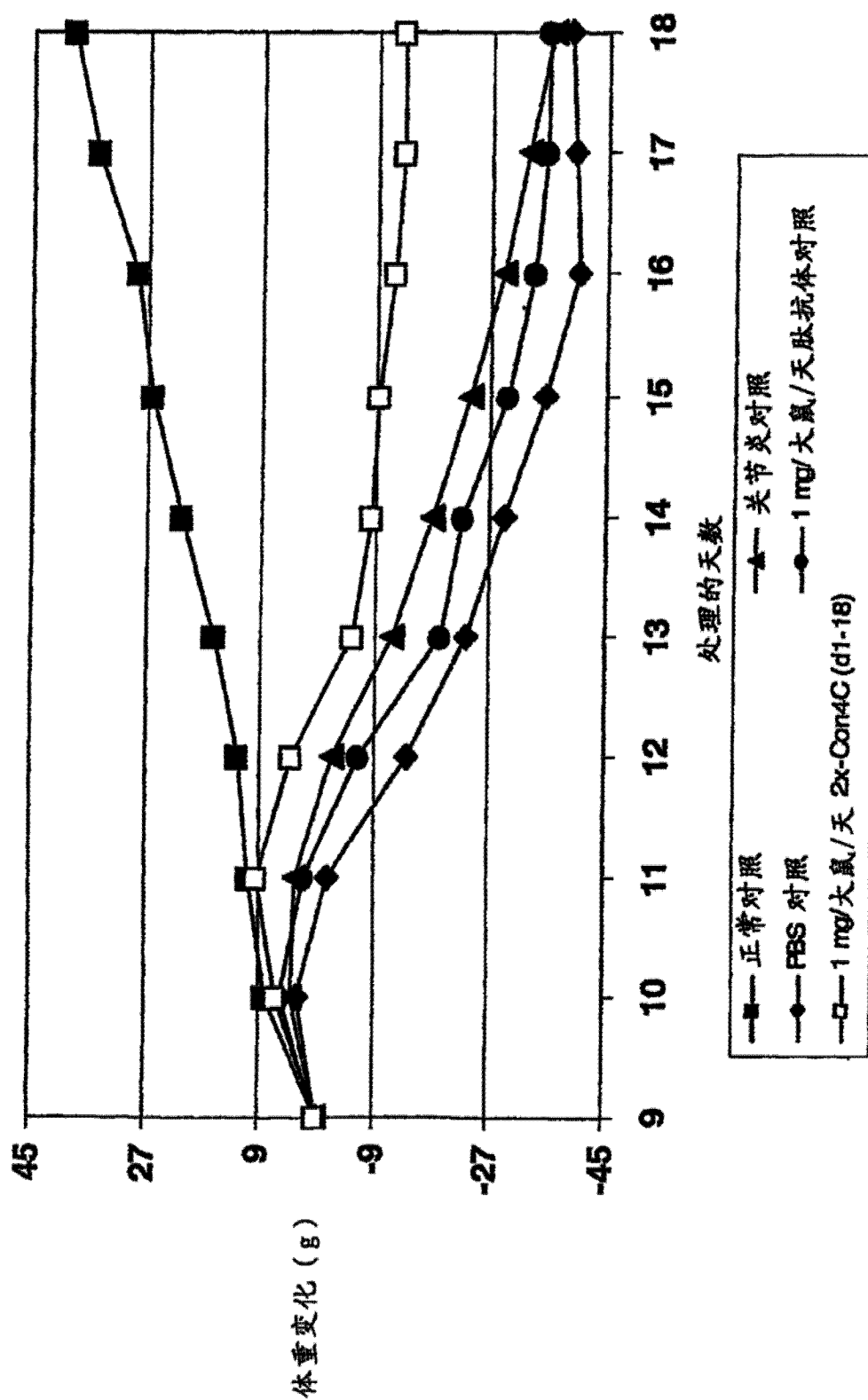


图 11c

CON4-C 肽抗体抑制
VEGF-诱导的角膜血管发生

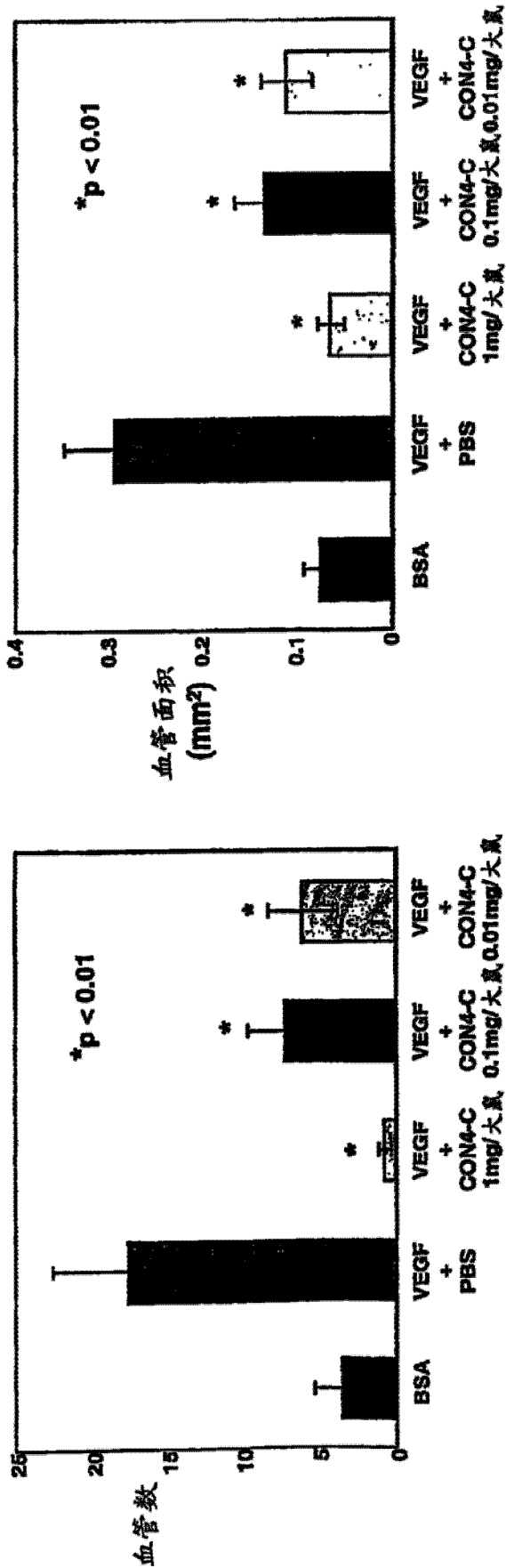


图 12

表位定位

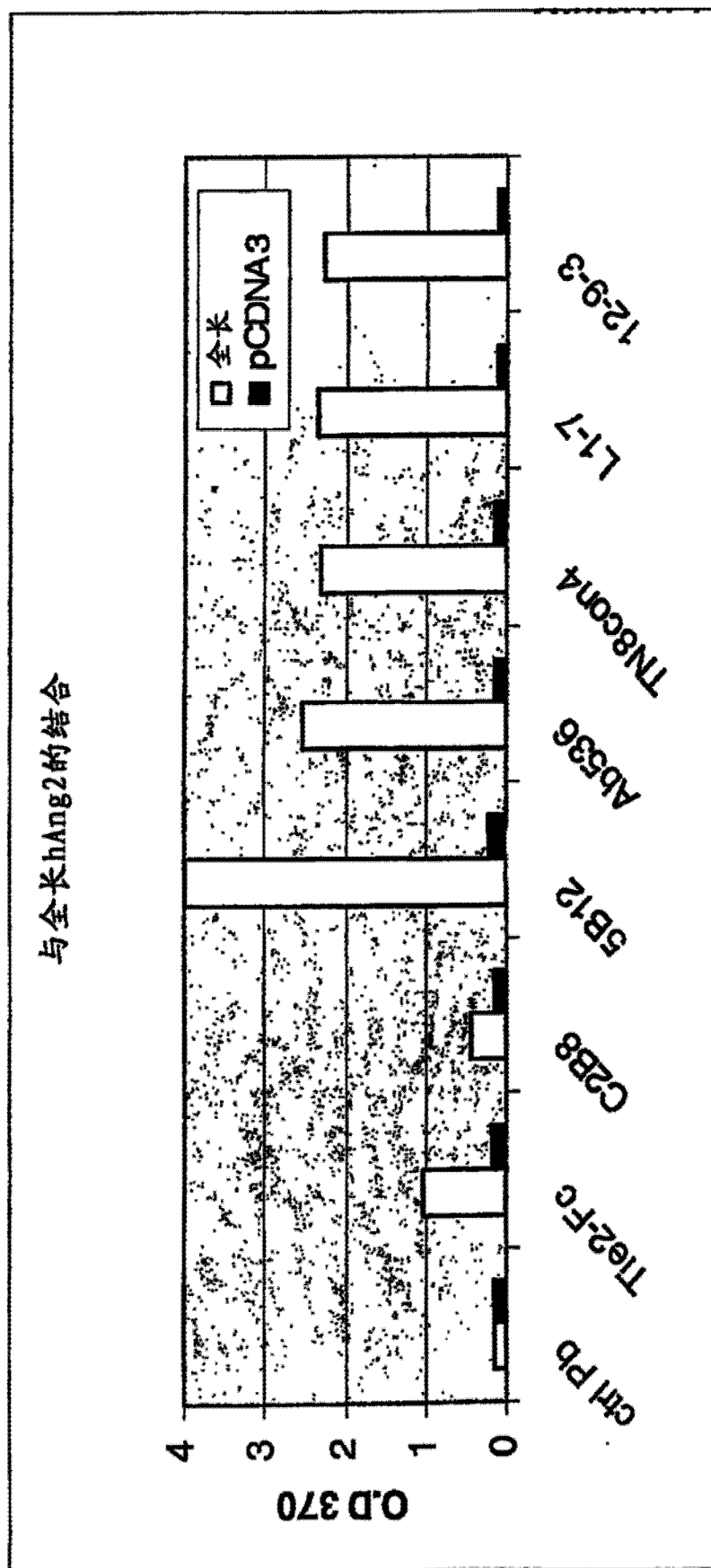


图 13a

表位定位

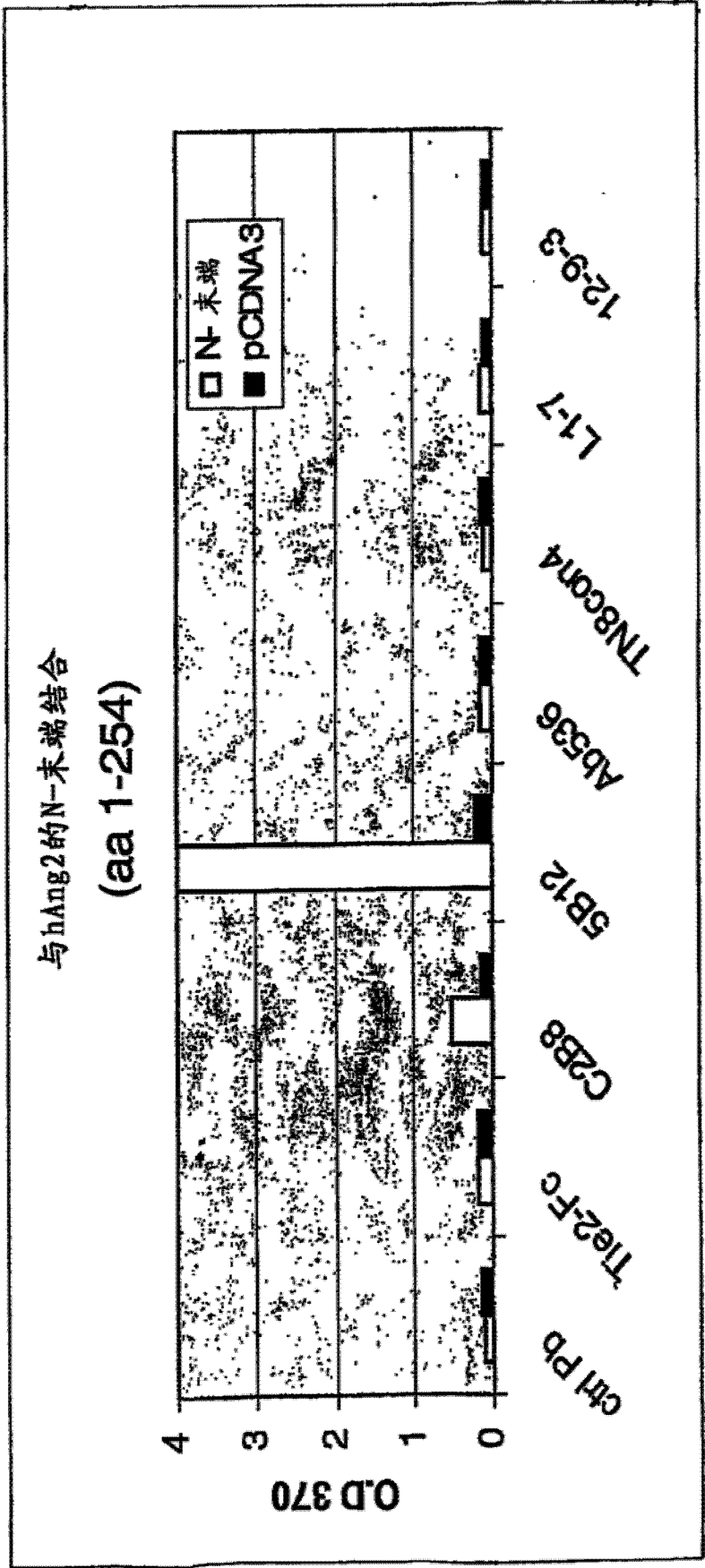


图 13b

表位定位

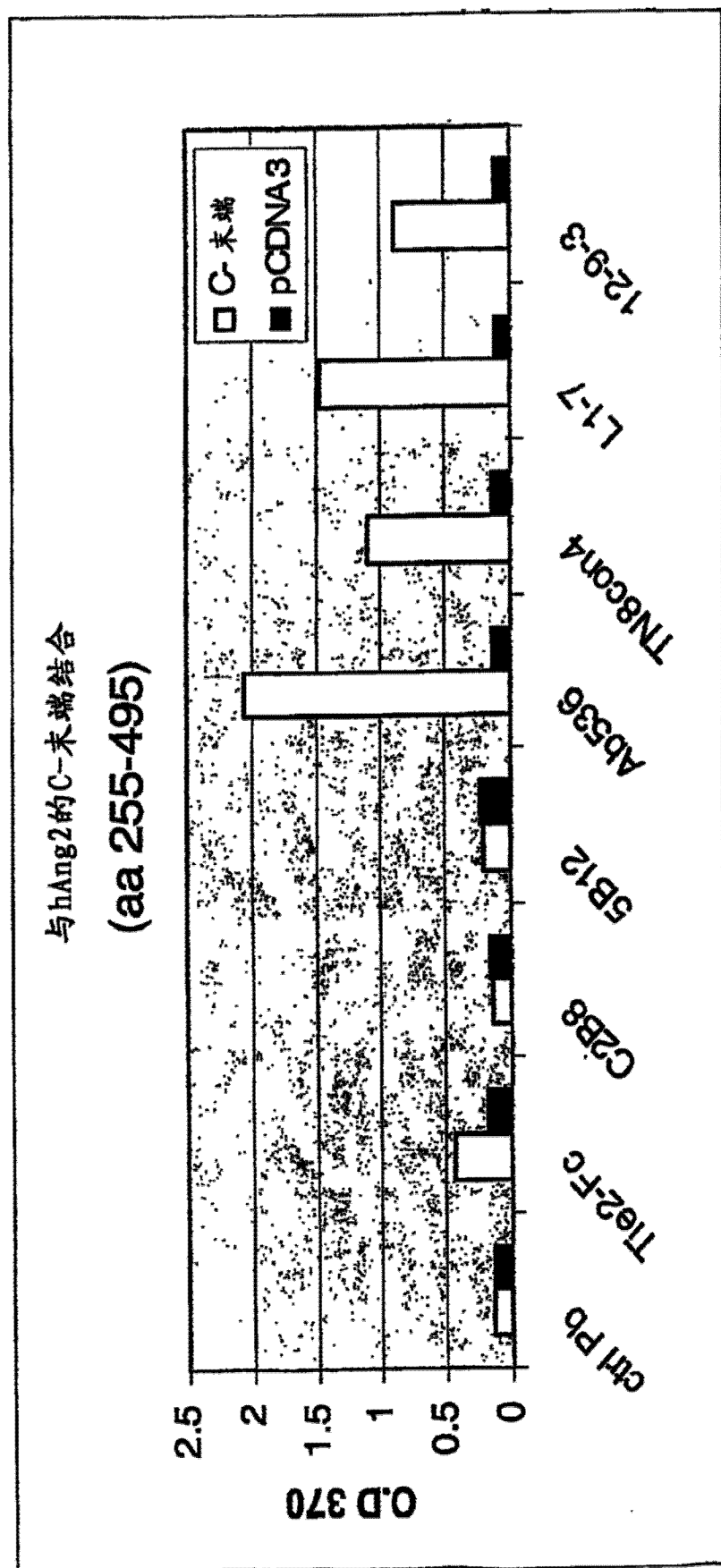


图 13c

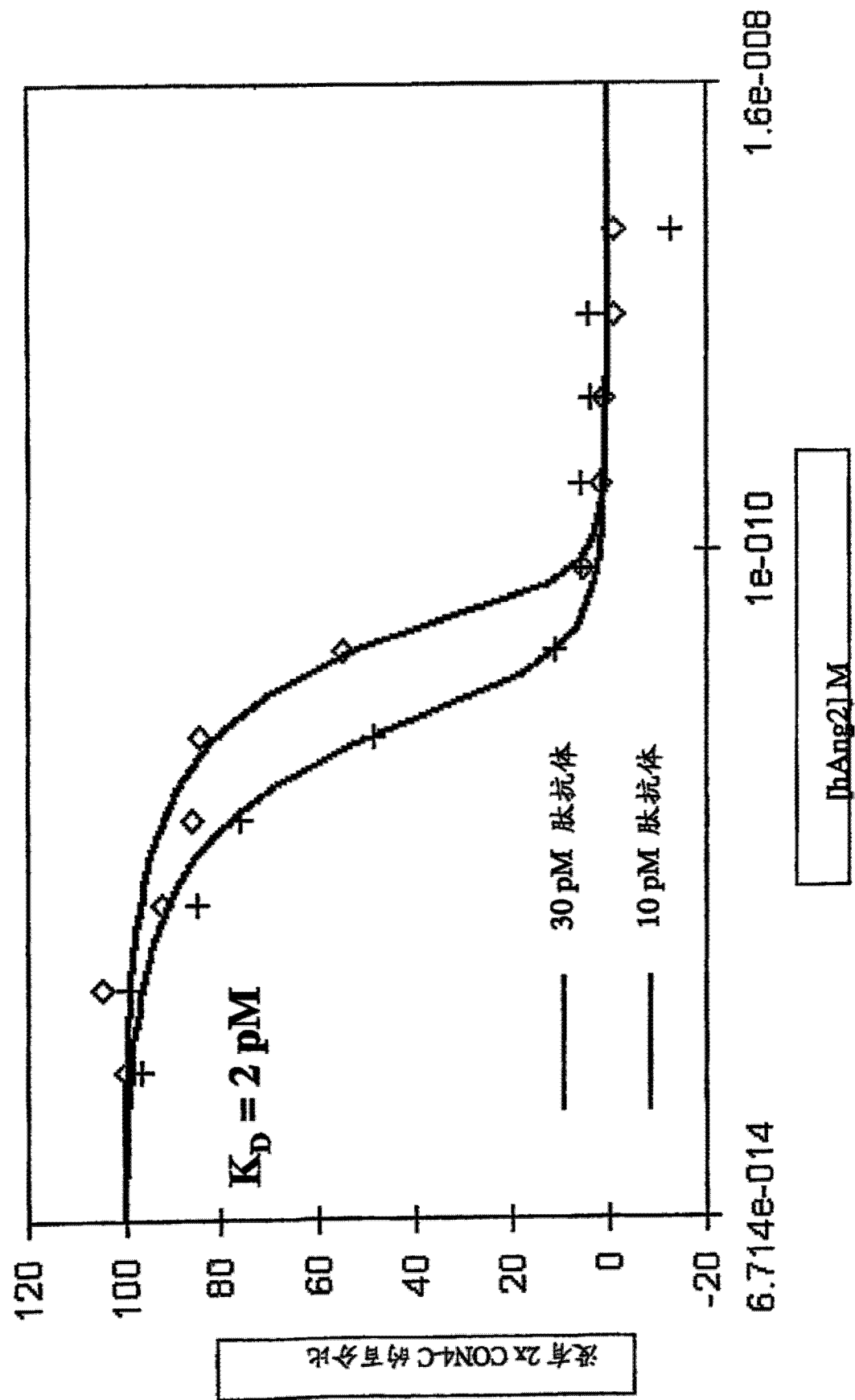


图 14