

Область, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к агентам специфического связывания, которые распознают ангиопэтин-2 (Ang-2) и связываются с ним. Более конкретно, изобретение относится к получению, диагностическому и терапевтическому применению специфически связывающихся агентов и их фрагментов, которые специфически связываются с Ang-2.

Предпосылки создания изобретения

Ангиогенез, образование новых кровеносных сосудов из уже имеющихся, является существенно важным для многих физиологических и патологических процессов. Обычно ангиогенез непосредственно регулируется про- и антиангиогенными факторами, но в случае таких болезней как рак, глазные ревазкулярные заболевания, артрит и псориаз, процесс может идти "неправильно". Folkman, J. Nat. Med., 1:27-31 (1995).

Известно, что многие заболевания ассоциируются с дисрегулируемым или нежелательным ангиогенезом. Такие заболевания включают, но без ограничения, глазную ревазкуляризацию, такую как ретинопатии (включая диабетическую ретинопатию), пятнистую дегенерацию, связанную со старением, псориаз, ангиоретикулёму, гемангиому, артериосклероз, воспалительное заболевание, такое как ревматоидное или ревматическое воспалительное заболевание, в особенности артрит (включая ревматоидный артрит), или другие хронические воспалительные заболевания, такие как хроническая астма, артериальный или пост-трансплантационный атеросклероз, эндометриоз и опухолевые заболевания, такие, например, как так называемые солидные опухоли и "жидкие" (или гемопоэтические) опухоли (такие как лейкомии и лимфомы). Другие заболевания, связанные с нежелательным ангиогенезом, очевидны для специалистов в данной области техники.

Хотя в регуляции ангиогенеза участвуют многие системы сигнальной трансдукции, одна из лучше всего охарактеризованных и наиболее селективных в отношении эндотелиальных клеток систем включает Tie-2 рецепторную тирозинкиназу (называемую как "Tie-2" или "Tie-2R" (также называемую "ORK")); мышиную Tie-2, называемую также "tec") и её лиганды, ангиопэтины (Gale, N.W. and Yancopoulos, O.D., Genes Dev. 13:1055-1066 [1999]). Существуют 4 известных ангиопэтина; от ангиопэтина-1 ("Ang-1") до ангиопэтина-4 ("Ang-4"). Эти ангиопэтины можно также называть "Tie-2 лиганды" (Davis, S., et al., Cell, 87:1161-1169 [1996]; Grosios, K., et al., Cytogenet. Cell Genet., 84:118-120 [1999]; Holash, J., et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science, 42(40?):1617-1625 [1999]; Koblizek, T.I., et al., Current Biology, 8:529-532 [1998]; Lin, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:8829-8834 [1998]; Maisonpierre, P.C., et al., Science, 277:55-60 [1997]; Papapetropoulos, A., et al., Lab. Invest., 79:213-223 [1999]; Sato, T.N., et al., Nature, 375:70-74 [1998]; Shyu, K.G., et al., Circulation, 98:2081-2087 [1998]; Suri, C., et al., Cell, 87:1171-1180 [1996]; Suri, C., et al., Science, 282:468-471 [1998]; Valenzuela, D.M., et al., Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 98:1904-1909 [1999]; Witzenbichler, B., et al., J. Biol. Chem., 273:18514-18521 [1998]). Наблюдали, что в то время как связывание Ang-1 с Tie-2 стимулирует рецепторное фосфорилирование в культивированных эндотелиальных клетках, Ang-2 является как агонистом, так и антагонистом Tie-2 рецепторного фосфорилирования (Davis, S., et al., [1996], см. выше; Maisonpierre, P.C., et al., [1997], см. выше; Kim, I., J.H. Kim, et al., Oncogene 19(39): 4549-4552 (2000); Teichert-Kuliszewski, K., P.C. Maisonpierre, et al., Cardiovascular Research 49(3): 659-70 (2001)).

Фенотипы нокауты мышей Tie-2 и Ang-1 сходны, и полагают, что стимулированное Ang-1 фосфорилирование Tie-2 опосредует реструктурирование и стабилизацию образующихся сосудов в матке за счёт сохранения клеточной адгезии к эндотелиальным клеткам в качестве подложки (Dumont, D.J., et al., Genes & Development, 8:1897-1909 [1994]; Sato, T.N., et al., Nature, 376:70-74 [1995]; Suri, C., et al., [1996], см. выше). Полагают, что роль Ang-1 в стабилизации сосудов сохраняется у взрослых, где он экспрессирует широко и конститутивно (Hanahan, O., Science, 277:48-50 [1997]; Zagzag, D., et al., Experimental Neurology, 159:391-400 [1999]). Напротив, экспрессия Ang-2, прежде всего, ограничена сайтами васкулярного (сосудистого) реструктурирования, где, как полагают, блокируется функция Ang-1, тем самым вызывается состояние сосудистой пластичности, ведущее к ангиогенезу (Hanahan, D., [1997], см. выше; Holash, J., et al., Science, 284:1994-1998 [1999]; Maisonpierre, P.C., et al., [1997], см. выше).

Многочисленные опубликованные исследования как будто демонстрируют экспрессию Ang-2 при болезненных состояниях, ассоциированных с ангиогенезом. (Bunone, G., et al., American Journal of Pathology, 155:1967-1976 [1999]; Etoh, T., et al., Cancer Research, 61:2145-2153 [2001]; Hangai, M., et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science, 42:1617-1625 [2001]; Holash, J., et al., [1999] см. выше; Kuroda, K., et al., Journal of Investigative Dermatology, 116:713-720 [2001]; Otani, A., et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science, 40:1912-1920 [1999]; Stratmann, A., et al., American Journal of Pathology, 153:1459-1466 [1998]; Tanaka, S., et al., J. Clin. Invest., 103:34-345 [1999]; Yoshida, Y., et al., International Journal of Oncology, 15:1221-1225 [1999]; Yuan, K., et al., Journal of Periodontal Research, 35:165-171 [2000]; Zagzag, D., et al., [1999] см. выше). Основная часть этих исследований сосредоточена на раке, при этом многие типы опухолей выявляют сосудистую экспрессию Ang-2. В отличие от его экспрессии при патологическом ангиогенезе экспрессия Ang-2 в нормальных тканях чрезвычайно ограничена (Maisonpierre, P.C., et al., [1997], см. выше; Mezquita, J., et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 260:492-498 [1999]). У здорового взрослого человека существуют три основных сайта ангиогенеза, это яичник, плацента и матка; эти ткани являются первичными в нормальных (не злокачественных) тканях, где обнаружена мРНК Ang-2.

В некоторых функциональных исследованиях высказывается предположение, что Ang-2 может принимать участие в ангиогенезе опухолей. Ahmad et al. (Cancer Res., 61:1255-1259 [2001]) описывает сверхэкспрессию Ang-2 и показывает на мышинной модели ксенотрансплантата, что она, по-видимому (якобы), ассоциирована с ускоренным (повышенным) ростом опухоли. См. также выше Etoh et al., и Tanaka et al., данные в которых предполагают связь сверхэкспрессии Ang-2 с гиперваскулярностью опухолей. Напротив, данные, сообщаемые Yu et al. (Am. J. Path., 158:563-570 [2001]), показывают, что сверхэкспрессия Ang-2 в раковых клетках при раке лёгкого Льюиса и в раковых клетках ТАЗ молочной железы, по-видимому, продлевает продолжительность жизни мышей, которым инъецированы соответствующие трансфектанты.

В последние несколько лет в различных публикациях предлагаются Ang-1, Ang-2 и/или Tie-2 в качестве возможной мишени для противораковой терапии. Например, в каждом из патентов США 6166185, 5650490 и 5814464 описываются представления об антителах против лиганда Tie-2 ligand и рецепторных "тельцах". Lin et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:8829-8834 [1998]) инъецировали аденовирус, экспрессирующий растворимый Tie-2, мышам; растворимый Tie-2, по-видимому (якобы), уменьшал число и размер опухолей, образовавшихся у мышей. Lin et al. (J. Clin. Invest., 100:2072-2078 [1997]), инъецировали растворимую форму Tie-2 крысам; как пишут, это соединение уменьшало размер опухолей у крыс. Siemeister et al. (Cancer Res., 59:3185-3189 [1999]) генерировали клеточные линии человеческой меланомы, экспрессирующие внеклеточную область Tie-2, инъецировали эти клеточные линии "голым" мышам и сделали вывод, что Tie-2 (как полагают) вызывает "заметное ингибирование" роста опухоли и ангиогенеза опухоли. В свете этой информации и при условии, что Ang-1 и Ang-2 связываются с Tie-2, из этих исследований не ясно, являются ли Ang-1, Ang-2 или Tie-2 привлекательными в качестве мишени для противораковой терапии.

Слияние некоторых пептидов с устойчивым плазменным белком, таким как константная область Ig, с целью увеличения периода полужизни этих молекул описано, например, в международной заявке РСТ WO 00/24782, опубликованной 4 мая 2000 г.

Слияние белка или его фрагмента с устойчивым белком плазмы, таким как константная область Ig, с целью увеличения периода полужизни этих молекул многократно описано (см., например, патент США 5480981; Zheng et al., J. Immunol., 154:5590-5600, (1995); Fisher et al., N. Engl. J. Med., 334:1697-1702, (1996); Van Zee, K. et al., J. Immunol., 156:2221-2230, (1996); патент США 5808029, выданный 15 сентября 1998 г.; Capon et al., Nature, 337:525-531, (1989); Harvill et al., Immunotech., 1:95-105, (1995); международная заявка WO 97/23614, опубликованная 3 июля 1997 г.; заявка РСТ/US 97/23183, поданная 11 декабря 1997 г.; Linsley, J. Exp. Med., 174:561-569, (1991); международная заявка WO 95/21258, опубликованная 10 августа 1995 г.).

Эффективная анти-Ang-2 может принести пользу многочисленной группе больных раком, так как для роста твёрдых опухолей более 1-2 мм в диаметре требуется реваскуляризация. Такая терапия могла бы найти более широкое применение при других ассоциированных с ангиогенезом заболеваниях, таких как ретинопатии, артрит и псориаз.

Существует настоятельная необходимость в идентификации новых агентов, которые специфически распознают Ang-2 и связываются с ним. Такие агенты были бы полезны для диагностического поиска и терапевтического вмешательства в болезненные состояния, ассоциированные с активностью Ang-2.

Таким образом, целью настоящего изобретения является создание специфических агентов для связывания Ang-2, которые модулируют активность Ang-2. Такие агенты по данному изобретению имеют форму "пептител" (peptibodies), т.е. пептидов, слитых с другими молекулами, такими как Fc домен антигена, при этом пептидный фрагмент специфически связывается с Ang-2.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение в одном своём варианте относится к пептидам (также называемым в данном описании "полипептиды"), которые связываются с Ang-2. Также данное изобретение охватывает варианты и производные таких пептидов.

В другом варианте изобретения пептиды и их варианты и производные по данному изобретению связаны с носителями.

В другом варианте изобретения пептиды могут быть слиты с Fc доменами, тем самым создавая "пептитела" (peptibodies). "Пептитела", необязательно, содержат по меньшей мере один пептид, например, из SEQ ID NO: 3-SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 76-SEQ ID NO: 157, а также их варианты и производные. Кроме того, пептиды могут содержать по меньшей мере один пептид, соответствующий формулам, представленным SEQ ID NO: 65-SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 158.

Ещё в одном варианте изобретения охватывает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие специфически связывающиеся агенты и их варианты и производные.

Ещё в одном варианте изобретения включает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих "пептитела", а также их варианты и производные. Необязательно, такие молекулы нуклеиновых кислот включают SEQ ID NO: 33-SEQ ID NO: 53.

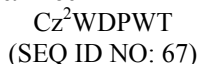
Ещё в одном варианте изобретения охватывает способ уменьшения опухоли путём введения эффективного количества специфически связывающихся агентов по настоящему изобретению нуждающемуся в этом субъекту. Изобретение также охватывает способ ингибирования ангиогенеза у субъекта, заключающийся во введении эффективного количества специфически связывающихся агентов по данному

изобретению нуждающемуся в нём субъекту. Кроме того, изобретение включает способ лечения рака субъекту, заключающийся во введении эффективного количества специфически связывающихся агентов по данному изобретению субъекту, нуждающемуся в этом.

Изобретение также относится к полипептиду, способному связывать Ang-2, причём этот полипептид содержит аминокислотную последовательность WDPWT (SEQ ID NO: 65) и длина этого полипептида 5-50 аминокислот, а также к его физиологически приемлемым солям. Изобретение может также включать полипептид с аминокислотной последовательностью



и его физиологически приемлемые соли. Кроме того, изобретение охватывает полипептид, который может содержать аминокислотную последовательность

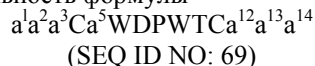


где z^2 представляет собой кислый или нейтральный полярный аминокислотный остаток, и его физиологически приемлемые соли. Кроме того, изобретение относится к полипептиду, который может содержать аминокислотную последовательность



где z^2 обозначает кислый или нейтральный полярный аминокислотный остаток, и его физиологически приемлемые соли.

В другом варианте изобретение относится к полипептиду, способному связываться с Ang-2, содержащим аминокислотную последовательность формулы



где a^1 , a^2 и a^3 , каждый независимо, обозначают аминокислотные остатки;

a^5 обозначает аминокислотный остаток;

a^{12} отсутствует или обозначает аминокислотный остаток;

a^{13} отсутствует или обозначает нейтральный гидрофобный, нейтральный полярный или основной аминокислотный остаток;

a^{14} обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

и его физиологически приемлемые соли.

В предпочтительном варианте изобретения

a^1 обозначает V, I, P, W, G, S, Q, N, E, K, R или H;

a^2 обозначает V, P, M, G, S, Q, D, E, K, R или H;

a^3 обозначает A, V, P, M, F, T, G, D, E, K или H;

a^8 обозначает A, V, G, Q, N, D или E;

a^{12} обозначает S, Q, N, D, E, K или R;

a^{13} обозначает L, T или H и

a^{14} обозначает V, L, I, W или M.

В более предпочтительном варианте изобретения

a^1 обозначает Q;

a^2 обозначает E;

a^3 обозначает E;

a^5 обозначает D или E;

a^{12} обозначает D или E;

a^{13} обозначает H и

a^{14} обозначает M.

Понятно, что строчные буквы (нижние литеры) с верхними индексами по данному описанию (например, a^1 и b^1) определяют положения аминокислот, но не являются однобуквенными сокращениями для данной аминокислоты.

Далее изобретение относится к полипептиду, способному связываться с Ang-2, содержащему аминокислотную последовательность формулы



где b^1 отсутствует или обозначает аминокислотный остаток;

b^2 отсутствует или обозначает нейтральный гидрофобный, нейтральный полярный или основной аминокислотный остаток;

b^3 , b^4 , b^5 и b^6 , каждый независимо, отсутствуют или обозначают аминокислотные остатки;

b^8 обозначает аминокислотный остаток;

b^{15} отсутствует или обозначает аминокислотный остаток;

b^{16} отсутствует или обозначает нейтральный гидрофобный, нейтральный полярный или основной аминокислотный остаток;

b¹⁷ отсутствует или обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

b¹⁸, b¹⁹ и b²⁰, каждый независимо, отсутствуют или обозначают аминокислотные остатки; и их физиологически приемлемые соли.

В предпочтительном варианте

b¹ отсутствует или обозначает A, V, L, P, W, F, T, G, S, Q, N, K, R или H;

b² отсутствует или обозначает A, V, L, I, P, W, M, T, G, S, Y, N, K, R или H;

b³ отсутствует или обозначает A, L, I, P, W, M, T, G, S, Q, N, E, R или H;

b⁴ обозначает V, I, P, W, G, S, Q, N, E, K, R или H;

b⁵ обозначает V, P, M, G, S, Q, D, E, K, R или H;

b⁶ обозначает A, V, P, M, F, T, G, D, E, K или H;

b⁸ обозначает A, V, G, Q, N, D или E;

b¹⁵ обозначает S, Q, N, D, E, K или R;

b¹⁶ обозначает L, T или H;

b¹⁷ обозначает V, L, I, W или M;

b¹⁸ отсутствует или обозначает A, V, L, P, W, F, T, G, Y, Q, D, E или R;

b¹⁹ отсутствует или обозначает V, L, I, P, T, G, S, Y, Q, N, D, E или R и

b²⁰ отсутствует или обозначает V, L, P, W, M, T, G, S, Y, Q, N, D, K или R.

В более предпочтительном варианте изобретения b¹ отсутствует или обозначает P или T; b² отсутствует или обозначает I или N; b³ отсутствует или обозначает R или I; b⁴ обозначает Q; b⁵ обозначает E; b⁶ обозначает E; b⁸ обозначает D или E; b¹⁵ обозначает D или E; b¹⁶ обозначает H; b¹⁷ обозначает M; b¹⁸ отсутствует или обозначает W или P; b¹⁹ отсутствует или обозначает G или E; и b²⁰ отсутствует или обозначает V или K.

Также будет оценено, что изобретение предпочтительно относится к полипептиду, содержащему по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 76-SEQ ID NO: 118 включительно, причём полипептид способен связываться с Ang-2, а также его физиологически приемлемые соли. Ниже представлены пептидные последовательности.

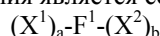
Таблица 1

ПЕПТИД	SEQ ID NO	ПЕПТИДНАЯ ПОСЛЕДОВА- ТЕЛЬНОСТЬ
Con4-44	76	PIRQEBCDWDPTCEHMEV
Con4-40	77	TNIQEBCDWDPTCDHMPGK
Con4-4	78	WYEQDACEWDPTCEHMAEV
Con4-31	79	NRLQEVCEWDPTCEHMENV
Con4-C5	80	AATQEBCDWDPTCEHMPRS
Con4-42	81	LRHQEGCEWDPTCEHMFWD
Con4-35	82	VPRQKCEWDPTCEHMYVG
Con4-43	83	SISHECEWDPTCEHMQVG
Con4-49	84	WAAQEBCDWDPTCEHMGRM
Con4-27	85	TWPQDKCEWDPTCEHMGST
Con4-48	86	GHSQEBCDWDPTCEHMGTS
Con4-46	87	QHWQEBCDWDPTCDHMPK
Con4-41	88	NVRQKCEWDPTCEHMPVR
Con4-36	89	KSGQVECNWDPTCEHMPRN
Con4-34	90	VKTQEHCDWDPTCEHMEW
Con4-28	91	AWGQEGCDWDPTCEHMLPM
Con4-39	92	PVNQEDCEWDPTCEHMPPM
Con4-25	93	RAPQEDCEWDPTCAHMDIK
Con4-50	94	HGQNMECEWDPTCEHMFY
Con4-38	95	PRLQEBCVWDPTCEHMLR
Con4-29	96	RTTQEKCEWDPTCEHMESQ
Con4-47	97	QTSQEDCVWDPTCDHVVSS
Con4-20	98	QVIGRPCEWDPTCEHLEGL
Con4-45	99	WAQQEBCAWDPTCDHMGVL
Con4-37	100	LPGQEDCEWDPTCEHMPRS
Con4-33	101	PMNQVECDWDPTCEHMPRS
AC2-Con4	102	FGWSHGCEWDPTCEHMGST
Con4-32	103	KSTQDDCDWDPTCEHMGVP
Con4-17	104	GPRISTCQWDPTCEHMDQL
Con4-8	105	STIGDMCEWDPTCAHMQVD
AC4-Con4	106	VLGGQGCCEWDPTCRLQGW
Con4-1	107	VLGGQGCQWDPTCSHLEDG

Con4-C1	108	TTIGSMCEWDPWTCAHMQGG
Con4-21	109	TKGKSVCQWDPWTCSHMQSG
Con4-C2	110	TTIGSMCQWDPWTCAHMQGG
Con4-18	111	WVNEVVCEWDPWTCNHWDTP
Con4-19	112	VVQVGMQWDPWTCCKHMLQ
Con4-16	113	AVGSQTCEWDPWTCANLVEV
Con4-11	114	QGMKMFCEWDPWTCANIVYR
Con4-C4	115	TTIGSMCQWDPWTCSEHMQGG
Con4-23	116	TSQVRGCEWDPWTCQHLTYT
Con4-15	117	QWSWPCEWDPWTCQTVWPS
Con4-9	118	GTSPFCQWDPWTCSEHMQG
TN8-Con4*	4	QEECEWDPWTCSEHM

*Следует понимать, что названия некоторых пептидов и/или "пептител" могут содержать префикс "TN", "TN8" или "TN12" и что этот префикс может присутствовать или может отсутствовать в названии (обозначении) данного "пептитела". Так например, в данном описании чередуются взаимозаменяемые термины "TN8-Con4" и "Con4".

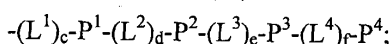
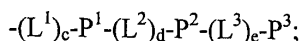
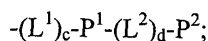
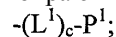
В другом варианте предметом изобретения является состав полипептида, отвечающий формуле



и его мультимеры,

где F^1 обозначает носитель;

X^1 и X^2 , каждый независимо, выбирают из



где один или более из P^1 , P^2 , P^3 и P^4 , каждый независимо, представляет собой полипептид по данному описанию. Например, в предпочтительном варианте изобретения P^1 , P^2 , P^3 и P^4 , каждый независимо, представляет собой полипептид SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 6 и/или SEQ ID NO: 76 - SEQ ID NO: 157.

В другом варианте предметом изобретения является состав полипептида, отвечающий формулам

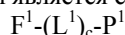


или



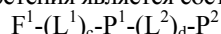
и его физиологически приемлемые соли, где X^1 , F^1 и X^2 имеют значение по данному описанию.

В другом варианте предметом изобретения является состав полипептида, соответствующий формуле



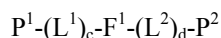
и его физиологически приемлемые соли, где L^1 , F^1 и P^1 имеют значение по определению в данном описании.

Ещё в одном варианте предметом изобретения является состав полипептида, соответствующий формуле



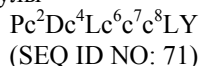
и его физиологически приемлемые соли, где L^1 , F^1 , P^1 , P^2 и c и d имеют значение по определению в данном описании.

Ещё в одном варианте предметом изобретения является состав полипептида, соответствующий формуле



и его физиологически приемлемые соли. В предпочтительном варианте изобретения F^1 обозначает домен Fc или его фрагмент.

Кроме того, изобретение относится к полипептиду, способному связывать Ang-2, содержащему аминокислотную последовательность формулы



где c^2 обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток;

c^4 обозначает A, D или E;

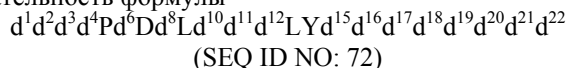
c^6 обозначает кислый аминокислотный остаток;

c^7 обозначает аминокислотный остаток и

c^8 обозначает нейтральный гидрофобный, нейтральный полярный или основной аминокислотный остаток,

и к его физиологически приемлемым солям. В предпочтительном варианте изобретения c^2 обозначает L или M. В другом предпочтительном варианте c^6 обозначает D или E.

Кроме того, изобретение относится к полипептиду, способному связываться с Ang-2, содержащему аминокислотную последовательность формулы



где d^1 отсутствует или обозначает аминокислотный остаток;

d^2 отсутствует или обозначает нейтральный полярный, кислый или основной аминокислотный остаток;
 d^3 отсутствует или обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;
 d^4 отсутствует или обозначает аминокислотный остаток;
 d^6 обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток;
 d^8 обозначает A, D или E;
 d^{10} обозначает кислый аминокислотный остаток;
 d^{11} обозначает аминокислотный остаток;
 d^{12} обозначает нейтральный гидрофобный, нейтральный полярный или основной аминокислотный остаток;
 d^{15} отсутствует или обозначает нейтральный полярный, кислый или основной аминокислотный остаток;
 d^{16} отсутствует или обозначает нейтральный полярный, кислый или основной аминокислотный остаток;
 d^{17} отсутствует или обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;
 d^{18} отсутствует или обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;
 d^{19} отсутствует или обозначает нейтральный гидрофобный, нейтральный полярный или основной аминокислотный остаток;
 d^{20} отсутствует или обозначает аминокислотный остаток;
 d^{21} отсутствует или обозначает нейтральный полярный, кислый или основной аминокислотный остаток;
 d^{22} отсутствует или обозначает нейтральный гидрофобный, нейтральный полярный или основной аминокислотный остаток;
и к его физиологически приемлемым солям.

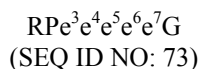
В предпочтительном варианте изобретения

d^1 обозначает T, S, Q, R или H;
 d^2 обозначает T, Q, N или K;
 d^3 обозначает F;
 d^4 обозначает M, Q, E или K;
 d^6 обозначает L или M;
 d^8 обозначает D или E;
 d^{10} обозначает E;
 d^{11} обозначает Q или E;
 d^{12} обозначает T или R;
 d^{15} обозначает Y, D, E или K;
 d^{16} обозначает Q;
 d^{17} обозначает W или F;
 d^{18} обозначает L, I, M или T;
 d^{19} обозначает L, F или Y;
 d^{20} обозначает Q, D или E;
 d^{21} отсутствует или обозначает Q или H;
 d^{22} отсутствует или обозначает A, L, G, S или R.

В предпочтительном варианте изобретения полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 119 - SEQ ID NO: 142 включительно, причём полипептид способен связываться с Ang-2. SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NOS: 119-142 представлены ниже.

Пептид	SEQ ID NO	Последовательность
L1-1	119	QNYKPLDELDATLYEHFIFHYT
L1-2	120	LNFTPLDELEQTLYEQWTLQQS
L1-3	121	TKFNPLDELEQTLYEQWTLQHQ
L1-4	122	VKFKPLDALEQTLYEHWMFQQA
L1-5	123	VKYKPLDELDEILYEQQTFQER
L1-7	124	TNFMPMDDLEQRLYEQFILQGG
L1-9	125	SKFKPLDELEQTLYEQWTLQHA
L1-10	126	QKFQPLDELEQTLYEQFMLQQA
L1-11	127	QNFKPMDELEDTLYKQFLQHS
L1-12	128	YKFTPLDDLEQTLYEQWTLQHV
L1-13	129	QEYEPDELDETLYNQWMFHQR
L1-14	130	SNFMPLDELEQTLYEQFMLQHQ
L1-15	131	QKYQPLDELDKTLYDQFMLQGG
L1-16	132	QKFQPLDELEETLYKQWTLQQR
L1-17	133	VKYKPLDELDEWLYHQFTLHHQ
L1-18	134	QKFMPLDELDEILYEQFMFQQS
L1-19	135	QTFQPLDDLEEYLYEQWIRRYH
L1-20	136	EDYMPDALDAQLYEQFILLHG
L1-21	137	HTFQPLDELEETLYYQWLYDQL
L1-22	138	YKFNPMDELEQTLYEEFLQHA
AC6-L1	139	TNYKPLDELDATLYEHWILQHS
L1-C1	140	QKFQPLDELEQTLYEQWTLQQR
L1-C2	141	TKFQPLDELDTLYEQWTLQQR
L1-C3	142	TNFQPLDELDTLYEQWTLQQR
L1	6	KFNPLDELEETLYEQFTFQQ

Изобретение также относится к полипептиду, способному связываться с Ang-2, содержащему аминокислотную последовательность формулы



где e^3 обозначает нейтральный полярный аминокислотный остаток;

e^4 обозначает кислый аминокислотный остаток;

e^5 обозначает нейтральный полярный или кислый аминокислотный остаток;

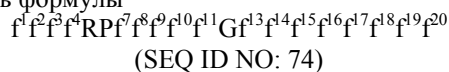
e^6 обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток;

e^7 обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток;

и к его физиологически приемлемым солям.

В предпочтительном варианте изобретения e^3 обозначает Y или C. В другом предпочтительном варианте изобретения e^4 обозначает D или E. Ещё в одном предпочтительном варианте изобретения e^6 обозначает I или M.

Далее изобретение относится к полипептиду, способному связываться с Ang-2, содержащему аминокислотную последовательность формулы



где f^1 обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

f^2 обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

f^3 обозначает нейтральный полярный или кислый аминокислотный остаток;

f^4 обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

f^7 обозначает нейтральный полярный аминокислотный остаток;

f^8 обозначает кислый аминокислотный остаток;

f^9 обозначает нейтральный полярный или кислый аминокислотный остаток;

f^{10} обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток;

f^{11} обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток;

f^{13} обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

f^{14} обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

f^{15} обозначает нейтральный полярный аминокислотный остаток;

f^{16} обозначает нейтральный полярный аминокислотный остаток;

f^{17} обозначает нейтральный полярный или кислый аминокислотный остаток;

f^{18} обозначает нейтральный гидрофобный или основной аминокислотный остаток;

f^{19} обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток и

f^{20} обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

и его физиологически приемлемым солям.

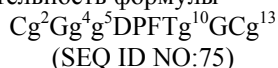
В предпочтительном варианте изобретения

- f¹ обозначает S, A или G;
- f² обозначает G, Q или P;
- f³ обозначает Q, G или D;
- f⁴ обозначает L, M или Q;
- f⁷ обозначает C или Y;
- f⁸ обозначает E или D;
- f⁹ обозначает E, G или D;
- f¹⁰ обозначает I или M;
- f¹¹ обозначает F или L;
- f¹³ обозначает C или W;
- f¹⁴ обозначает G или P;
- f¹⁵ обозначает T или N;
- f¹⁶ обозначает Q, Y или K;
- f¹⁷ обозначает N, D или Q;
- f¹⁸ обозначает L, V, W или R;
- f¹⁹ обозначает A, Q, Y или I и
- f²⁰ обозначает L, A, G или V.

В более предпочтительном варианте изобретение относится к полипептиду, содержащему по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 143 - SEQ ID NO: 148 включительно, причём полипептид способен связываться с Ang-2, и к его физиологически приемлемым солям. SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 143 - SEQ ID NO: 148 суть следующие.

Пептид	SEQ ID NO	Последовательность
Con1-1	143	AGGMRPYDGMGLGWPNYDVQA
Con1-2	144	QTWDDPCMHLGPVTWRRCI
Con1-3	145	APGQRPYDGMGLGWPTYQRIV
Con1-4	146	SGQLRPCEEIFGCGTQNLA
Con1-5	147	FGDKRPLECMFGGPIQLCPR
Con1-6	148	GQDLRPCEDMFGCGTKDWYG
Con1	3	KRPCEEIFGGCTYQ

Ещё в одном аспекте изобретение относится к полипептиду, способному связываться с Ang-2, содержащему аминокислотную последовательность формулы



где g² обозначает кислый аминокислотный остаток;

g⁴ обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток;

g⁵ обозначает E, D или Q;

g¹⁰ обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

g¹³ обозначает кислый остаток;

и к его физиологически приемлемым солям. В предпочтительном варианте изобретения g² обозначает E или D. В другом предпочтительном варианте изобретения g⁴ обозначает V или M. Ещё в одном варианте изобретения g¹⁰ обозначает F или Q. И еще в одном варианте изобретения g¹³ обозначает D или E.

Далее изобретение относится к полипептиду, способному связываться с Ang-2, содержащему аминокислотную последовательность формулы



где h¹ отсутствует или обозначает нейтральный гидрофобный, нейтральный полярный или основной аминокислотный остаток;

h² обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

h³ обозначает кислый аминокислотный остаток;

h⁴ обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

h⁶ обозначает кислый аминокислотный остаток;

h⁸ обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток;

h⁹ обозначает E, D или Q;

h¹⁴ обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

h¹⁷ обозначает кислый аминокислотный остаток;

h¹⁸ обозначает нейтральный гидрофобный, нейтральный полярный или основной аминокислотный

остаток;

h^{19} обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток и

h^{20} отсутствует или обозначает аминокислотный остаток;

и к его физиологически приемлемым солям.

В предпочтительном варианте изобретения

h^1 отсутствует или обозначает A, L, M, G, K или H;

h^2 обозначает L, F или Q;

h^3 обозначает D или E;

h^4 обозначает W или Y;

h^6 обозначает D или E;

h^8 обозначает V или M;

h^{14} обозначает F или Q;

h^{17} обозначает D или E;

h^{18} обозначает M, Y, N или K;

h^{19} обозначает L или Q и

h^{20} отсутствует или обозначает M, T, G, S, D, K или R.

В более предпочтительном варианте изобретение относится к полипептиду, содержащему по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 149 - SEQ ID NO: 157 включительно, причём указанный полипептид способен связываться с Ang-2, и к его физиологически приемлемым солям. SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 149 - SEQ ID NO: 157 представлены ниже.

Пептид	SEQ ID NO	Последовательность
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

В наиболее предпочтительном варианте изобретение относится к составу полипептида, имеющему формулу

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

и его мультимерам,

где F^1 обозначает носитель;

X^1 и X^2 , каждый независимо, выбирают из

$-(L^1)_s-H^1$;

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

$-(L^1)_s-P^1-(L^2)_t-P^2-(L^3)_u-P^3$; и

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

где один или более из P^1 , P^2 , P^3 и P^4 , каждый независимо, представляют собой полипептид, выбранный из группы, состоящей из:

(a) аминокислотной последовательности WDPWT (SEQ ID NO: 65), причём указанный пептид имеет в длину 5-50 аминокислот;

(b) аминокислотной последовательности WDPWTC (SEQ ID NO: 66);

(c) аминокислотной последовательности Cz^2 WDPWT (SEQ ID NO: 67), где z^2 обозначает кислый или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

(d) аминокислотной последовательности Cz^2 WDPWTC (SEQ ID NO: 68), где z^2 обозначает кислый или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

(e) аминокислотной последовательности $Pe^2Dc^4Lc^6c^7c^8LY$ (SEQ ID NO: 71), где c^2 обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток; c^4 обозначает A, D или E; c^6 обозначает кислый аминокислотный остаток; c^7 обозначает аминокислотный остаток и c^8 обозначает нейтральный гидрофобный, нейтральный полярный или основной аминокислотный остаток;

(f) аминокислотной последовательности $RPe^3e^4e^5e^6e^7G$ (SEQ ID NO: 73), где e^3 обозначает нейтральный полярный аминокислотный остаток; e^4 обозначает кислый аминокислотный остаток; e^5 обозначает нейтральный полярный или кислый аминокислотный остаток; e^6 обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток и e^7 обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток;

(g) аминокислотной последовательности $Cg^2Cg^4g^5DPFTg^{10}GCg^{13}$ (SEQ ID NO: 75), где g^2 обозначает кислый аминокислотный остаток; g^4 обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток; g^5 обозначает нейтральный полярный или кислый аминокислотный остаток; g^{10} обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток и g^{13} обозначает кислый остаток;

(h) полипептида SEQ ID NO: 1;

(i) полипептида SEQ ID NO: 2 и

(j) полипептида SEQ ID NO: 7;

где L^1 , L^2 , L^3 и L^4 , каждый независимо, обозначают линкеры; и q, r, s, t, u и v, каждый независимо, обозначают 0 или 1, при условии, что по меньшей мере один из q и r обозначает 1;

и к его физиологически приемлемым солям.

Будет оценено, что изобретение, кроме того, относится к слитому полипептиду, содержащему по меньшей мере один пептид по данному описанию и носитель, причём слитый полипептид способен связываться с Ang-2, и к его физиологически приемлемым солям. В слитом полипептиде носителем является по меньшей мере один из ряда: Fc домен, полиэтиленгликоль, липид, группа холестерина, углевод, олигосахарид. Другие подходящие носители, такие как альбумин и т.п., будут оценены специалистами в данной области техники и входят в объём изобретения.

Специалист в данной области техники понимает, что в структуру специфически связывающегося агента могут быть встроены различные молекулы. Так, данную молекулу можно ввести, например, между участками пептида и носителя специфически связывающихся агентов или внутри участка самого пептида, при сохранении заданной активности специфически связывающегося агента. Можно легко встроить, например, такие молекулы, как Fc домен или его фрагмент, полиэтиленгликоль или другие родственные молекулы, такие как декстран, жирная кислота, липид, группа холестерина, низкомолекулярный углевод, пептид, цитотоксический агент, химиотерапевтический агент, обнаруживаемый фрагмент, такой как представленный в данном описании (включая флуоресцентные агенты, радиоактивные метки, такие как радиоизотопы), олигосахарид, олигонуклеотид, полинуклеотид, "интерференционная" (или другая) РНК, ферменты, гормоны и т.п. Другие молекулы, пригодные для внедрения таким образом, будут понятны специалисту в данной области и входят в объём данного изобретения. Сюда входит, например, инсерция заданной молекулы между двумя последовательными аминокислотами, необязательно соединёнными соответствующим линкером. В качестве примера приведена последовательность Con4(C) "пептитела"

M-Fc-GGGGGAQQEECEWDPWTCEHMLE

(SEQ ID NO: 23)

Специалист в данной области техники может легко встроить заданную молекулу, например, между двумя остатками глутамина ("QQ") для получения заданной структуры и/или функции при сохранении способности пептида связывать Ang-2. Так, эту последовательность можно модифицировать следующим образом:

M-Fc-GGGGGAQ-[молекула]-QEECEWDPWTCEHMLE

Если требуется, можно добавить линкерные молекулы. Кроме того, понятно, что молекулу можно встроить в различные местоположения в молекуле, включая подходящие боковые цепи, между носителем и пептидной последовательностью, как показано ниже

M-Fc-[молекула]-GGGGGAQQEECEWDPWTCEHMLE

или в любом другом месте по желанию специалиста в данной области техники. Другие подходящие варианты изобретения будут понятны специалистам в данной области техники.

Ещё в одном варианте изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему специфические связывающие агенты (включая, но без ограничения, пептиды и/или "пептитела") по изобретению по данному описанию. Специалист в данной области техники понимает, что если известна аминокислотная последовательность, то с помощью известных методов можно легко определить соответствующую(ие) нуклеотидную(ые) последовательность(и). См., например, Suzuki, D., An Introduction to Genetic Analysis, W.H. Freeman Pub. Co. (1986). Примеры нуклеотидных последовательностей, кодирующих пептиды по изобретению, представлены ниже. Специалист в данной области техники знает, что данную аминокислоту могут кодировать более одного кодона, и, следовательно, изобретение относится к любым нуклеотидным последовательностям, которые кодируют пептиды и/или "пептитела" по изобретению.

Пептид	Seq Id No	Пептидная последовательность	Примеры ДНК- последовательностей
Con4-44	76	PIRQEEDWDPWTCEHMWEV	ccgatccgtcaggaagaatgcga ctgggacccgtggacctgcgaac acatgtgggaagt (SEQ ID NO: 159)
Con4-40	77	TNIQEECEWDPWTCDHMPGK	accaacatccaggaagaatgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatgccggtaaa (SEQ ID NO: 160)
Con4-4	78	WYEQDACEWDPWTCEHMAEV	tggtacgaacaggacgttcga atgggacccgtggacctgcgaac acatgctgaagt (SEQ ID NO: 161)
Con4-31	79	NRLQEVCEWDPWTCEHMENV	aaccgtctcaggaagttgcga tgggacccgtggacctgcgaaca catggaaacgt (SEQ ID NO: 162)
Con4- C5	80	AATQEECEWDPWTCEHMPRS	gctgctaccaggaagaatgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatgccgctcc (SEQ ID NO: 163)
Con4-42	81	LRHQEGCEWDPWTCEHMFWD	ctgcgtcaccaggaagttgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatgttcgactgg (SEQ ID NO: 164)
Con4-35	82	VPRQKDCEWDPWTCEHMYVG	gttcgcgtcagaaagactgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatgtactgtgt (SEQ ID NO: 165)
Con4-43	83	SISHEECEWDPWTCEHMQVG	tccatctcccacgaagaatgcga tgggacccgtggacctgcgaaca catgcaggtgtgt (SEQ ID NO: 360)
Con4-49	84	WAAQECEWDPWTCEHMGRM	tgggctgctcaggaagaatgcga atgggatccgtggacctgcgaaca catgggtcgtatg (SEQ ID NO: 166)
Con4-27	85	TWPQDKCEWDPWTCEHMGST	acttgccgcaggacaaatgcga atgggatccgtggacctgcgaaca catgggttctact (SEQ ID NO: 167)

Con4-48	86	GHSQEBCGWDPTCEHMGTS	gggtcactccaggagaagaatgcgg ttgggacccgtggacctgcgaac acatgggtacgtcc (SEQ ID NO: 168)
Con4-46	87	QHWQEBCWDPTCDHMPK	cagcactggcaggagaagaatgcga atgggacccgtggacctgcgacc acatgccgtccaaa (SEQ ID NO: 169)
Con4-41	88	NVRQEKCEWDPTCEHMPVR	aacgttcgtcaggaaaaatgcgaa ttgggacccgtggacctgcgaaca catgccgggttcgt (SEQ ID NO: 170)
Con4-36	89	KSGQVECNWDPTCEHMPRN	aaatccgggtcaggttgatgcgaac ttgggacccgtggacctgcgaaca catgccggtaac (SEQ ID NO: 171)
Con4-34	90	VKTQEHCDWDPTCEHMPREW	gttaaaacccaggaaactgcga ctgggacccgtggacctgcgaac acatgcgtgaatgg (SEQ ID NO: 172)
Con4-28	91	AWGQEGCDWDPTCEHMLPM	gcttgggggtcaggaggttcga ctgggacccgtggacctgcgaac acatgctgccgatg (SEQ ID NO: 173)
Con4-39	92	PVNQEDCEWDPTCEHMPPM	ccggttaaccaggaaactgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatgccgccgatg (SEQ ID NO: 174)
Con4-25	93	RAPQEDCEWDPTCAHMDIK	cgtgctccaggaaactgcga atgggacccgtggacctgcgctc acatggacatcaa (SEQ ID NO: 175)
Con4-50	94	HGQNMECEWDPTCEHMPRY	cacgggtcagaacatggaatgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatgttccgttac (SEQ ID NO: 176)
Con4-38	95	PRLQECCVWDPTCEHMPRL	ccgcgtctcaggagaagaatgcgtt ttgggacccgtggacctgcgaaca catgccgctcgtg (SEQ ID NO: 177)
Con4-29	96	RTTQEKCEWDPTCEHMESQ	cgtaaccaccaggaaaaatgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatggaatcccag (SEQ ID NO: 178)
Con4-47	97	QTSQEDCVWDPTCDHMOVSS	cagacctccaggaaactgcgtt ttgggacccgtggacctgcgacca catggtttctccc (SEQ ID NO: 179)
Con4-20	98	QVIGRPEWDPTCEHLEGL	caggttatcgggtcgtccgtgcga ttgggacccgtggacctgcgaaca cctggaaggtctg (SEQ ID NO: 180)
Con4-45	99	WAQQECAWDPTCDHMOVGL	ttgggtcagcaggagaagaatgcgc ttgggacccgtggacctgcgacc acatggttggtctg (SEQ ID NO: 181)
Con4-37	100	LPGQEDCEWDPTCEHMPRS	ctgccgggtcaggaaactgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatggttctgtcc (SEQ ID NO: 182)
Con4-33	101	PMNQVECDWDPTCEHMPRS	ccgatgaaccagggtgaatgcga ctgggacccgtggacctgcgaac acatgccgcgttcc (SEQ ID NO: 183)
AC2- Con4	102	FGWSHGCEWDPTCEHMGST	ttcgttgggtctcaggttcggaat gggatccgtgacttcggaacac atgggttctacc (SEQ ID NO: 184)
Con4-32	103	KSTQDDCDWDPTCEHMPVGP	aaatccaccaggacgactgcga ctgggacccgtggacctgcgaac acatggttggtccg (SEQ ID NO: 185)
Con4-17	104	GPRISTCQWDPTCEHMDQL	gggtccgcgtatctccactgccag ttgggacccgtggacctgcgaaca catggaccagctg (SEQ ID NO: 186)
Con4-8	105	STIGDMCEWDPTCAHMQVD	tccaccatcggtgacatgtgcga ttgggacccgtggacctgcgtca catgcagggtgac (SEQ ID NO: 187)
AC4- Con4	106	VLGGQGCEWDPTCRLQGW	gtttgggtgggtcagggttcgaa ttgggacccgtggacctgccgtctg ctgcagggttgg (SEQ ID NO: 188)
Con4-1	107	VLGGQGCQWDPTCSHLEDG	gttctgggtgggtcagggttgccag ttgggacccgtggacctgctcca cctggaagacggt (SEQ ID NO: 189)

Con4-C1	108	TTIGSMCEWDPWTCAHMQGG	accaccatcggttccatgtgcgaa tgggacccgtggacctgcgctca catgcagggtggt (SEQ ID NO: 190)
Con4-21	109	TKGKSVCQWDPWTCSHMQSG	accaaaggtaaatccgtttgccag tgggacccgtggacctgcctcca catgcaggtccggt (SEQ ID NO: 191)
Con4-C2	110	TTIGSMCQWDPWTCAHMQGG	accaccatcggttccatgtgccag tgggacccgtggacctgcgctca catgcagggtggt (SEQ ID NO: 192)
Con4-18	111	WVNEVVCEWDPWTCNHWDTP	tgggttaacgaagtgttgcgaat gggacccgtggacctgcaaccac tgggacaccccg (SEQ ID NO: 193)
Con4-19	112	VVQVGMQWDPWTCKHMLQ	gtgttcagggttgatgtgccagt gggacccgtggacctgcaaacac atcgctctgcag (SEQ ID NO: 194)
Con4-16	113	AVGSQTCEWDPWTCAHLVEV	gctgttggtcccagacctgcgaat gggacccgtggacctgcgctcac ctggttgaggt (SEQ ID NO: 195)
Con4-11	114	QGMKMFCEWDPWTCAHIVYR	cagggtatgaaatgttgcgaat gggacccgtggacctgcgctcac atcggttacgt (SEQ ID NO: 196)
Con4-C4	115	TTIGSMCQWDPWTCEHMQGG	accaccatcggttccatgtgccag tgggacccgtggacctgcgaaca catgcagggtggt (SEQ ID NO: 197)
Con4-23	116	TSQRVGCEWDPWTCQHLYT	acctcccagcgtgttggtgcgaat gggacccgtggacctgccagcac ctgacctacacc (SEQ ID NO: 198)
Con4-15	117	QWSWPPCEWDPWTCQTVWPS	cagtgtctctggccgctgcga atgggacccgtggacctgccaga ccgtttggccgtcc (SEQ ID NO: 199)
Con4-9	118	GTSPSFCQWDPWTCSHMQG	ggtacctccccgtcttctgccagt gggacccgtggacctgtcccac atggttcagggt (SEQ ID NO: 200)
TN8-Con4	4	QEECEWDPWTCEHM	caggaagaatgcgaatgggaccc atggactgcgaacacatg (SEQ ID NO: 201)

L1-1	119	QNYKPLDELDATLYEHFIFHYT	cagaactacaaccgctggacga actggacgctaccctgtacgaaca cttcattctccactacacc (SEQ ID NO: 202)
L1-2	120	LNFTPLDELEQTLYEQWTLQQS	ctgaactcaccgctggacgaa ctggaacagaccctgtacgaaca gtggaccctgcagcagctcc (SEQ ID NO: 203)
L1-3	121	TKFNPLDELEQTLYEQWTLQHQ	accaaattcaaccgctggacga actggaacagaccctgtacgaac agtggaccctgcagcaccag (SEQ ID NO: 204)
L1-4	122	VKFKPLDALEQTLYEHWMFQQA	gttaaattcaaccgctggacgct ctggaacagaccctgtacgaaca ctggatgtccagcaggct (SEQ ID NO: 205)
L1-5	123	VKYKPLDELDEILYEQQTQER	gttaaatacaaccgctggacgaa ctggacgaaatcctgtacgaacag cagaccctccaggaacgt (SEQ ID NO: 206)
L1-7	124	TNFMPMDDLEQRLYEQFILQQG	accaactcatgccgatggacgac ctggaacagcgtctgtacgaaca gttcattcctgcagcagggt (SEQ ID NO: 207)
L1-9	125	SKFKPLDELEQTLYEQWTLQHA	tccaaattcaaccgctggacgaa ctggaacagaccctgtacgaaca gtggaccctgcagcagcgt (SEQ ID NO: 208)
L1-10	126	QKFQPLDELEQTLYEQFMLQQA	cagaaattccagccgctggacga actggaacagaccctgtacgaac agttcatgctgcagcaggct (SEQ ID NO: 209)
L1-11	127	QNFKPMDELEDTLYKQFLQHS	cagaactcaaacgatggacga attggaagacaccctgtacaaaca gttcctgtccagcactcc (SEQ ID NO: 210)
L1-12	128	YKFTPLDDLEQTLYEQWTLQHV	tacaaattcaccgctggacgac ctggaacagaccctgtacgaaca gtggaccctgcagcagctt (SEQ ID NO: 211)
L1-13	129	QEYEPLDELDETLYNQWMFHQR	caggaatacgaaccgctggacga actggacgaaaccctgtacaacc agtggatgtccaccagcgt (SEQ ID NO: 212)

L1-14	130	SNFMPLDELEQTLYEQFMLQHQ	tccaactcatgccgctggacgaa ctggaacagaccctgtacgaaca gttcctgctgcagcaccag (SEQ ID NO: 213)
L1-15	131	QKYQPLDELDKTLYDQFMLQQG	cagaaattaccagccgctggacga actggacaaaaccctgtacgatca gttcctgctgcagcagggt (SEQ ID NO: 214)
L1-16	132	QKFQPLDELEETLYKQWTLQQR	cagaaattccagccgctggacga actggaagaaccctgtacaaac agtggaccctgcagcagcgt (SEQ ID NO: 215)
L1-17	133	VKYKPLDELDWLYHQFTLHHQ	gttaaatcaaaaccgctggacgaa ctggacgaatggctgtaccacca gttcaccctgcaccaccag (SEQ ID NO: 216)
L1-18	134	QKFMPLDELEILYEQFMFQQS	cagaaattcatgccgctggacgaa ctggacgaatcctgtacgaacag ttcatgtccagcagtcctc (SEQ ID NO: 217)
L1-19	135	QTFQPLDDLEEYLYEQWIRRYH	cagacctccagccgctggacga cctggaagaatactgtacgaaca gtggatccgtgttaccac (SEQ ID NO: 218)
L1-20	136	EDYMPLDALDAQLYEQFILLHG	gaagactacatgccgctggacgc tctggacgctcagctgtacgaaca gttcctcctgctgcagcgt (SEQ ID NO: 219)
L1-21	137	HTFQPLDELEETLYYQWLYDQL	cacacctccagccgctggacga actggaagaaccctgtactacca gtggctgtacgaccagctg (SEQ ID NO: 220)
L1-22	138	YKFNPMDELEQTLYEEFLQHA	tacaaattcaaccgatggacgaa ctggaacagaccctgtacgaaga attcctgttcagcagcgt (SEQ ID NO: 221)
AC6-L1	139	TNYKPLDELDATLYEHWILQHS	accaactacaaccgctggacga actggacgctaccctgtacgaaca ctggatcctgcagcactcc (SEQ ID NO: 222)
L1-C1	140	QKFKPLDELEQTLYEQWTLQQR	cagaaattcaaccgctggacga actggaacagaccctgtacgaac agtggaccctgcagcagcgt (SEQ ID NO: 223)
L1-C2	141	TKFQPLDELDQTLYEQWTLQQR	accaaattccagccgctggacga actggaccagaccctgtacgaac agtggaccctgcagcagcgt (SEQ ID NO: 224)

L1-C3	142	TNFQPLDELDQTLYEQWTLQQR	accaactccagccgctggacga actggaccagaccctgtacgaac agtggaccctgcagcagcgt (SEQ ID NO: 225)
L1	6	KFNPLDELEETLYEQFTFQQ	aaattcaacccgctggacgagctg gaagagactctgtacgaacagttt acttttaacag (SEQ ID NO: 226)
Con1-1	143	AGGMRPYDGM LGWPNYDVQA	gctgggtgtatgctccgtacgac ggatgctgggtggccgaactac gacgttcaggct (SEQ ID NO: 227)
Con1-2	144	QTDWDDPCMHILGPVTWRRCI	cagacttgggacgatccgtgcatg cacattctgggtccggttacttggc gtcgttgcatc (SEQ ID NO: 228)
Con1-3	145	APGQRPYDGM LGWPTYQRIV	gtcccggttcagcgtccgtacga cggtatgctgggtggccgaacta ccagcgtatcgtt (SEQ ID NO: 229)
Con1-4	146	SGQLRPCCEIFGCGTQNLAL	tccggtcagctgcgtccgtcgaa gaaatcttcggttgcgtaccag aacctggctctg (SEQ ID NO: 230)
Con1-5	147	FGDKRPLECMFPGPIQLCPR	ttcgggtgacaaacgtccgtgaa tgcatgttcgggtgctccgatccag ctgtgcccgcgt (SEQ ID NO: 231)
Con1-6	148	GQDLRPCEDMFGCGTKDWYG	ggtcaggacctgcgtccgtcgga agacatgttcggttgcgttacaa agactggtacgggt (SEQ ID NO: 232)
12-9-1	149	GFEYCDGMEDPFTFGCDKQT	ggtttcgaatactgcgacggtatg gaagaccggttcaccttcgggtgc gacaaacagacc (SEQ ID NO: 233)
12-9-2	150	KLEYCDGMEDPFTQGCDNQS	aaactggaatactgcgacggtatg gaagaccggttcacccagggttg cgacaaccagtc (SEQ ID NO: 234)
12-9-3	151	LQEWCEGVDPFTFGCEKQR	ctgcaggaaatggtgcgaaggtgtt gaagaccggttcaccttcgggtgc gaaaaacagcgt (SEQ ID NO: 235)
12-9-4	152	AQDYCEGMEDPFTFGCEMQK	gctcaggactactgcgaaggtatg gaagaccggttcaccttcgggtgc gaaatgcagaaa (SEQ ID NO: 236)
12-9-5	153	LLDYCEGVQDPFTFGCENLD	ctgctggactactgcgaaggtgtt caggaccggttcaccttcgggtgc gaaaacctggac (SEQ ID NO: 237)
12-9-6	154	HQEYCEGMEDPFTFGCEYQG	caccaggaatactgcgaaggtatg ggaagaccggttcaccttcgggtg cgaataccagggt (SEQ ID NO: 238)
12-9-7	155	MLDYCEGMDDPFTFGCDKQM	atgctggactactgcgaaggtatg gacgaccggttcaccttcgggtgc gacaaacagatg (SEQ ID NO: 239)
12-9-C2	156	LQDYCEGVDPFTFGCENQR	ctgcaggactactgcgaaggtgtt gaagaccggttcaccttcgggtgc gaaaaccagcgt (SEQ ID NO: 240)
12-9-C1	157	LQDYCEGVDPFTFGCEKQR	ctgcaggactactgcgaaggtgtt gaagaccggttcaccttcgggtgc gaaaacagcgt (SEQ ID NO: 241)
12-9	5	FDYCEGVDPFTFGCDNH	ttcgactactgcgaaggtgttgaa gaccggttcaccttcgggtgata accac (SEQ ID NO: 242)

Ещё в одном варианте изобретение относится к экспрессирующим векторам, содержащим по меньшей мере один нуклеотид по изобретению. В другом варианте изобретение относится к клеткам-хозяевам, содержащим вектор экспрессии. Следует понимать, что клетки-хозяева представляют собой

предпочтительно прокариотные клетки (такие как клетки *E. coli*) или эукариотные клетки.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество состава полипептида по данному описанию в смеси с фармацевтически приемлемым носителем.

Изобретение также относится к способу ингибирования нежелательного ангиогенеза у млекопитающих, заключающемуся во введении терапевтически эффективного количества полипептида или состава полипептида по данному описанию. Изобретение также относится к способу модулирования ангиогенеза у млекопитающих, заключающемуся во введении терапевтически эффективного количества полипептида или состава полипептида по данному описанию. Кроме того, изобретение относится к способу ингибирования роста опухоли, характеризующегося нежелательным ангиогенезом, у млекопитающих, заключающемуся во введении терапевтически эффективного количества полипептида или состава полипептида по данному описанию. Помимо этого, изобретение относится к способу лечения рака у млекопитающих, заключающемуся во введении терапевтически эффективного количества полипептида или состава полипептида по данному описанию и химиотерапевтического агента. В предпочтительном варианте изобретения химиотерапевтический агент представляет собой по меньшей мере один из 5-Fu, CPT-11 и Тахотере (таксотер). Однако следует отдавать себе отчет, что можно применять другие химиотерапевтические агенты и другие методы терапии рака.

Изобретение также относится к способу модулирования по меньшей мере одного из свойств: проницаемости сосудов или просачивания плазмы у млекопитающих, заключающемуся во введении эффективного количества полипептида или состава полипептида по данному описанию. Кроме того, изобретение относится к способу лечения по меньшей мере одного из следующих заболеваний (нарушений): глазного реваккулярного заболевания, ожирения, ангиоретикулёмы, гемангиомы, артериосклероза, воспалительного заболевания, воспалительных нарушений, атеросклероза, эндометриоза, опухолей, костного заболевания или псориаза у млекопитающих, заключающемуся во введении терапевтически эффективного количества полипептида или состава полипептида по данному описанию.

Понятно, что специфически связывающиеся агенты по изобретению можно применять для лечения ряда заболеваний, ассоциированных с нарушенным или нежелательным ангиогенезом. Такие заболевания включают, но без ограничения, глазную реваккуляризацию, такую как ретинопатии (включая диабетическую ретинопатию и пятнистую дегенерацию, связанную со старением), псориаз, ангиоретикулёму, гемангиому, артериосклероз, воспалительное заболевание, такое как ревматоидное или ревматическое воспалительное заболевание, в особенности артрит (включая ревматоидный артрит), или другие хронические воспалительные заболевания, такие как хроническая астма, артериальный или пост-трансплантационный атеросклероз, эндометриоз и опухолевые заболевания, такие, например, как так называемые солидные опухоли и "жидкие" (или гемопоэтические) опухоли (такие как лейкемии). Дополнительные заболевания, которые можно лечить введением специфически связывающихся агентов, будут очевидны для специалистов в данной области техники. Такие дополнительные заболевания включают, но без ограничения, ожирение, проницаемость сосудов, просачивание плазмы и костные нарушения, включая остеопороз. Таким образом, изобретение далее относится к способам лечения этих заболеваний, ассоциированных с нарушенным или нежелательным ангиогенезом.

Другие варианты данного изобретения будут совершенно очевидны из прилагаемого описания.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 дан график изменения объёма опухоли (ось *y*) во времени (ось *x*) у мышей с опухолью линии A-431, пролеченных либо "пептителом" TN8-Con4-C по данному изобретению, либо фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). Подробности описаны в примерах.

На фиг. 2 изображён график зависимости концентрации "пептитела" (ось *y*) от времени после введения дозы (ось *x*) у мышей дикого типа, пролеченных дозой 50 мкг "пептитела" 2хCon4-C, L1-7-N или L1-21-N. Подробности описаны в примерах.

На фиг. 3 дан график изменения объёма опухоли (ось *y*) во времени (ось *x*) у мышей с опухолью A-431, пролеченных либо "пептителом" TN8-Con4-C по данному изобретению, либо фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), либо контрольным "пептителом". Подробности описаны в примерах.

На фиг. 4 изображён график, представляющий *in vitro* рост культивированных клеток A-431, обработанных "пептителом" Con4-C по настоящему изобретению, контрольным "пептителом" или необработанных. Подробности описаны в примерах.

На фиг. 5 изображён график изменения объёма опухоли (ось *y*) во времени (ось *x*) в опухолевых клетках Colo205 у мышей, пролеченных "пептителом" Con4-C, "пептителом" L1-7-N, "пептителом" L1-21-N или "пептителом" 2хCon4-C по данному изобретению, либо фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), антителом против Ang-2 (Ab536) или Fc. Подробности описаны в примерах.

На фиг. 6 дан график зависимости объёма опухоли (ось *y*) от времени (ось *x*) у мышей с Colo205 ксенотрансплантатом опухоли, пролеченных варьируемыми дозами "пептитела" 2хCon4-C по данному изобретению, или фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), или Fc. Подробности описаны в примерах.

На фиг. 7 дан график зависимости объёма опухоли (ось *y*) от времени (ось *x*) у мышей с Colo205 ксенотрансплантатом опухоли, пролеченных "пептителом" 2хCon4-C по данному изобретению или контрольными "пептителами". На фиг. 7 также изображён график - область, окрашенная CD31/общая пло-

щадь опухоли для этих "пептител". Подробности описаны в примерах.

На фиг. 8 изображён график зависимости объёма опухоли (ось y) от времени (ось x) у мышей с Colo205 ксенотрансплантатом опухоли, пролеченных "пептителом" 2хCon4-С по данному изобретению или фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) или контрольным "пептителом". Подробности описаны в примерах. Этот график показывает, что анти-Ang-2 "пептитела" способны ингибировать рост опухоли Colo205 независимо от того, когда начинают вводить дозу лекарства.

На фиг. 9 дана сводка скоростей полной реакции (CR) у самок "голых" мышей, полученных при использовании антитела Ab536 или "пептитела" 2хCon4-С как на модели ксенотрансплантата A431, так и на модели ксенотрансплантата Colo-205. Подробности описаны в примерах.

На фиг. 10А дан график изменения объёма опухоли (ось y) во времени (ось x) у мышей с ксенотрансплантатом Colo-205 опухоли, пролеченных либо "пептителом" 2хCon4-С по данному изобретению, либо комбинацией 2хCon4-С и таксотера, либо фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), либо PBS плюс таксотер. Подробности описаны в примерах.

На фиг. 10В дан график изменения объёма опухоли (ось y) во времени (ось x) у мышей с ксенотрансплантатом Colo-205 опухоли, пролеченных либо "пептителом" 2хCon4-С по данному изобретению, либо комбинацией 2хCon4-С и 5-FU, либо фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), либо PBS плюс 5-FU. Подробности описаны в примерах.

На фиг. 11А дан график уровня опухания лапы ($AUC \pm SE$) у индуцированной адьювантом модели артрита у крыс, пролеченных "пептителом" 2хCon4-С по данному изобретению, либо фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), либо контрольным "пептителом", либо нормальным контролем или контролем на артрит. Подробности описаны в примерах.

На фиг. 11В дан график минеральной плотности костей лапы (BMD) у индуцированной адьювантом модели артрита у крыс, пролеченных "пептителом" 2хCon4-С по данному изобретению, либо фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), либо контрольным "пептителом", либо нормальным контролем или контролем на артрит. Подробности описаны в примерах.

На фиг. 11С дан график изменения веса тела у индуцированной адьювантом модели артрита у крыс, пролеченных "пептителом" 2хCon4-С по данному изобретению, либо фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), либо контрольным "пептителом", либо нормальным контролем или контролем на артрит. Подробности описаны в примерах.

На фиг. 12 даны 2 графика, изображающих ингибирование индуцированного VEGF корнеального ангиогенеза у крыс. На первом графике изображено число кровеносных сосудов у крыс, обработанных альбумином бычьей сыворотки (BSA), VEGF плюс фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) или VEGF плюс "пептителом" Con4-С по изобретению. Второй график изображает площадь кровеносных сосудов (mm^2) у крыс, получавших BSA, VEGF плюс фосфатно-солевой раствор (PBS) или "пептителом" Con4-С по изобретению. Подробности описаны в примерах.

На фиг. 13А, 13В и 13С изображены данные эпитоного картирования (O.D) для полноразмерного Ang-2 (hAng-2), присоединения по N-концу hAng-2 и по С-концу hAng-2, соответственно, для "пептител" TN8-Con4-С, L1-7-N и 12-9-3-С по изобретению, а также для контрольного "пептитела" Tie2-Fc, C2B8 или 5B12. Подробности описаны в примерах.

На фиг. 14 изображает аффинность связывания (K_D) "пептитела" по изобретению, определяемую методом Sapidane KinExA. Подробности описаны в примерах.

Подробное описание изобретения

Оглавления разделов даны лишь в целях упорядочения материала, но никоим образом не для ограничения описываемого предмета изобретения.

Для получения молекул рекомбинантных ДНК, белков и антител, а также для получения тканевой культуры и трансформации клеток можно применять стандартные методы. Ферментативные реакции и очистку, как правило, осуществляют в соответствии с рекомендациями производителя или обычно принятыми в данной области техники методами, такими, как описанные в Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY [1989], или методами по данному описанию. Если не указано иначе, применяемые в данном описании номенклатура, а также лабораторные методики и методы аналитической химии, синтетической органической химии и медицинской и фармацевтической химии, хорошо известны и применяются обычно в технике. Для химических синтезов, химических анализов, приготовления и доставки фармацевтических препаратов и лечения больных можно применять стандартные методы.

Определения

Ниже приводятся определения терминов, употребляемых по всему данному описанию (если не указано иначе в конкретных примерах).

Термин "Ang-2" относится к полипептиду, представленному на фиг. 6 в патенте США 6166185 ("Tie-2 лиганд-2"), или к его фрагментам, а также к родственным полипептидам, которые включают аллельные варианты, "сплайсинговые" варианты, производные, варианты с заменами, делециями и/или инсерциями, слитые пептиды и полипептиды и межвидовые гомологи. Полипептид Ang-2 может включать или не включать дополнительные концевые остатки, например лидерные последовательности, целевые

последовательности, метионин по аминоконцу, остатки метионина и лизина по аминоконцу и/или последовательности-метки или последовательности слитых белков, в зависимости от способа его получения.

Термин "биологически активный" в применении к Ang-2 или к агенту, специфически связывающемуся с Ang-2, относится к полипептиду, имеющему по меньшей мере одну активность, характерную для Ang-2 или к агенту, специфически связывающемуся с Ang-2. Агент, специфически связывающийся с Ang-2, может иметь агонистическую, антагонистическую или нейтрализующую или блокирующую активность в отношении по меньшей мере одной биологической активности Ang-2.

Термин "специфически связывающийся агент" относится к молекуле, предпочтительно белковой молекуле, которая специфически связывается с Ang-2 и его вариантами и производными по данному описанию. Специфически связывающийся агент может представлять собой белок, пептид, нуклеиновую кислоту, углевод, липид или низкомолекулярное соединение, которое связывается преимущественно с Ang-2. В предпочтительном варианте специфически связывающийся агент по данному изобретению представляет собой пептид или "пептитело", а также его фрагменты, варианты или производные, одни или в сочетании с другими аминокислотными последовательностями, получаемые известными методами. Такие методы включают, но без ограничения, ферментативное расщепление, химическое расщепление, пептидный синтез или методы рекомбинантной ДНК. Анти-Ang-2 специфически связывающиеся агенты по данному изобретению способны связываться с участками Ang-2, которые модулируют, например ингибируют или промотируют, биологическую активность Ang-2 и/или другие типы ассоциированной с Ang-2 активности.

Термин "варианты" по данному описанию включает такие пептиды и полипептиды, в которых аминокислотные остатки встроены в природную (или, по меньшей мере, в известную) аминокислотную последовательность, делетированы из неё и/или заменены в ней на связывающийся агент. Варианты по изобретению включают слитые белки, описанные ниже.

"Производные" включают такие связывающиеся агенты, которые были химически модифицированы каким-либо способом, отличным от вариантов инсерции, делеции или замены.

"Специфически связывающийся с Ang-2" относится к способности специфически связывающегося агента (такого как "пептитело" или его пептидный участок) по данному изобретению распознавать и связывать зрелый, полноразмерный или неполноразмерный человеческий Ang-2 полипептид, или его ортолог, так что его аффинность (определяемая, например, методами анализа Affinity ELISA или Biacore) или его нейтрализующая способность (определяемая, например, методом анализа Neutralization ELISA по данному описанию или аналогичными методами анализа) по меньшей мере в 10 раз выше, но, необязательно, в 50 раз выше, в 100, 250 или в 500 раз выше или даже по меньшей мере в 1000 раз выше, чем аффинность или нейтрализующая способность того же агента в отношении любого другого ангиопоэтина или другого пептида или полипептида, в котором пептидный участок "пептитела" сначала слит с человеческим Fc фрагментом для оценки с помощью такого метода анализа.

Термин "эпитоп" относится к участку любой молекулы, способному распознаваться и связываться специфически связывающимся агентом, например "пептителом", по одному или более антиген-связывающих участков связывающегося агента. Эпитопы, как правило, состоят из химически активных поверхностных молекулярных группировок, таких, например, как боковые цепи аминокислот или углеводов, и имеют специфические признаки трёхмерной структуры, так же как специфические характеристики заряда. Эпитопы по данному описанию могут быть смежными и несмежными.

Термин "ингибирующий и/или нейтрализующий эпитоп" представляет собой эпитоп, который, будучи связан специфически связывающимся агентом, таким как "пептитело", приводит к утрате (или, по меньшей мере, к снижению) биологической активности молекулы, клетки или организма, содержащих такой эпитоп, *in vivo*, *in vitro* или *in situ*. В контексте настоящего изобретения нейтрализующий эпитоп локализуется на биологически активной области Ang-2 или ассоциируется с этой областью. Термин же "активирующий эпитоп" представляет собой эпитоп, который, будучи связан специфически связывающимся агентом по изобретению, таким как антитело, вызывает в результате активацию или, по меньшей мере, сохранение биологически активной конформации Ang-2.

Термин "фрагмент "пептитела" относится к пептиду или полипептиду, который содержит область, меньшую, чем полное интактное "пептитело".

Термин "природный" в применении к биологическим материалам, таким как нуклеиновые кислоты, полипептиды, клетки-хозяева и т.п., относится к тем из них, которые обнаружены в природе, а не модифицированы человеком.

Термин "изолированный, выделенный" в применении к Ang-2 или к агенту, специфически связывающемуся с Ang-2, относится к соединению, свободному по меньшей мере от одного загрязняющего полипептида или соединения, в смеси с которым он обнаруживается в природе, и предпочтительно практически не содержит любые другие загрязняющие полипептиды, обнаруживаемые в организме млекопитающих, которые могли бы помешать его (Ang-2 или агента, специфически связывающегося с Ang-2) применению в терапевтических или диагностических целях.

Термин "зрелый" в применении к Ang-2 "пептителу", или его фрагменту, или к любому другому белковому агенту, специфически связывающемуся с Ang-2, относится к пептиду или полипептиду, у которого отсутствует лидерная или сигнальная последовательность. Если связывающийся агент по изобре-

тению экспрессирует, например, в прокариотной клетке-хозяине, "зрелый" пептид по изобретению может также включать дополнительные аминокислотные остатки (но по-прежнему не содержит лидерной последовательности), такие как концевой метионин или один или более остатков метионина и лизина. Пептид или полипептид, полученный таким образом, можно употреблять, удаляя или не удаляя эти дополнительные аминокислотные остатки.

Термин "эффективное количество" и "терапевтически эффективное количество" в применении к агенту, специфически связывающемуся с Ang-2, относится к количеству специфически связывающегося агента, которое пригодно или необходимо для поддержания наблюдаемого изменения уровня одного или более типов биологической активности Ang-2. Изменение может представлять собой либо повышение, либо понижение уровня Ang-2 активности. Предпочтительно изменение представляет собой уменьшение Ang-2 активности.

Термин "пептитело" относится к молекуле, содержащей Fc область (домен) антитела, связанный по меньшей мере с одним пептидом. Получение пептител в целом описано в международной заявке PCT WO 00/24782, опубликованной 4 мая 2000 г.

Термин "варианты" по данному описанию включает молекулы таких соединений, как пептиды или комбинации пептид-носитель, такие как "пептитела" по данному изобретению, в которых аминокислотные остатки встроены в аминокислотные последовательности таких молекул, делетированы из них и/или заменены на них. Варианты, содержащие одну или более встроенных аминокислот, включают слитые белки, описанные далее.

"Производные" включают такие пептиды и/или комбинации пептид-носитель, такие как "пептитела", которые были химически модифицированы иным способом, нежели варианты с инсерцией, делецией или с заменой.

Термин "фрагмент" относится к пептиду или к комбинации пептид-носитель, который содержит аминокислотную последовательность меньшей длины, нежели полноразмерная аминокислотная последовательность таких пептидов и/или таких комбинаций пептид-носитель. Такой фрагмент может получаться в результате усечения по аминоконцу, усечения по карбоксиконцу и/или внутренней делеции остатка(ов) аминокислотной последовательности пептида или комбинации пептид-носитель. Фрагменты могут получаться в результате альтернативного сплайсинга РНК или вследствие *in vivo* или *in vitro* протеазной активности. Такие фрагменты можно также получить методами химического пептидного синтеза или модификацией полинуклеотида, кодирующего пептид, комбинацию пептид-носитель или Fc фрагмент и/или пептидный фрагмент "пептитела".

Термин "Fc" относится к одному типу носителя по данному изобретению и содержит последовательность неантигенсвязывающего фрагмента антитела, образующегося в результате протеолитического расщепления целого антитела, в мономерной или мультимерной форме. Источником Fc по данному изобретению является предпочтительно полностью человеческий Fc и может быть любой из иммуноглобулинов, хотя предпочтительными являются IgG1 и IgG2. Однако также по данному описанию охватываются молекулы Fc частично человеческие или получаемые из нечеловеческих видов. Fc составлены из мономерных полипептидов, которые могут быть связаны в димерные или мультимерные формы ковалентной связью (т.е. дисульфидными связями) и с помощью нековалентной ассоциации. Число межмолекулярных дисульфидных связей между мономерными субъединицами молекул нативного Fc составляет от 1 до 4 в зависимости от класса (например, IgG, IgA, IgE) или подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgA2). Одним примером нативного Fc является связанный дисульфидной связью димер, получающийся при расщеплении IgG под действием папаина [см. Ellison et al. (1982), Nucl. Acids Res. 10: 4071-9]. Термин "нативный Fc", применяемый в данном описании, является родовым по отношению к мономерным, димерным и мультимерным формам.

Термин "Fc область (домен)" охватывает молекулы нативного Fc и Fc вариантов и последовательности по определению выше. Как в случае Fc вариантов и нативных Fc, термин "Fc область (домен)" охватывает молекулы в мономерной и мультимерной форме, полученные либо при расщеплении целого антитела, либо другими способами.

Термин "мультимер" в применении к Fc областям или молекулам, содержащим Fc области, относится к молекулам, имеющим две полипептидные цепи или более, ассоциированные за счёт ковалентных взаимодействий, нековалентных взаимодействий, или как за счёт ковалентных, так и за счёт нековалентных взаимодействий. Молекулы IgG, как правило, образуют димеры; IgM-пентамеры; IgD-димеры; и IgA-момеры, димеры, тримеры и тетрамеры. Мультимеры могут образовываться за счёт использования последовательности и результирующей активности нативного Ig-источника Fc или за счёт дериватизации (по определению см. ниже) такого нативного Fc.

Термин "димер" в применении к Fc областям или молекулам, содержащим Fc области, относится к молекулам, имеющим две полипептидные цепи, ассоциированные за счёт ковалентных или нековалентных связей.

Термин "носитель" относится к молекуле, которая предотвращает расщепление и/или повышает период полужизни, снижает токсичность, уменьшает иммуногенности или повышает биологическую активность терапевтического белка. Примеры носителей включают Fc область, а также линейный полимер (например, полиэтиленгликоль (ПЭГ), полилизин, декстран и т.п.); разветвлённый полимер (см., например, патент США 4289872, принадлежащий Denkwalter et al., выданный 15 сентября 1981 г.; патент

США 5229490, принадлежащий Там, выданный 20 июля 1993 г.; международная заявка WO 93/21259 авторов Frechet et al., опубликованная 28 октября 1993 г.); липид, группа холестерина (например, стероид); углевод или олигосахарид; или любой природный или синтетический белок, полипептид или пептид, который связывается с рецептором-"утилизатором". Носители дополнительно описаны ниже.

Термины "дериватизация" и "производное" или "дериватизированный" обозначают процессы и полученные в результате соединения соответственно, в которых (1) соединение содержит циклический фрагмент; например перекрёстное связывание между цистеинильными остатками в соединении; (2) соединение перекрёстно связано или содержит сайт перекрёстного связывания; например, соединение содержит цистеинильный остаток и, следовательно, образует димер за счёт перекрёстного связывания в культуре *in vivo*; (3) одна или более пептидных связей замещаются непептидной связью; (4) N-конец заменяется на -NRR1, NRC(O)R1, -NRC(O)OR1, -NRS(O)2R1, -NHC(O)NHR, сукцинимидную группу, или замещённый или незамещённый бензоилоксикарбонил-NH-, где R и R1 и заместители в цикле определены ниже; (5) C-конец на -C(O)R2 или -NR3R4, где определение R2, R3 и R4 дано ниже; и (6) соединения, в которых индивидуальные аминокислотные фрагменты модифицированы обработкой агентами, способными реагировать с выбранными боковыми цепями или концевыми остатками. Производные дополнительно описаны ниже.

Термин "пептид" относится к молекулам, содержащим, примерно, 3-75 аминокислот, при этом предпочтительны молекулы, содержащие около 5-50 аминокислот, более предпочтительны молекулы, содержащие около 8-40, и наиболее предпочтительны молекулы, содержащие 10-25 аминокислот. Пептиды могут иметь природные или искусственные (т.е. не встречающиеся в природе) аминокислотные последовательности. Примеры пептидов могут получаться любыми методами, представленными в данном описании, такими как использование пептидной библиотеки (например, метод фагового дисплея), химический синтез, расщепление пептидов или метод рекомбинантной ДНК.

Термин "фармакологически активное" обозначает, что найдено, что описанное таким образом вещество обладает активностью, которая влияет на медицинские показатели (например, кровяное давление, число гемоглобинов, уровень холестерина) или на болезненное состояние (например, рак, аутоиммунные расстройства и т.д.).

Термины "пептид-антагонист, пептид антагонистического действия" или "ингибирующий пептид" относятся к пептиду, который блокирует биологическую активность, или каким-либо образом препятствует биологической активности ассоциированного представляющего интерес белка, или обладает биологической активностью, сравнимой с известным антагонистом или ингибитором ассоциированного представляющего интерес белка. Так, термин "пептид-антагонист Ang-2" охватывает пептиды, которые, как можно идентифицировать или установить, обладают антагонистическими в отношении Ang-2 признаками.

Кроме того, в данное описание включены физиологически приемлемые соли соединений по изобретению. Под "физиологически приемлемыми солями" подразумеваются любые соли, известные или станут известными позже как фармацевтически приемлемые. Некоторые конкретные примеры: ацетат; трифторацетат; галогенводороды (галоидводороды), такие как хлоргидрат и бромгидрат; сульфат; цитрат; тартрат; гликолят; и оксалат, мезилат и фосфат.

"Пептитела"

Один аспект настоящего изобретения связан с созданием Ang-2 "пептител". Взаимодействие белка-лиганда со своим рецептором часто происходит на относительно большой поверхности раздела. Однако, как показано для соматотропина и его рецептора, только несколько ключевых (важных) остатков на поверхности раздела вносят вклад в энергию связывания. Clackson et al., Science 267: 383-6 (1995). Основной объём белка-лиганда просто выявляет связывающие эпитопы в правильной топологии или служит в качестве функций, не связанных со связыванием. Так, молекулы только на длине "пептида" (как правило, 2-40 аминокислот) могут связываться с рецепторным белком данного большого белка-лиганда. Такие пептиды могут имитировать биоактивность большого белка-лиганда ("пептидные агонисты", "пептиды-агонисты") или за счёт конкурентного связывания ингибировать биоактивность большого белка-лиганда ("пептидные антагонисты", "пептиды-антагонисты").

Фаговый дисплей является эффективным методом для идентификации таких пептидных агонистов и антагонистов. См, например, Scott et al., Science 249: 386 (1990); Devlin et al., Science 249: 404 (1990); патент США 5223409, выданный 29 июня 1993 г.; патент США 5733731, выданный 31 марта 1998 г.; патент США 5498530, выданный 12 марта 1996 г.; патент США 5432018, выданный 11 июля 1995 г.; патент США 5338665, выданный 16 августа 1994 г.; патент США 5922545, выданный 13 июля 1999 г.; международная заявка WO 96/40987, опубликованная 19 декабря 1996 г. и международная заявка WO 98/15833, опубликованная 16 апреля 1998 г. (каждый из этих источников вводится в данное описание в качестве ссылки). В пептидных библиотеках для выявления пептидов методом фагового дисплея случайные пептидные последовательности можно выявлять слиянием с оболочечными белками нитчатого фага. Если требуется, выявленные пептиды можно, используя метод аффинной хроматографии, элюировать против связанного с антителом внеклеточного домена рецептора. Удержанный фаг может быть обогащен за счёт последовательных циклов аффинной очистки и повторного культивирования. См., например, Swirla et al., Science 276: 1696-9 (1997), где были идентифицированы два различных семейства. Пептидные последовательности могут подсказать, какие остатки можно безопасно заменить на аланин ("alanine-scanning")

или мутагенезом на уровне ДНК. Можно создать библиотеки, провести мутагенез, а затем скрининг для дополнительной оптимизации последовательностей лучших связывающихся агентов. Lowman, Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:401-24(1997).

Для определения пептидов, которые имитируют связывающую активность больших белков-лигандов можно также использовать структурный анализ белок-белкового взаимодействия. В таких анализах структура может подсказать идентичность и относительную ориентацию существенно важных (критических), остатков большого белка-лиганда, из которого можно построить (создать) пептид. См., например, Takasaki et al., Nature Biotech 15: 1266-70 (1997). Эти аналитические методы можно также применять для изучения взаимодействия между рецепторным белком и пептидами, выбираемыми методом фагового дисплея, который может подсказать дальнейшую модификацию пептидов с целью повышения аффинности связывания.

Другие методы конкурируют с методом фагового дисплея в исследовании пептидов. Пептидную библиотеку можно сливать (присоединять) по карбоксильному концу белка-репрессора lac и экспрессировать в *E. coli*. Другой метод с использованием *E. coli* делает возможным дисплей на внешней клеточной мембране за счёт слияния с липопротеидом, ассоциированным с пептидогликаном (PAL). В дальнейшем эти и родственные методы в данном описании объединены общим названием "E. coli дисплей". В другом методе перед выделением рибосом прекращают трансляцию произвольной РНК, в результате получают библиотеку полипептидов со всё ещё присоединённой ассоциированной с ними РНК. В дальнейшем в данном описании этот и родственные методы употребляются под общим названием "рибосомный дисплей". Другие методы используют химическое связывание пептидов с РНК. См., например, Roberts and Szostak, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 12297-303 (1997). В дальнейшем в данном описании этот и родственные методы в целом называются "РНК-пептидный скрининг". Создаются получаемые химическим синтезом пептидные библиотеки, в которых пептиды иммобилизуют на стабильных материалах небиологического происхождения, таких как полиэтиленовые стержни или полимеры, проницаемые для растворителя. В других образованных химическим способом пептидных библиотеках используют фото-литографию для сканирования пептидов, иммобилизованных на предметных стеклах. В дальнейшем в данном описании эти и родственные методы имеют общее название "химический пептидный скрининг" (скрининг пептидов, полученных химическим путём). "Химический пептидный скрининг" может иметь преимущества, так как позволяет применять D-аминокислоты и другие неприродные аналоги, а также непептидные элементы. Обзор как биологических, так и химических методов дан в Wells and Lowman, Curr. Opin. Biotechnol., 3: 355-62 (1992).

Умозрительно понятно, что можно обнаружить пептиды-миметики любого белка, используя метод фагового дисплея и другие приведённые выше методы. Эти методы были использованы для эпитопного картирования, для идентификации важных (критических) для белок-белкового взаимодействия аминокислот, и в качестве ключевых методов для открытия новых терапевтических агентов. См., например, Cortese et al., Curr. Opin. Biotech. 7: 616-21 (1996). В настоящее время пептидные библиотеки очень часто используются в иммунологических исследованиях, таких как эпитопное картирование. См. Kreeger, The Scientist 10(13): 19-20 (1996).

Пептиды, определённые скринингом библиотек методом фагового дисплея, скорее рассматриваются как "ключевые" в создании терапевтических агентов, нежели как сами терапевтические агенты. Аналогично другим белкам и пептидам, они, по-видимому, быстро удаляются *in vivo* либо почечной фильтрацией, либо по механизмам клеточного клиренса в ретикулоэндотелиальной системе, либо путём протеолитического распада [Francis, (см. выше)]. В результате в настоящее время в технике пептиды используют для подтверждения целевых препаратов (препаратов-мишеней), либо в качестве "скелета," основы для дизайна органических соединений, которые, которые невозможно так легко или так быстро обнаружить скринингом химических библиотек [Lowman, см. выше; Kay et al., (см. выше)]. Способ, позволяющий, используя такие пептиды, более просто получить терапевтические агенты против ангиогенеза, дал бы большие преимущества.

Структура "пептител"

В составах полипептида, получаемых в соответствии с данным изобретением, пептид может быть связан с носителем по N- или по C-концу пептида. Таким образом, молекулы носитель-пептид по данному изобретению можно описать в виде следующих пяти формул и в виде из мультимеров:

$(X_1)_a-F_1-(X_2)_b$	(ФОРМУЛА I)
X_1-F_1	(ФОРМУЛА II)
X_1-F_2	(ФОРМУЛА III)
$F_1-(L_1)_c-P_1$	(ФОРМУЛА IV)
$F_1-(L_1)_c-P_1-(L_2)_d-P_2$	(ФОРМУЛА V)

где F_1 обозначает носитель (предпочтительно, F_c область);

X_1 и X_2 , каждый независимо, выбирают из $-(L_1)_c-P_1$, $-(L_1)_c-P_1-(L_2)_d-P_2$, $-(L_1)_c-P_1-(L_2)_d-P_2-(L_3)_e-P_3$ и

$-(L_1)_c-P_1-(L_2)_d-P_2-(L_3)_e-P_3-(L_4)_f-P_4$;

P_1 , P_2 , P_3 и P_4 , каждый независимо, обозначают последовательности или фармакологически активные пептиды по данному описанию;

L_1 , L_2 , L_3 и L_4 , каждый независимо, обозначают линкеры и

"a", "b", "c", "d", "e" и "f", каждый независимо, обозначают 0 и 1, при условии, что по меньшей мере один из "a" и "b" обозначает 1.

Пептиды

В настоящем изобретении рассматриваются пептиды, которые селективно связываются с Ang-2. По данному изобретению может использоваться любое количество таких пептидов. Метод фагового дисплея, в частности, применим для получения пептидов, используемых по данному изобретению, так как было показано, что аффинная селекция из библиотек случайных пептидов может быть использована для идентификации пептидных лигандов для любого сайта любого генного продукта. Dedman et al., J. Biol. Chem. 268: 23025-30 (1993).

Пептиды по данному изобретению могут быть получены любыми методами, описанными в уровне техники. Используются однобуквенные аббревиатуры аминокислот. Термин "X" в любой последовательности (и по всему описанию, если в конкретном случае не указано иначе) означает, что может присутствовать любой из 20 природных аминокислотных остатков или любая из синтетических (неприродных) аминокислот (описанных далее в разделе "Варианты"). Любые из этих пептидов могут быть связаны парами, тандемом (т.е. последовательно), с линкером или без него, и примеры пептидов, связанные тандемом, представлены в таблице. Линкеры обозначены "L" и могут представлять собой любые из линкеров по данному описанию. Показаны тандемные повторы и линкеры, разделённые для ясности тире. Любой пептид, содержащий цистеинильный остаток, может быть перекрёстно связан с другим Cys-содержащим пептидом, каждый из которых или они оба могут быть связаны с носителем. Любой пептид, содержащий более одного Cys остатка, может также образовывать внутривептидную дисульфидную связь. Любой из этих пептидов может быть дериватизирован по данному описанию. В производных, у которых карбоксильный конец может заканчиваться аминогруппой, эта завершающая аминогруппа представляет собой NH_2 . В производных, у которых аминокислотные остатки заменены фрагментами, отличными от аминокислотных остатков, замены обозначаются S, что обозначает любой фрагмент, описанный в Bhatnagar et al., J. Med. Chem. 39: 3814-9 (1996) и Cuthbertson et al., J. Med. Chem. 40: 2876-82 (1997), которые вводятся в данное описание в качестве ссылки. Если не указано иначе, все пептиды связаны пептидной связью.

Носители

В одном варианте настоящее изобретение включает по меньшей мере один пептид для присоединения по меньшей мере к одному носителю (F_1 , F_2) по N-концу, C-концу или по боковым цепям одного из аминокислотных остатков пептида(ов). Можно также использовать разные носители; например, Fc на каждом конце или на одном конце Fc, а на другом конце или в боковой цепи - группу ПЭГ.

Область (домен) Fc является одним предпочтительным носителем. Область Fc может быть слита с N- или C-концом пептидов или как с N-, так и с C-концом.

Как отмечалось выше, Fc варианты являются подходящими носителями в объёме данного изобретения. Нативный Fc может быть значительно модифицирован для образования Fc варианте по данному изобретению при условии, что связывание с рецептором-утилизатором сохраняется. См., например, международные заявки WO 97/34631 и WO 96/32478. В таких Fc вариантах можно удалять один или более сайтов нативного Fc, которые придают структурные особенности или функциональную активность, не требующиеся в слитых молекулах по данному изобретению. Можно удалить эти сайты, например, заменой или делецией остатков, инсерцией остатков в сайт или отсекая участки, содержащие сайт. Встроенные или замещённые остатки могут также быть изменёнными аминокислотами, такими как пептидомиметики или D-аминокислоты. Fc варианты могут быть желательны по ряду причин, некоторые из этих причин описаны ниже. Примеры Fc вариантов включают молекулы и последовательности, в которых

1. Сайты, участвующие в образовании дисульфидной связи, удаляют. Такое удаление позволяет избежать реакции с другими цистеинсодержащими белками, находящимися в клетке-хозяине, используемой для продуцирования молекул по изобретению. Для этой цели цистеинсодержащий сегмент на N-конце можно отсечь или можно удалить цистеиновые остатки или заменить их на остатки других аминокислот (например, аланил, серил). Даже если цистеиновые остатки удалены, одноцепочечные Fc области всё ещё образуют димерный Fc домен, который удерживается вместе за счёт нековалентных связей.

2. Нативный Fc домен модифицируют, чтобы сделать его более совместимым с выбранной клеткой-хозяином. Например, можно удалить РА последовательность близ N-конца типичного нативного Fc домена (нативной Fc области), который может распознаваться расщепляющим ферментом в *E. coli*, таким как пролиноминопептидаза. Также можно добавить N-концевой метионильный остаток, особенно, когда молекулу экспрессируют методом рекомбинантной ДНК в бактериальной клетке, такой как *E. coli*.

3. Часть N-конца нативного Fc удаляют с целью предотвратить N-концевую гетерогенность при экспрессии в выбранной клетке-хозяине. Для этой цели можно удалить любые из первых 20 аминокислотных остатков на N-конце, в частности, в положениях 1, 2, 3, 4 и 5.

4. Один или более сайтов гликозилирования удаляют. Остатки, которые, как правило, гликозили-

руются (например, аспарагин), могут придать цитолитическую активность. Такие остатки можно удалить или заменить на негликозилированные остатки (например, аланин).

5. Сайты, участвующие во взаимодействии с комплементом, такие как C1q-связывающий сайт, удаляют. Например, можно удалить или заменить ЕКК последовательность человеческого IgG1. Восстановление комплемента может быть неблагоприятным для молекул по данному изобретению и поэтому его можно избежать с помощью такого Fc варианта.

6. Сайты, которые влияют на связывание с Fc рецепторами, иными, нежели рецептор-утилизатор, удаляют. Нативный Fc может содержать сайты для взаимодействия с некоторыми лейкоцитами, которые не требуются для слитых молекул по данному изобретению и поэтому их можно удалить.

7. Сайт ADCC удаляют. Сайты ADCC известны в технике. См., например, Molec. Immunol. 29 (5): 633-9 (1992) относительно сайтов ADCC в IgG1. Эти сайты также не требуются для слитых молекул по данному изобретению и поэтому их можно удалить.

8. Если нативный Fc получают из нечеловеческого антитела, нативный Fc может быть "гуманизирован". Как правило, для гуманизации нативного Fc можно заменить выбранные остатки в нечеловеческом нативном Fc на остатки, которые обычно обнаруживают в человеческом нативном Fc. Методы гуманизации антител хорошо известны в технике.

Альтернативным носителем может быть белок, полипептид, пептид, антитело, фрагмент антитела, малая молекула (например, пептидомиметик), способные связываться с рецептором-утилизатором. Например, можно в качестве носителя использовать полипептид, описанный в патенте США 5739277, выданный 14 апреля 1998 г. Presta et al. Пептиды можно выбирать методом фагового дисплея по признаку связывания с рецептором-"утилизатором" FcRn. Такие связывающие рецептор-"утилизатор" соединения также охватываются понятием "носитель" и входят в объём данного изобретения. Такие носители следует выбирать вследствие увеличенного периода полужизни (например, за счёт отсутствия последовательностей, распознаваемых протеазами) и пониженной иммуногенности (например, за счёт того, что предпочтительнее неиммуногенные последовательности, описанные при гуманизации антител).

Как отмечалось выше, полимерные носители также можно использовать в качестве F₁ и F₂. Различные значения для связанных химических фрагментов, пригодных в качестве носителей, доступны в настоящее время, см., например, международную заявку РСТ (Договор о патентной кооперации) WO 96/11953, озаглавленную "N-Terminally Chemically Modified Protein Compositions and Methods", которая ссылкой вводится в данное описание во всей полноте. В этой публикации РСТ, среди прочего, описывается селективное связывание водорастворимых полимеров с N-концом белков.

Предпочтительным полимерным носителем является полиэтиленгликоль ПЭГ. Группа ПЭГ может быть любого подходящего молекулярного веса и может быть линейной или разветвлённой. Средний молекулярный вес ПЭГ предпочтительно составляет примерно от 2 до 100 килодальтон (кДа), более предпочтительно около 5-50 кДа, наиболее предпочтительно около 5-10 кДа. Группы ПЭГ, как правило, присоединяются к соединениям по изобретению с помощью ацилирования или восстановительного алкилирования за счёт взаимодействия реакционноспособной группы в ПЭГ-фрагменте (например, альдегидной, amino, тиольной или сложноэфирной группы) с реакционноспособной группой соединения по изобретению (например, альдегидной, тиольной или сложноэфирной группы).

Применяемая стратегия ПЭГирования синтетических пептидов состоит в присоединении за счёт конъюгирования в растворе пептида и фрагмента ПЭГ, причём каждый несёт особую функциональность, так что они являются реакционноспособными (реактивными) по отношению друг к другу. Пептиды можно легко получать обычным твердофазным синтезом, известным в технике. Пептиды "предварительно активируют" с помощью соответствующей функциональной группы в конкретном сайте. Предшественники очищают и полностью характеризуют перед реакцией с фрагментом ПЭГ. Лигирование пептида с ПЭГ обычно происходит в водной фазе и его легко контролировать (мониторинг) обращённо-фазовой аналитической ВЭЖХ. ПЭГированные пептиды можно легко очистить препаративной ВЭЖХ и охарактеризовать аналитической ВЭЖХ, аминокислотным анализом и лазерной десорбционной масс-спектрометрией.

Полисахаридные полимеры представляют собой другой тип водорастворимых полимеров, которые можно использовать для модификации белков. Декстраны являются полисахаридными полимерами, состоящими из отдельных субъединиц глюкозы, преимущественно связанных связями α1-6. Сам декстран выпускается с различными интервалами молекулярной массы, легко доступен декстран с молекулярной массой 1-70 кДа. Декстран представляет собой водорастворимый полимер для применения по данному изобретению в качестве носителя как сам по себе, так и в комбинации с другим носителем (например, Fc). См., например, международные заявки WO 96/11953 и WO 96/05309. Сообщалось о применении декстрана, конъюгированного с терапевтическими или диагностическими иммуноглобулинами: см., например, европейскую патентную заявку 0315456, которая вводится в данное описание в качестве ссылки. Предпочтительно, чтобы декстран, применяемый в качестве носителя по данному изобретению, имел молекулярную массу 1-20 кДа.

Линкеры

Любая "линкерная" группа является необязательной. Если эта группа присутствует, её химическое строение не важно, так как прежде всего она служит в качестве спейсера. Линкер предпочтительно со-

стоит из аминокислот, связанных вместе пептидными связями. Так, в предпочтительных вариантах изобретения линкер состоит из 1-20 аминокислот, связанных пептидными связями, причём аминокислоты выбирают из 20 природных аминокислот. Одна или более из этих аминокислот могут быть гликозилированными, что хорошо понимают специалисты в данной области техники. В более предпочтительных вариантах изобретения аминокислоты от 1 до 20 выбирают из глицина, аланина, пролина, аспарагина, глутамина и лизина. Ещё более предпочтительно, когда линкер состоит из большинства стерически незатруднённых аминокислот, таких как глицин и аланин. Так, предпочтительными линкерами являются полиглицины (в частности, (Gly)₅, (Gly)₈), поли(Gly-Ala) и полиаланины. Комбинации Gly и Ala также являются предпочтительными в качестве линкера, называемого в данном описании K1 и имеющего аминокислотную последовательность, представленную далее в примерах.

Возможны также непептидные линкеры. Например, алкильные линкеры, такие как -NH-(CH₂)_s-C(O)-, где можно использовать значение s=2-20. Эти алкильные линкеры могут дополнительно иметь в качестве заместителя любую пространственно незатруднённую группу, такую как низший алкил (например, C₁-C₆), низший ацил, галоген (например, Cl, Br), CN, NH₂, фенил и т.д. Примером непептидного линкера является линкер ПЭГ с молекулярной массой, равной от 100 до 5000 кДа, предпочтительно 100-500 кДа. Пептидные линкеры можно варьировать, образуя производные описанным выше способом.

Варианты и производные

В объём настоящего изобретения входят варианты и производные специфических связывающих агентов. Понятно, что конкретный специфический связывающий агент по настоящему изобретению может содержать один, два или все три типа вариантов. Варианты с инсерцией или заменой могут содержать природные аминокислоты, нетрадиционные (неприродные) аминокислоты или и те, и другие.

В одном примере включены варианты с инсерцией, в которых один или более аминокислотных остатков, либо природных, либо нетрадиционных аминокислот дополняют аминокислотную последовательность пептида или "пептитела". Инсерции могут быть локализованы на любом конце белка или на обоих его концах или могут быть позиционированы во внутренних областях аминокислотной последовательности "пептитела". Инсерционные варианты с дополнительными остатками по любому концу или по обоим концам могут включать, например, слитые белки или белки, содержащие аминокислотные "хвосты" или метки. Инсерционные варианты включают пептиды и "пептитела", в которых один или более аминокислотных остатков добавлено к аминокислотной последовательности пептида или "пептитела" или ее фрагменту.

Варианты продуктов по изобретению включают также зрелые пептиды и "пептитела", у которых удалены лидерная или сигнальная последовательности, и образующиеся в результате белки, содержащие дополнительные аминокислотные концевые остатки, причём аминокислоты могут быть природными и неприродными. Рассматриваются специфически связывающиеся агенты (такие как "пептитела") с дополнительным метионильным остатком в аминокислотном положении -1 (Met⁻¹- "пептитело"), так же как специфически связывающиеся агенты с дополнительными остатками метионина и лизина в положениях -2 и -1 (Met⁻²-Lys⁻¹). Варианты, содержащие дополнительные остатки Met, Met-Lys, Lys, особенно пригодны для повышенной продукции рекомбинантных белков из бактериальных клетках-хозяевах.

Изобретение также охватывает варианты специфически связывающихся агентов, содержащие дополнительные аминокислотные остатки, образующиеся при использовании специфических систем экспрессии. Например, применение промышленных векторов, которые экспрессируют заданный полипептид как часть продукта слияния с глутатион-S-трансферазой (GST), даёт заданный полипептид, содержащий дополнительный остаток глицина в аминокислотном положении -1, после отщепления компонента GST от заданного полипептида. Рассматриваются также варианты, получающиеся в результате экспрессии в другой векторной системе, включая варианты, в которых в аминокислотную последовательность, как правило, на карбокси- и/или аминоконце последовательности, встроены полигистидиновый "хвост".

Инсерционные варианты также включают слитые белки, в которых аминоконцы пептида или "пептитела" слиты с другим полипептидом, его фрагментом или аминокислотами, которые, как правило, не распознаются как часть последовательности любого конкретного белка. Примерами таких слитых белков являются иммуногенные полипептиды, белки с продолжительным периодом полужизни в кровотоке, такие как константные области иммуноглобулина, маркерные белки, белки или полипептиды, которые облегчают очистку заданного пептида или "пептитела", и полипептидные последовательности, которые промотируют образование мультимерных белков (такие как лейциновая застёжка-"молния", которая пригодна для образования/стабильности димера).

Такой тип инсерционного варианта, как правило, содержит всю нативную молекулу или её значительную часть, связанную по N- или по C-концу с целым вторым полипептидом или с его частью. Например, слитые белки, как правило, используют лидерные последовательности от других видов, чтобы благоприятствовать рекомбинантной экспрессии белка в гетерологичном хозяине. Другой применяемый белок включает добавление иммунологически активной области, такой как эпитоп антителя, с целью облегчить очистку слитого белка. Включение сайта расщепления в место слияния или рядом с ним облегчает удаление "чужого" полипептида после очистки. Другие применимые слияния включают связывание функциональных областей, таких как активные сайты ферментов, области гликозилирования, сигналы

нацеливания на клетки или трансмембранные области.

Существуют различные промышленные системы экспрессии слитых белков, которые могут использоваться по данному изобретению. Особенно пригодные системы включают, но без ограничения, систему глутатион-S-трансферазы (GST) (Pharmacia), систему белка связывания мальтозы (NEB, Beverley, MA), систему FLAG (IBI, New Haven, CT) и систему 6xHis (Qiagen, Chatsworth, CA). Эти системы способны продуцировать рекомбинантные пептиды и/или "пептитела", несущие только небольшое количество дополнительных аминокислот, которые, по-видимому, незначительно влияют на активность пептида или "пептитела". Например, как система FLAG, так и система 6xHis добавляют только короткие последовательности, о которых известно, что они обе являются слабо антигенными и не оказывают вредного влияния на укладку полипептида в нативную конформацию. Другое слияние по N-концу, которое рассматривается как пригодное, представляет собой слияние дипептида Met-Lys по N-концевой области белка или пептидов. Такое слияние может дать благоприятное повышение экспрессии или активности белка.

Другие слитые системы продуцируют полипептидные гибриды, в которых следует вырезать партнёр слияния от заданного пептида или "пептитела". В одном варианте связан с рекомбинантным "пептителом" с помощью пептидной последовательности, содержащей специфическую последовательность распознавания протеазой. Примерами соответствующих последовательностей являются последовательности, которые распознаются протеазой вируса гравировки табака (TEV) (Life Technologies, Gaithersburg, MD) или фактором Xa (New England Biolabs, Beverley, MA).

Изобретение также охватывает слитые полипептиды, которые содержат целый пептид или целое "пептитело" по данному изобретению или их часть в комбинации с усечённым тканевым фактором (tTF). tTF представляет собой агент, нацеленный на сосуды, состоящий из усечённой формы человеческого белка, вызывающего коагуляцию, который ведёт себя как агент, коагулирующий кровь в кровеносных сосудах опухоли, как описано в патентах США 5877289; 6004555; 6132729; 6132730; 6156321 и в европейском патенте EP 0988056. Слияние tTF с анти-Ang-2 "пептителом" или пептидом или его фрагментом облегчает доставку анти-Ang-2 к клеткам-мишеням.

В другом аспекте изобретение включает варианты с делециями, в которых удалены один или более аминокислотных остатков в пептиде или "пептителе". Делеции можно получать на одном или обоих концах пептитела или удалением одного или более остатков внутри аминокислотной последовательности "пептитела". Варианты с делецией обязательно включают все фрагменты пептида или "пептитела".

Ещё в одном аспекте настоящее изобретение включает варианты пептидов или пептител по изобретению с аминокислотными заменами. Варианты с заменами включают такие пептиды и "пептитела", в которых удалены один или более аминокислотных остатков и заменены на одну или более альтернативных аминокислот, причём эти аминокислоты могут быть природными и неприродными. "Субституционные" (с заменами) варианты приводят к пептидам или "пептителам", которые "аналогичны" исходному пептиду или "пептителу", так как две молекулы содержат определённый процент идентичных аминокислот. Варианты с заменами включают замены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30 аминокислот пептида или "пептитела", при этом число замен может составлять вплоть до 10% или более аминокислот пептида или "пептитела". В одном аспекте замены являются консервативными по природе, однако, изобретение также охватывает замены, которые являются неконсервативными, и также включает нетрадиционные аминокислоты.

Идентичность и подобие родственных пептидов и "пептител" можно легко рассчитать известными методами. Такие методы включают, но без ограничения, методы, описанные в Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, O., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); и Carillo et al., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988).

Предпочтительные методы определения родства или идентичности в процентах двух пептидов или полипептидов, или полипептида и пептида предполагают дизайн, дающий наибольшее количество совпадений между проверяемыми последовательностями. Методы определения идентичности описаны в общедоступных компьютерных программах. Предпочтительные компьютерные программы для определения идентичности двух последовательностей включают, но без ограничения, пакет программ GCG, включающий GAP (Devereux et al., Nucl. Acid. Res., 12:387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI, BLASTP, BLASTN и FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol., 215:403-10 (1990)). Программа BLASTX является общедоступной из National Center for Biotechnology Information (NCBI) и других источников (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul et al., см. выше (1990)). Для определения идентичности можно применять также общеизвестный алгоритм Смита-Уотермана (Smith Waterman).

Некоторые схемы совмещения (выравнивания) для сравнительного анализа первичной структуры двух аминокислотных последовательностей могут дать совмещение только короткого участка двух последовательностей, и эта малая область совмещения может иметь очень высокую степень идентичности последовательностей, даже если между двумя полноразмерными последовательностями нет заметного родства. Соответственно, в некоторых вариантах изобретения выбранный метод совмещения (программа

GAP) даёт в результате совмещение, которое перекрывает по меньшей мере десять процентов полной длины сравниваемого целевого полипептида, т.е. по меньшей мере 40 последовательных аминокислот, если сравниваются последовательности, содержащие по меньшей мере 400 аминокислот; 30 последовательных аминокислот, если сравниваются последовательности, содержащие по меньшей мере около 300-400 аминокислот; по меньшей мере 20 последовательных аминокислот, если сравниваются последовательности, содержащие около 200-300 аминокислот; и по меньшей мере 10 последовательных аминокислот, если сравниваются последовательности, содержащие примерно 100-200 аминокислот.

Например, с использованием компьютерного алгоритма GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI) два полипептида, для которых следует определить процент идентичности последовательностей, выравниваются с оптимальным совмещением их соответствующих аминокислот ("общее перекрывание", как определено с помощью алгоритма). В некоторых вариантах изобретения в сочетании с алгоритмом применяют штрафную функцию за раскрытие щели (гэпа) (которое обычно рассчитывается как средняя диагональ 3X; "средняя диагональ" обозначает среднее значение диагонали применяемой матрицы сравнения; "диагональ" означает количественный показатель или число, отнесённое к каждой идеальной паре аминокислот при использовании конкретной матрицы сравнения) и штрафную функцию за расширение щели (гэпа) (значение которого обычно составляет 1/10 от величины штрафной функции за раскрытие щели), а также матрицу сравнения, такую как PAM 250 или BLOSUM 62. В некоторых вариантах изобретения стандартную матрицу сравнения (см. Dayhoff et al., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, 5(3) (1978) относительно матрицы сравнения PAM 250; Henicoff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10915-10919 (1992) относительно матрицы сравнения BLOSUM 62) также применяют с помощью алгоритма.

В некоторых вариантах изобретения параметры полипептидной последовательности сравнения включают следующие:

Алгоритм: Needleman et al., *J. Mol. Biol.*, 48:443-453 (1970);

Матрица сравнения: BLOSUM 62 из Henicoff et al., см. выше (1992);

Штрафная функция за щель: 12;

Штрафная функция за протяжённость щели: 4;

Порог подобия: 0.

Программу GAP можно применять с приведёнными выше параметрами. В некоторых вариантах изобретения вышеуказанные параметры представляют собой параметры по умолчанию для полипептидов сравнения (наряду с отсутствием "штрафная функция" за концевые щели) при использовании алгоритма GAP.

В некоторых вариантах изобретения параметры последовательности сравнения полинуклеотидной молекулы (в противоположность аминокислотной последовательности) включают следующее:

Алгоритм: Needleman et al., см. выше (1970);

Матрица сравнения: совпадения (пары)=+10, несовпадение=0;

Штрафная функция за щель: 50;

Штрафная функция за протяжённость щели: 3.

Программа GAP может также применяться с приведёнными выше параметрами. Вышеуказанные параметры являются параметрами по умолчанию для полинуклеотидных молекул сравнения.

Можно применять другие примеры алгоритмов, штрафной функции за раскрытие щелей, штрафной функции за расширение щелей, матриц сравнения, порогов подобия и т.д., включая значения этих показателей, представленные в Program Manual, Wisconsin Package, Version 9, September, 1997. Практический выбор, который следует сделать, очевиден для специалиста в данной области техники и зависит от конкретного сравнения, которое следует сделать, такого как ДНК-с-ДНК, белок-с-белком, белок-с-ДНК; и, кроме того, проводится ли сравнение между данными парами последовательностей (в этом случае, как правило, предпочтительными являются GAP или BestFit) или между одной последовательностью и большой базой данных последовательностей (в этом случае предпочтительными являются FASTA или BLASTA).

В данном описании придерживаются общепринятых правил при употреблении двадцати традиционных аминокислот и их сокращений. См. монографию *Immunology-A Synthesis* (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991), которая вводится в данное описание ссылкой для любых целей.

Аминокислоты могут иметь либо L, либо D стереохимию (за исключением Gly, который не является ни L, ни D), а полипептиды и составы полипептидов по настоящему изобретению могут содержать комбинацию стереоизомеров. Однако предпочтительными являются L-стереоизомеры. Изобретение также охватывает молекулы с обратной последовательностью, в которых последовательность аминокислот от amino-конца до карбокси-конца является обратной. Например, если молекула имеет нормальную последовательность $X_1-X_2-X_3$, то молекула с обратной последовательностью будет $X_3-X_2-X_1$. Изобретение также охватывает "ретро-обратные" молекулы, в которых, как указано выше, последовательность аминокислот от amino-конца до карбокси-конца является обратной и остатки, которые обычно являются "L" энантиомерами, находятся в "D" стереоизомерной форме.

Стереоизомеры (например, D-аминокислоты) двадцати традиционных аминокислот, неприродные аминокислоты, такие как α -, α -дизамещённые аминокислоты, N-алкиламинокислоты, молочная кислота

и другие нетрадиционные аминокислоты могут также быть подходящими компонентами для полипептидов по данному изобретению. Примеры нетрадиционных аминокислот включают, без ограничения, аминоадипиновую кислоту, бета-аланин, бета-аминопропионовую кислоту, аминomásляную кислоту, пиперидиновую кислоту, аминапроповую кислоту, аминогептановую кислоту, аминоизомасляную кислоту, аминопимелиновую кислоту, диаминамасляную кислоту, десмозин, диаминопимелиновая кислота, диаминопропионовая кислота, N-этилглицин, N-этиласпарагин, гидроксизин, алло-гидроксизин, гидроксипролин, изодесмозин, алло-изолейцин, N-метилглицин, саркозин, N-метилизолейцин, N-метилвалин, норвалин, норлейцин, оритин, 4-гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат, ϵ -N,N,N-триметиллизин, ϵ -N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксизин, σ -N-метиларгинин и другие аналогичные аминокислоты и аминокислоты (например, 4-гидроксипролин).

Аналогично, если не указано иначе, левый конец одонитевых полинуклеотидных последовательностей обозначается как 5' конец; направление двухнитевых полинуклеотидных последовательностей влево называется 5' направление. Направление от 5' конца к 3' концу образующихся РНК транскриптов называется направление транскрипции; участки последовательности на нити ДНК, имеющие ту же последовательность, что и РНК, и которые расположены 5' к 5' концу РНК транскрипта, называются "последовательности в обратном направлении, upstream"; участки последовательности на нити ДНК, имеющие ту же последовательность, что и РНК, и которые расположены 3' к 3' концу РНК транскрипта, называются "последовательности в прямом направлении, downstream".

Понятно, что аминокислотные остатки можно разделить на классы, исходя из свойств общих боковых цепей:

1. Нейтральные гидрофобные: Аланин (Ala; A), Валин (Val; V), Лейцин (Leu; L), Изолейцин (Ile; I), Пролин (Pro; P), Триптофан (Trp; W), Фенилаланин (Phe; F) и Метионин (Met; M).
 2. Нейтральные полярные: Глицин (Gly; G), Серин (Ser; S), Треонин (Thr; T), Тирозин (Tyr; Y), Цистеин (Cys; C), Глутамин (Glu; Q), Аспарагин (Asn; N) и Норлейцин.
 3. Кислые: Аспарагиновая кислота (Asp; D), Глутаминовая кислота (Glu; E).
 - 4) Основные: Лизин (Lys; K), Аргинин (Arg; R), Гистидин (His; H).
- См. Lewin, B., Genes V., Oxford University Press (1994), p.11.

Консервативные аминокислотные замены могут включать нетрадиционные аминокислотные остатки, которые, как правило, встраиваются скорее химическим пептидным синтезом, нежели синтезом в биологических системах. Эти замены включают, без ограничения, пептидомиметики и другие обратные или инверсные формы аминокислотных фрагментов. Неконсервативные замены могут включать замену представителя одного из этих классов на представителя другого класса.

При осуществлении этих замен (изменений), согласно некоторым вариантам изобретения, можно учитывать гидропатический индекс. Каждой аминокислоте присвоен гидропатический индекс, исходя из показателей её гидрофобности и заряда. Эти индексы суть следующие: изолейцин (+4.5); валин (+4.2); лейцин (+3.8); фенилаланин (+2.8); цистеин/цистин (+2.5); метионин (+1.9); аланин (+1.8); глицин (-0.4); треонин (-0.7); серин (-0.8); триптофан (-0.9); тирозин (-1.3); пролин (-1.6); гистидин (-3.2); глутамат (-3.5); глутамин (-3.5); аспартат (-3.5); аспарагин (-3.5); лизин (-3.9) и аргинин (-4.5).

Из уровня техники понятно, как важен гидропатический индекс аминокислоты для приобретения белком интерактивной биологической функции. Kyte et al., J. Mol. Biol., 157: 105-131 (1982). Известно, что некоторые аминокислоты можно заменить на другие аминокислоты, имеющие сходный гидропатический индекс или показатель и всё ещё сохраняет аналогичную биологическую активность. При изменениях на основе гидропатического индекса некоторые варианты изобретения включают замены аминокислот, гидропатические индексы которых находятся в пределах ± 2 . Некоторые варианты изобретения включают замены аминокислот, гидропатические индексы которых находятся в пределах ± 1 , а некоторые варианты изобретения включают замены аминокислот, гидропатические индексы которых находятся в пределах ± 0.5 .

Также из уровня техники понятно, что замену подобной аминокислоты можно эффективно провести с учётом гидрофильности, когда полученное таким образом биологически функциональное "пептило" или полученный таким образом биологически функциональный пептид предполагается использовать в иммунологических вариантах изобретения, как в настоящем случае. В некоторых вариантах изобретения наибольшая локальная средняя гидрофильность белка, обусловленная гидрофильностью его смежных аминокислот, коррелируется с его иммуногенностью, т.е. с биологическим свойством белка.

Следующие значения гидрофильности относятся к этим аминокислотным остаткам; аргинин (+3.0); лизин (+3.0); аспартат (+3.0 ± 1); глутамат (+3.0 ± 1); серин (+0.3); аспарагин (+0.2); глутамин (+0.2); глицин (0); треонин (-0.4); пролин (-0.5 ± 1); аланин (-0.5); гистидин (-0.5); цистеин (-1.0); метионин (-1.3); валин (-1.5); лейцин (-1.8); изолейцин (-1.8); тирозин (-2.3); фенилаланин (-2.5) и триптофан (-3.4). При изменениях на основе сходных значений гидрофильности некоторые варианты изобретения включают замены аминокислот, величины гидрофильности которых находятся в пределах ± 2 . Некоторые варианты изобретения включают замены аминокислот, величины гидрофильности которых находятся в пределах ± 1 , а некоторые варианты изобретения включают замены аминокислот, величины гидрофильности которых

находятся в пределах ± 0.5 . Можно также идентифицировать эпитопы первичных аминокислотных последовательностей исходя из гидрофильности. Эти области также называются "эпитопные коровые области".

Примеры аминокислотных замен представлены ниже, в табл. 2.

Таблица 2

Аминокислотные замены

Исходный остаток	Примеры замен	Предпочтительные замены
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln, Glu, Asp	Gln
Asp	Glu, Glu, Asp	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn, Glu, Asp	Asn
Glu	Asp, Glu, Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, ys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Норлейцин	Leu
Leu	Норлейцин, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4-Диамино-масляная кислота, 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, Норлейцин	Leu

Опытные специалисты в данной области техники способны определить подходящие варианты полипептида, представленные в данном описании, используя широко известные методы. В некоторых вариантах изобретения специалист в данной области техники может идентифицировать подходящие области молекулы, которые можно изменить, не нарушая активность, нацеливаясь на участки, которые, как полагают, не являются важными для активности. В некоторых вариантах изобретения можно идентифицировать остатки и фрагменты молекул, являющиеся консервативными в аналогичных пептидах или полипептидах. В некоторых вариантах изобретения даже области, которые могут быть важны для биологической активности или структуры, можно подвергнуть консервативным аминокислотным заменам, не нарушая биологическую активность или не оказывая вредного влияния на структуру полипептида.

Кроме того, специалист в данной области техники может изучить работы по теме структура-функция, в которых идентифицируют остатки в сходных пептидах, которые важны для активности или структуры. Сравнение позволяет прогнозировать важность аминокислотных остатков в белке, которые соответствуют аминокислотным остаткам, важным для активности или структуры в аналогичных белках. Специалисты в данной области техники могут выбрать химически аналогичные замены на такие прогнозируемые важные аминокислотные остатки.

Специалисты в данной области техники могут также проанализировать трёхмерную структуру и первичную структуру аминокислотной последовательности в сравнении с такой структурой в аналогичных полипептидах. С учётом такой информации специалист в данной области техники может прогнозировать совмещение аминокислотных остатков антитела относительно его трёхмерной структуры. В некоторых вариантах изобретения специалист в данной области техники может предпочесть не делать радикальных изменений с аминокислотными остатками, которые, как прогнозировалось, расположены на

поверхности белка, так как такие остатки могут участвовать в важных взаимодействиях с другими молекулами. Кроме того, специалист в данной области техники может создать пробные варианты, содержащие единственную аминокислотную замену при каждом заданном аминокислотном остатке. Затем можно провести скрининг вариантов, используя методы анализа активности, известные специалистам в данной области техники. Такие данные можно использовать для сбора информации о подходящих вариантах. Например, если обнаруживается, что изменение в конкретном аминокислотном остатке приводит к нарушенной, нежелательно пониженной или неподходящей активности, вариантов с такими изменениями можно избежать.

Другими словами, с учётом информации, собранной в таких рутинных экспериментах, специалист в данной области техники может легко определить аминокислоты, дальнейших замен которых, одних или в комбинации с другими мутациями, следует избегать.

Ряд научных публикаций посвящен прогнозированию вторичной структуры. См. Moult J., *Curr. Op. in Biotech.*, 7(4):422-427 (1996), Chou et al., *Biochemistry*, 13(2):222-245 (1974); Chou et al., *Biochemistry*, 113(2):211-222 (1974); Chou et al., *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 47:45-148 (1978); Chou et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 47:251-276 и Chou et al., *Biophys. J.*, 26:367-384 (1979). Кроме того, в настоящее время компьютерные программы могут помочь при прогнозировании вторичной структуры. Один метод прогнозирования вторичной структуры основан на моделировании по гомологии. Например, два полипептида или белка, последовательности которых идентичны более чем на 30%, или подобие которых выше 40%, часто имеют подобную структурную топологию. Увеличение за последнее время структурной базы данных белков (PDB) обеспечило повышенную предсказуемость вторичной структуры, включая потенциальное число складок в структуре полипептида или белка. См. Holm et al., *Nucl. Acid. Res.*, 27(1):244-247 (1999). Было высказано предположение (Brenner et al., *Curr. Op. Struct. Biol.*, 7(3):369-376 (1997)), что в данном полипептиде или белке существует ограниченное число складок и что, если решено критическое число структур, точность прогнозирования структур резко возрастает.

Дополнительные методы прогнозирования вторичной структуры включают "вытягивание нити" (threading) (Jones, D., *Curr. Op. Struct. Biol.*, 7(3):377-87 (1997); Sippl et al., *Structure*, 4(1):15-19 (1996)); "профильный анализ" (Bowie et al., *Science*, 253:164-170 (1991); Gribskov et al., *Meth. Enzym.*, 183:146-159 (1990); Gribskov et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 84(13):4355-4358 (1987)), и "эволюционное связывание" (Holm, см. выше (1999), и Brenner, см. выше (1997)).

В некоторых вариантах изобретения варианты "пептитела" включают варианты гликозилирования, в которых один или более сайтов гликозилирования, таких как N-связанный сайт гликозилирования, добавлен к "пептителу". N-Связанный сайт гликозилирования характеризуется последовательностью: Asn-X-Ser или Asn-X-Thr, в которой аминокислотный остаток, обозначенный как X, может быть любым аминокислотным остатком, кроме пролина. Замена или введение (добавление) аминокислотных остатков с целью создания этой последовательности даёт потенциально новый сайт для введения N-связанной углеводной цепи. Или же замены, которые элиминируют эту последовательность, удаляют имеющуюся N-связанную углеводную цепь. Также охватывается перегруппировка N-связанных углеводных цепей, когда один или более N-связанных сайтов гликозилирования (как правило, тех, которые являются природными) элиминируются, а один или более новых N-связанных сайтов создаются.

Изобретение также охватывает "производные", которые включают "пептитела", несущие модификации, отличные от инсерций, делеций или замен аминокислотных остатков или в дополнение к этим инсерциям, делециям или заменам. Предпочтительно, модификации являются ковалентными по природе и включают, например, химическую связь с полимерами, липидами, другими органическими и неорганическими фрагментами. Производные по изобретению можно получать с целью увеличения периода полужизни "пептитела" в кровотоке или для повышения целевой способности "пептитела" по отношению к заданным клеткам, тканям или органам.

Примеры производных включают фрагменты, в которых сделаны одна или более из следующих модификаций:

одна или более пептидных [-C(O)NR-] связей (связей с пептидным фрагментом) заменены на непептидную связь, такую как -CH₂-карбаматную связь (связь с карбаматной группой) [-CH₂-O(CO)NR-]; фосфонатную связь; -CH₂-сульфонамидную [-CH₂-S(O)₂NR-] связь; уреиленовую (мочевина) [-NHC(O)NH-] связь; -связь -CH₂-вторичный амин; или связь с алкилированной пептидной группой [-C(O)NR⁶-, где R⁶ обозначает низший алкил];

пептиды, в которых N-конец превращен в -NRR¹ группу; в -NRC(O)R группу; в -NRC(O)OR группу; в -NRS(O)₂R группу; в -NHC(O)NHR группу, где R и R¹ обозначают водород или низший алкил, при условии, что R и R¹, оба вместе не обозначают водород; в сукцинимидную группу; в группу бензилоксикарбонил-NH-(CBZ-NH-); или в группу бензилоксикарбонил-NH-, содержащую от 1 до 3 заместителей в фенильном кольце, выбираемых из группы, состоящей из низшего алкила, низшего алкокси, хлор и бром; и

пептиды, в которых свободный C-конец дериватизирован в -C(O)R², где R² выбирают из группы, состоящей из низшей алкоксигруппы и -NR³R⁴, где R³ и R⁴ независимо выбирают из группы, состоящей из водорода и низшего алкила. Под "низшей" понимается группа, содержащая 1-6 углеродных атомов.

Кроме того, модификации отдельных аминокислот можно вводить в полипептиды или составы полипептидов по изобретению с помощью реакций нацеленных аминокислотных остатков пептида с органическим дериватизирующим агентом, способным реагировать с выбранными боковыми цепями концевых остатков. Ниже следуют примеры.

Лизинильные аминокислотные остатки могут реагировать с ангидридами янтарной или других дикарбоновых кислот. Дериватизация этими агентами влияет на реверсию заряда лизинильных остатков. Другие реагенты, подходящие для дериватизации альфа-аминосодержащих остатков, включают имидоэфиры, такие как метилпиколинимидат; пиридоксальфосфат; пиридоксаль; хлорборогидрид; тринитробензолсульфоновая кислота; О-метилизомочевина; 2,4-пентандион и глиоксилат, реакция с которым катализируется трансаминазой.

Аргинильные остатки могут быть модифицированы реакцией с одним или несколькими обычными реагентами, среди которых фенилглиоксаль, 2,3-бутандион, 1,2-циклогександион и нингидрин. При дериватизации аргининовых остатков необходимо, чтобы реакция проводилась в щелочной среде из-за высокого рКа гуанидиновой функциональной группы. Кроме того, эти реагенты могут реагировать с функциональной группой гуанидина остатков лизина, а также аргинина.

Специфическую модификацию тирозильных остатков изучали очень тщательно, особый интерес вызывало введение спектральных меток в тирозильный остаток реакцией с ароматическими диазониескими соединениями или тетранитрометаном. Обычно можно применять N-ацетилимидазол и тетранитрометан с образованием О-ацетилтирозильных фрагментов и 3 нитропроизводных соответственно.

Карбоксильные группы боковых цепей (аспарагил или глутамил) можно селективно модифицировать реакцией с карбодиимидами ($R'-N=C=N-R'$), такими как 1-циклогексил-3-(2-морфолинил-(4-этил)карбодиимид или 1-этил-3-(4-азония-4,4-диметилпентил)карбодиимид. Кроме того, остатки аспартил и глутамил можно превратить в аспарагинил и глутаминил по реакции ионами аммония.

Остатки глутаминил и аспарагинил часто дезаминируют в соответствующие остатки глутамил и аспарагил. Или же эти остатки можно дезаминировать в слабокислой среде. Любые формы этих остатков входят в объём данного изобретения.

Дериватизация с помощью бифункциональных агентов применима для перекрёстного связывания (сшивания) пептидов или их функциональных производных с нерастворимой в воде подложкой (матрикс) или с другими макромолекулярными носителями. Общеупотребительные агенты для сшивания включают, например, 1,1-бис(диазоацетил)-2-фенилэтан, глутаральдегид, N-гидроксисукцинимидоэфиры, например эфиры 4-азидосалициловой кислоты, гомобифункциональные имидоэфиры, включая дисукцинимидильные эфиры, такие как 3,3'-дитиобис(сукцинимидил пропионат), и бифункциональные малеинимиды, такие как бис-N-малеинимидо-1,8-октан. Дериватизирующие агенты, такие как метил-3-[(п-азидофенил)дитио]пропионимидат, дают фотоактивируемые интермедиаты, которые способны сшиваться на свету. Или же для иммобилизации белков можно использовать реакционноспособные нерастворимые в воде матрицы, такие как активируемые цианогенбромидом углеводы и реакционноспособные субстраты, описанные в патентах США 3969287; 3691016; 4195128; 4247642; 4229537 и 4330440.

Другие возможные модификации включают гидроксилирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп серильного или треонильного остатков, окисление атома серы в Cys, метилирование альфа-аминогрупп боковых цепей лизина, аргинина и гистидина. Creighton, T.E., *Proteins: Structure and Molecule Properties* (W.H. Freeman & Co., San Francisco), pp. 79-86 (1983).

Такие дериватизированные фрагменты предпочтительно улучшают одну или более характеристик соединений, включая антиангиогенную активность, растворимость, абсорбцию, биологический период полужизни и т.п. Или же дериватизацией фрагментов можно получить соединения, которые имеют такие же или практически такие же характеристики и/или свойства, что и у недеиватизированного соединения. Фрагменты можно либо элиминировать, либо можно ослаблять любой нежелательный побочный эффект соединения и т.п.

Соединения по данному изобретению можно также изменять на уровне ДНК. Последовательность ДНК любого участка соединения можно изменять на кодоны, более совместимые с выбранной клеткой-хозяином. Для *E. coli*, которая является предпочтительной клеткой-хозяином, оптимизированные кодоны известны из уровня техники. Кодоны могут быть замещены таким образом, чтобы элиминировать сайты рестрикции или ввести молчащие сайты рестрикции, которые могут способствовать процессированию ДНК в выбранной клетке-хозяине. Последовательности ДНК носителя, линкера и пептида могут быть модифицированы таким образом, чтобы включить любые из вышеуказанных изменений в последовательностях. Таким образом, все модификации, замены, дериватизации и т.д., обсуждаемые в данном описании, равно применимы ко всем аспектам настоящего изобретения, включая, но без ограничения, пептиды, димеры и мультимеры пептидов, линкеры и носители.

Кроме того, специалист в данной области техники может просмотреть работы по теме "структурасвойство", идентифицирующие остатки в аналогичных пептидах, важные для активности или структуры. С учётом такого сравнения можно предсказать важную роль аминокислотных остатков в пептиде, которые соответствуют аминокислотным остаткам, имеющим важное значение для активности или структуры аналогичных пептидов. Специалист в данной области техники может выбрать химически аналогич-

ные замены на такие прогнозируемые важные аминокислотные остатки.

Специалист в данной области техники может также проанализировать трёхмерную структуру и аминокислотную последовательность в сравнении с такой структурой в аналогичных полипептидах. С учётом такой информации специалист в данной области техники может прогнозировать совмещение аминокислотных остатков пептида относительно его трёхмерной структуры. Специалист в данной области техники может предпочесть не делать радикальных изменений аминокислотных остатков, которые, как прогнозировалось, расположены на поверхности белка, так как такие остатки могут участвовать в важных взаимодействиях с другими молекулами. Кроме того, специалист в данной области техники может создать пробные варианты, содержащие единственную аминокислотную замену при каждом заданном аминокислотном остатке. Затем можно провести скрининг вариантов, используя методы анализа активности, известные специалистам в данной области техники. Такие данные можно использовать для сбора информации о подходящих вариантах. Например, если обнаруживается, что изменение в конкретном аминокислотном остатке приводит к нарушенной, нежелательно пониженной или неподходящей активности, вариантов с такими изменениями можно избежать.

Другими словами, с учётом информации, собранной в таких рутинных экспериментах, специалист в данной области техники может легко определить аминокислоты, дальнейших замен которых, одних или в комбинации с другими мутациями, следует избегать.

Ряд научных публикаций посвящен прогнозированию вторичной структуры. См. Moulton J., *Curr. Op. in Biotech.*, 7(4):422-427 (1996), Chou et al., *Biochemistry*, 13(2):222-245 (1974); Chou et al., *Biochemistry*, 113(2):211-222 (1974); Chou et al., *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 47:45-148 (1978); Chou et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 47:251-276 и Chou et al., *Biophys. J.*, 26:367-384 (1979). Кроме того, в настоящее время компьютерные программы могут помочь при прогнозировании вторичной структуры. Один метод прогнозирования вторичной структуры основан на моделировании по гомологии. Например, два полипептида или белка, последовательности которых идентичны более чем на 30%, или подобие которых выше 40%, часто имеют подобную структурную топологию. Увеличение за последнее время структурной базы данных белков (PDB) обеспечило повышенную прогнозируемость (предсказуемость) вторичной структуры, включая потенциальное число складок в структуре полипептида или белка. См. Holm et al., *Nucl. Acid. Res.*, 27(1):244-247 (1999). Было высказано предположение (Brenner et al., *Curr. Op. Struct. Biol.*, 7(3):369-376 (1997)), что в данном полипептиде или белке существует ограниченное число складок и что, если решено критическое число структур, точность предсказания структур резко возрастает.

Дополнительные методы предсказания вторичной структуры включают "вытягивание (нити)" (threading) (Jones, D., *Curr. Op. Struct. Biol.*, 7(3):377-87 (1997); Sippl et al., *Structure*, 4(1):15-19 (1996)); "профильный анализ" (Bowie et al., *Science*, 253:164-170 (1991); Gribskov et al., *Meth. Enzym.*, 183:146-159 (1990); Gribskov et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 84(13):4355-4358 (1987)), и "эволюционное связывание" (Holm, см. выше (1999), и Brenner, см. выше (1997)).

Кроме того, изобретение охватывает производные специфически связывающихся агентов, например, "пептитела", ковалентно модифицированные таким образом, чтобы включить присоединение одного или более водорастворимых полимеров, таких как полиэтиленгликоль, полиоксиэтиленгликоль или полипропиленгликоль, описанные в патентах США: 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 и 4179337. Другие известные в технике подходящие полимеры включают: монометокси-полиэтиленгликоль, декстран, целлюлозу или другие полимеры на основе углеводов, поли-(N-винилпирролидон)-полиэтиленгликоль, гомополимеры полипропиленгликоля, сополимер полипропиленоксид/этиленоксид, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин) и поливиниловый спирт, а также смеси этих полимеров. Особенно предпочтительными являются "пептитела", ковалентно модифицированные субъединицами полиэтиленгликоля (ПЭГ). Водорастворимые полимеры присоединяются по конкретным положениям, например, по аминоконцам "пептител", или произвольно присоединяются к одной или более боковых цепей полипептида. Применение ПЭГ для улучшения терапевтических свойств специфически связывающихся агентов, например, "пептител", и для "гуманизации" антител в частности, описано в патенте США 6133426, принадлежащем Gonzales et al., выданном 17 октября 2000 г.

В изобретении также рассматривается дериватизация пептидной области соединений и/или области соединений, являющуюся носителем. Такие производные позволяют повысить растворимость, абсорбцию, биологический период полужизни и т.п. соединений. Фрагменты можно либо элиминировать, либо можно ослаблять любой нежелательный побочный эффект соединения и т.п. Примеры производных включают соединения, в которых

1. Соединение или некий его участок является циклическим. Например, пептидный участок можно модифицировать таким образом, чтобы он содержал два или более Cys остатков (например, в линкере), которые могут циклизироваться за счёт образования дисульфидной связи.

2. Соединение является сшитым или его молекулы способны образовывать перекрёстные связи (сшивание). Например, пептидный участок можно модифицировать таким образом, чтобы он содержал Cys остаток и поэтому мог образовывать межмолекулярную дисульфидную связь с аналогичной молекулой. Соединение может также сшиваться по C-концу.

3. Одна или более пептидных [-C(O)NR-] связей (фрагментов) замещается на непептидную

связь. Примерами непептидных связей являются $-\text{CH}_2$ -карбамат $[-\text{CH}_2-\text{OC}(\text{O})\text{NR}-]$, фосфонат, $-\text{CH}_2$ -сульфонамид $[-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}-]$, уреил (мочевина) $[-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}-]$, $-\text{CH}_2$ -вторичный амин и алкилированный пептид $[-\text{C}(\text{O})\text{NR}^6-]$, где R^6 обозначает низший алкил.

4. N-конец дериватизирован. Как правило, N-конец может быть ацилирован или модифицирован превращением в соответствующий амин. Примеры производных N-концевых групп включают $-\text{NRR}^1$ (иной, нежели $-\text{NH}_2$), $-\text{NRC}(\text{O})\text{R}^1$, $-\text{NRC}(\text{O})\text{OR}^1$, $-\text{NHS}(\text{O})_2\text{R}^1$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHR}^1$, сукцинимид или бензилоксикарбонил $-\text{NH}-$ (CBZ-NH-), в которых R и R^1 , каждый независимо, обозначают водород или низший алкил и фенильное кольцо может иметь от 1 до 3 заместителей, выбираемых из группы, состоящей из C_1 -С₄алкила, C_1 -С₄алкокси, хлора и брома.

5. Свободный C-конец дериватизирован. Как правило, C-конец этерифицируют или амидируют (превращают в амид). Например, можно использовать описанные в технике методы присоединения $(\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2)_2$ по C-концу соединений по изобретению. Аналогично можно использовать описанные в технике методы для присоединения $-\text{NH}_2$ по C-концу соединений по изобретению. Примеры производных C-концевых групп включают $-\text{C}(\text{O})\text{R}^2$, где R^2 обозначает низший алкокси, или $-\text{NR}^3\text{R}^4$, где R^3 и R^4 независимо обозначают водород или C_1 -С₈алкил (предпочтительно C_1 -С₄алкил).

6. Дисульфидную связь (мостик) заменяют другим, предпочтительно более устойчивым сшивающим фрагментом (например, алкиленовым мостиком). См., например, Bhatnagar см. выше; Alberts et al. Thirteenth Am. Pep. Symp., 357-9 (1993).

7. Один или более отдельных аминокислотных остатков модифицирован. Известны различные дериватирующие агенты, которые специфически реагируют с выбранными остатками боковых цепей или концевыми остатками, как подробнее описано ниже.

Лизинильные остатки или аминоконцевые остатки могут реагировать с ангидридами янтарной или других карбоновых кислот, которые меняют на обратный (реверсия) заряд лизинильных остатков. Другие подходящие реагенты для дериватизации альфа-аминосодержащих остатков включают имидоэфиры, такие как метилпиколинимидат; пиридоксальфосфат; пиридоксаль; хлорборогидрид; тринитробензолсульфоокислоту; О-метилизомочевину; 2,4-пентандион; и глиоксилат, реакцию с которым катализирует трансаминаза.

Аргинильные остатки могут быть модифицированы реакцией с любым или с комбинацией нескольких обычных реагентов, включая фенилглиоксаль, 2,3-бутандион, 1,2-циклогександион и нингидрин. Дериватизация аргинильных остатков требует, чтобы реакцию проводили в щелочной среде вследствие высокого значения рКа функциональной группы гуанидина. Кроме того, эти реагенты могут реагировать с группами лизина, а также с epsilon-аминогруппой аргинина.

Очень тщательно изучалась специфическая модификация тирозильных остатков, при этом особый интерес вызвало введение спектральных меток в тирозильные остатки по реакции с ароматическими диазониевыми соединениями или тетранитрометаном. Чаще всего используют N-ацетилимидазол и тетранитрометан для образования О-ацетилтирозильных фрагментов и 3-нитропроизводных, соответственно.

Карбоксильные группы боковых цепей (аспарагил или глутамил) можно селективно модифицировать реакцией с карбодиимидами ($\text{R}'\text{-N}=\text{C}=\text{N-R}'$), например с 1-циклогексил-3-(2-морфолинил-(4-этил)карбодиимидом или с 1-этил-3-(4-азония-4,4-диметилпентил)карбодиимидом. Кроме того, остатки аспарагил и глутамил могут быть превращены в аспарагинильный и глутаминильный остатки реакцией с ионами аммония.

Глутаминильный и аспарагинильный остатки можно дезаминировать до соответствующих глутамильного и аспарагильного остатков. Или же можно дезаминировать в слабокислой среде. Любая форма этих остатков входит в объем данного изобретения.

Цистеинильные остатки могут быть замещены аминокислотными остатками или другими фрагментами либо с целью элиминировать дисульфидный мостик, либо, наоборот, стабилизировать сшивание (молекул). См., например, Bhatnagar, см. выше.

Дериватизация с помощью бифункциональных агентов применима для перекрестного связывания (сшивания) пептидов или их функциональных производных с нерастворимой в воде подложкой (матрикс) или с другими макромолекулярными носителями. Общеупотребительные агенты для сшивания включают, например, 1,1-бис(диазоацетил)-2-фенилэтан, глутаральдегид, N-гидроксисукцинимидоэфиры, например эфиры 4-азидосалициловой кислоты, гомобифункциональные имидоэфиры, включая дисукцинимидильные эфиры, такие как 3,3'-дитиобис(сукцинимидил пропионат), и бифункциональные малеинимиды, такие как бис-N-малеинимидо-1,8-октан. Дериватирующие агенты, такие как метил-3-[(п-азидофенил)дитио]пропиоимидат, дают фотоактивируемые интермедиаты, которые способны сшиваться на свету. Или же для иммобилизации белков используют реакционноспособные нерастворимые в воде матрицы, такие как активируемые цианогенбромидом углеводы и реакционноспособные субстраты, описанные в патентах США 3969287; 3691016; 4195128; 4247642; 4229537 и 4330440.

Углеводные (олигосахаридные) группы удобно присоединять к сайтам, известным как сайты гликозилирования в белках. Как правило, O-связанные олигосахариды присоединяются к остаткам серина (Ser) или треонина (Thr), тогда как N-связанные олигосахариды присоединяются к остаткам аспарагина (Asn), когда они являются частью последовательности Asn-X-Ser/Thr, где X может быть любой аминокислотой, кроме пролина. X, предпочтительно, является одной из 19 природных аминокислот, кроме пролина.

Структура N-связанных и O-связанных олигосахаридов и остатков сахаров, обнаруживаемых в каждом типе, различна. Один тип сахаров, который обычно находят в обоих случаях, представляет собой N-ацетилнейраминую кислоту (называемую сиаловой кислотой). Сиаловая кислота является обычно концевым остатком как N-связанных, так и O-связанных олигосахаридов и, вследствие своего отрицательного заряда, может придавать кислые свойства гликозилированному соединению. Такой(ие) сайт(ы) можно включать в линкер в линкер соединений по данному изобретению и предпочтительно гликозилировать при участии клетки в процессе рекомбинантного продуцирования полипептидных соединений (например, в клетках млекопитающих, таких как CHO, BHK, COS). Однако такие сайты можно дополнительно гликозилировать синтетическими или полусинтетическими методами, известными в технике.

Другие возможные модификации включают гидроксилирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп сериального или треонинного остатков, окисление атома серы в Cys, метилирование альфа-аминогрупп боковых цепей лизина, аргинина и гистидина. [Creighton, *Proteins: Structure and Molecule Properties* (W.H. Freeman & Co., San Francisco), pp. 79-86 (1983).

Соединения по данному изобретению можно также изменять на уровне ДНК. Последовательность ДНК любого участка соединения можно заменять на кодоны, более совместимые с выбранной клеткой-хозяином. Для *E. coli*, которая является предпочтительной клеткой-хозяином, оптимизированные кодоны известны из уровня техники. Кодоны могут быть замещены таким образом, чтобы элиминировать сайты рестрикции или ввести молчащие сайты рестрикции, которые могут способствовать процессированию ДНК в выбранной клетке-хозяине. Последовательности ДНК носителя, линкера и пептида могут быть модифицированы таким образом, чтобы включить любые из вышеуказанных изменений в последовательностях.

Созревание аффинности

Один вариант настоящего изобретения включает "зрелые с точки зрения аффинности" ("зрелые по аффинности") пептиды и "пептитела". Этот метод рассматривает повышение аффинности или биоактивность пептидов и "пептител" по данному изобретению с использованием фагового дисплея или других методов отбора. На основе консенсусной последовательности (которую создают для коллекции родственных пептидов) могут быть созданы направленные вторичные библиотеки пептидов методом фагового дисплея, в которых "коровые" аминокислоты (определяемые из консенсусной последовательности) остаются постоянными или смещёнными по их встречаемости. Или же для создания смещённой направленной библиотеки пептидов по методу фагового дисплея можно использовать отдельную пептидную последовательность. Пэннингом таких библиотек можно получить пептиды (которые можно превратить в "пептитела") с повышенным связыванием с Ang-2 или с повышенной биоактивностью.

Непептидные аналоги/белки-миметики

Далее рассматриваются также непептидные аналоги пептидов, которые обеспечивают стабилизированную структуру или пониженное биологическое разложение. Аналоги-пептидомиметики можно получать на основе выбранного ингибирующего пептида заменой одного или более остатков на непептидные фрагменты. Предпочтительно непептидные фрагменты дают возможность пептиду сохранять его естественную конформацию или стабилизировать предпочтительную, например биоактивную конформацию, которая сохраняет способность распознавать Ang-2. В одном аспекте полученный аналог/миметик проявляет повышенную аффинность связывания с Ang-2. Один пример способов получения непептидных миметических (имитирующих) аналогов с участием пептидов описан в Nachman et al., *Regul. Pept.* 57: 359-370 (1995). При желании пептиды по изобретению можно модифицировать, например, гликозилированием, амидированием, карбоксилированием или фосфорилированием или получать из них соли при соединения, амиды, эфиры, в частности, C-концевые эфиры, N-ацильные производные пептидов по изобретению. "Пептитела" также можно модифицировать, получая пептидные производные за счёт образования ковалентных или нековалентных комплексов с другими фрагментами. Ковалентно связанные комплексы можно получать, соединяя химические фрагменты с функциональными группами в боковых цепях аминокислот, составляющих "пептитела", или на N- или C-конце.

В частности, предполагается, что пептиды могут конъюгировать с контрольной группой, включая, но без ограничения, радиоактивную метку, флуоресцентную метку, фермент (например, катализирующий колориметрическую или флуориметрическую реакцию), субстрат, твёрдая матрица (подложка) или носитель (например, биотин или авидин). Таким образом, изобретение включает молекулу, содержащую молекулу "пептитела", причём эта молекула предпочтительно дополнительно содержит репортёрную (контрольную) группу, выбираемую из группы, состоящей из радиоактивной метки, флуоресцентной метки, фермента, субстрата, твёрдой матрицы (подложки) и носителя. Такие метки хорошо известны специалистам в данной области техники, например, специально рассматриваются биотиновые метки. Применение таких меток хорошо известно специалистам в данной области техники и описано, например, в патентах США 3817837; 3850752; 3996345 и 4277437. Другие подходящие метки включают, но без ограничения, радиоактивные метки, флуоресцентные метки и хемилюминесцентные метки. В патентах США 3817837, 3850752; 3939350 и 3996345 рассматривается применение таких меток. Любые пептитела по данному изобретению могут содержать одну, две или более любых из этих меток.

Методы получения пептидов

Пептиды по данному изобретению можно получать, используя широкий ряд методов, известных в технике. Например, такие пептиды можно синтезировать в растворе или на твёрдой подложке (твёрдом носителе) обычными методами. Промышленностью выпускаются различные автоматические синтезаторы и их можно применять в соответствии с известными протоколами. См., например, Stewart and Young (см. выше); Tam et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 105:6442, (1983); Merrifield, *Science* 232:341-347 (1986); Barany and Merrifield, *The Pentides*, Gross and Meienhofer, eds, Academic Press, New York, 1-284; Barany et al., *Int. J. Pep. Protein Res.*, 30:705-739 (1987); и патент США 5424398, каждый из источников вводится в данное описание в качестве ссылки.

В методах твердофазного пептидного синтеза применяют сополимер стирола с дивинилбензолом, содержащим 0,1-1,0 мМ аминов/г полимера. В этих методах пептидного синтеза используют бутилоксикарбонильную (трет-BOC) или 9-фторметилоксикарбонильную (FMOC) группы для защиты альфа-аминогрупп. Оба метода включают постадийный синтез, при котором на каждой стадии добавляют одну аминокислоту, начиная с C-конца пептида (См. Coligan et al., *Curr. Prot. Immunol.*, Wiley Interscience, 1991, Unit 9). По завершении химического синтеза можно провести депротекцию синтетического пептида с удалением блокирующих аминокислоты групп трет-BOC или FMOC и отщеплением полимера обработкой кислотой при пониженной температуре (например, жидкий HF-10% анизол в течение, примерно, 0,25-1 ч при 0°C). После упаривания реагентов пептиды экстрагируют из полимера 1% раствором уксусной кислоты, который затем лиофилизируют, получая сырой продукт. Этот продукт можно обычно очищать такими методами, как гель-фильтрация на Sephadex G-15, используя в качестве растворителя 5% уксусную кислоту. Лиофилизацией соответствующих фракций после элюции с колонки получают гомогенные пептиды или производные пептидов, которые можно затем охарактеризовать такими стандартными методами, как аминокислотный анализ, тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, УФ спектроскопия, молекулярное вращение, растворимость и количественно рассчитывают методом расщепления по Эдману в твердой фазе.

Также применяются другие методы, такие как селекция пептидов из библиотеки на основе метода фагового дисплея. Библиотеки можно получать из наборов аминокислот по данному описанию. Метод фагового дисплея может быть особенно эффективен при идентификации пептидов, применимых по данному изобретению. Коротко говоря, получают "фаговую библиотеку" (используя, примерно, мл 13, fd или лямбда фага), выявляющую инсерты от 4, примерно, до 80 аминокислотных остатков. Инсерты могут представлять собой, например, полностью выраженный или смещённый ранжированный ряд. Затем можно выбрать несущие фаг инсерты, которые связываются с нужным антигеном. Этот процесс можно повторять с помощью нескольких циклов повторной селекции фага, который связывается с антигеном. Повторные циклы обогащают несущих фаг конкретных последовательностей. Можно проводить анализ последовательности ДНК для идентификации последовательностей экспрессируемых пептидов. Можно определить минимальный линейный участок последовательности, который связывается с заданным антигеном. Можно повторить процедуру, используя "смещённую" библиотеку, включающую инсерты, содержащие часть целого или минимальный линейный участок плюс один или более дополнительных вырожденных остатков в обратном (3'-5') или прямом (5'-3') направлении от него. Эти методы позволяют идентифицировать пептиды, которые ещё сильнее связываются с Ang-2, чем агенты, уже идентифицированные по данному описанию.

Вне зависимости от метода получения пептидов, молекулу нуклеотида, кодирующего каждый такой пептид и каждое такое "пептитело", можно получать стандартными методами рекомбинантной ДНК. Нуклеотидной последовательностью такой молекулы ДНК можно манипулировать соответствующим образом, не изменяя аминокислотной последовательности, которую они кодируют, чтобы получить вырожденный нуклеотидный код, а также предпочтение по кодону в конкретных клетках-хозяевах.

Методы рекомбинантной ДНК являются удобными методами получения полноразмерных полипептидов и других больших белковых специфически связывающихся агентов по данному изобретению или их фрагментов. Молекулу ДНК, кодирующую "пептитело" или его фрагмент, можно встроить в экспрессирующий вектор, который, в свою очередь, вводят в клетку-хозяина для продуцирования антитела или фрагмента.

Как правило, молекулу ДНК, кодирующую пептид или "пептитело", можно получить по методикам, представленным в разделе "Примеры" данного описания. Зонды и типичные условия гибридизации описаны в Ausubel et al. (*Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols Press [1994]). После гибридизации блот с зондом отмывают в условиях с подходящей жёсткостью в зависимости от таких факторов, как размер зонда, ожидаемая степень гомологии зонда с клоном, тип библиотеки, скрининг которой проводится, и число клонов, которое подвергается скринингу. Примеры скрининга в очень жёстких условиях суть 0.1 X SSC и 0.1% SDS при температуре около 50-65°C.

Для идентификации пептидов по изобретению, связывающихся с Ang-2, можно также применять метод двухгибридного скрининга в дрожжах. Так, антиген или его фрагмент можно использовать для скрининга пептидных библиотек, включая библиотеки "фагового дисплея", чтобы идентифицировать и выбрать агенты, связывающиеся с Ang-2, например "пептитела", по данному изобретению.

Или же для содержания и экспрессии пептидов по изобретению можно применять системы экспрессирующий вектор/хозяин. Эти системы включают, но без ограничения, микроорганизмы, такие как бактерии, трансформированные рекомбинантным бактериофагом, векторы экспрессии плазмидных или космидных ДНК, дрожжи, трансформированные с использованием дрожжевых векторов экспрессии; системы клеток насекомых, инфицированных вирусными векторами экспрессии (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом табачной мозаики; TMV) или системами животных клеток. Клетки млекопитающих, применимые для получения рекомбинантных белков, включают, но без ограничения, клетки VERO, клетки HeLa, клетки яичников китайского хомячка (CHO), клетки COS (такие как COS-7), клетки W138, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562 и 293. Примеры протоколов рекомбинантной экспрессии пептидов представлены ниже в данном описании.

Термин "вектор экспрессии", "экспрессирующий вектор" относится к плазмиде, фагу, вирусу или вектору для экспрессии полипептида при использовании последовательности ДНК (РНК). Экспрессирующий вектор может содержать транскрипционную единицу, представляющую собой сборку (1) генетического элемента или генетических элементов, играющих роль регуляторных элементов в генной экспрессии, например, промоторов или энхансеров, (2) структуры или последовательности, кодирующей связывающийся агент, которая транскрибируется в мРНК и транслируется в белок, и (3) соответствующих последовательностей инициации и терминации транскрипции. Структурные единицы для предполагаемого применения в дрожжевых и эукариотных системах экспрессии, предпочтительно, включают лидерную последовательность, способствующую внеклеточной секреции транслированного белка клеткой-хозяином. Или же, если рекомбинантный белок экспрессируется без лидерной или транспортной последовательности, он может включать аминоконцевой метионильный остаток. Этот остаток может затем отщепляться или не отщепляться от экспрессированного рекомбинантного белка с целью получения конечного пептидного продукта.

Например, пептиды можно рекомбинантно экспрессировать в дрожжах, используя промышленную систему экспрессии, например, Pichia Expression System (Invitrogen, San Diego, CA), следуя инструкциям производителя. Основную роль в непосредственной экспрессии в этой системе также играет пре-про-альфа последовательность, но транскрипция инсера управляется промотором алкогольоксидазы (AOX1) при индукции метанолом.

Секретируемый пептид очищают от питательной среды для дрожжей, например, методами, применяемыми для очистки пептида от супернатанта бактериальных клеток и клеток млекопитающих.

Или же кДНК, кодирующую пептид, можно клонировать в бакуловирусный вектор экспрессии pVL1393 (PharMingen, San Diego, CA). Этот вектор можно использовать в соответствии с рекомендациями производителя (PharMingen) для инфицирования клеток *Spodoptera frugiperda* в безбелковых средах sF9 и для продуцирования рекомбинантного белка. Рекомбинантный белок можно очистить от среды и концентрировать на колонке с гепарин-сефарозой (Pharmacia).

Или же пептид можно экспрессировать в системе экспрессии в клетках насекомых. Системы экспрессии белка в клетках насекомых хорошо известны специалистам в данной области техники. В одной такой системе вирус ядерного полиэдрома *Autographa californica* (AcNPV) можно использовать в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов в клетках *Spodoptera frugiperda* или *Trichoplusia larvae*. Последовательность, кодирующую пептид, можно клонировать в не основной участок вируса, такого как ген полиэдрина, и поместить под контроль промотора полиэдрина. Успешная инсерция пептида делает ген полиэдрина неактивным, в результате продуцирует рекомбинантный вирус без оболочки оболочечного белка. Рекомбинантные вирусы можно использовать для инфицирования клеток *S. frugiperda* или *Trichoplusia larvae*, в которых экспрессируется пептид. Smith et al., J. Virol. 46: 584 (1983); Engelhardt et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 91: 3224-7 (1994).

В другом примере последовательность ДНК, кодирующую пептид, можно амплифицировать при использовании ПЦР и клонировать в соответствующий вектор, например, pGEX-3X (Pharmacia). Вектор pGEX-3X создан для продуцирования слитого белка, содержащего глутатион-S-трансферазу (GST), кодируемую вектором, и белок, кодируемый фрагментом ДНК, встроенным в сайт клонирования вектора. Можно получать праймеры для ПЦР, включающие, например, соответствующий сайт расщепления. Когда фрагмент слияния используют только для облегчения экспрессии или иным образом, нежелательным с точки зрения присоединения к пептиду, представляющему интерес, рекомбинантный слитый белок можно затем отщепить от участка GST слитого белка. Пептидную конструкцию pGEX-3X/связывающийся агент трансформируют в клетки *E. coli* XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla CA), и отдельные трансформанты выделяют и выращивают. Плазмидную ДНК индивидуальных трансформантов можно очистить и частично секвенировать, используя автоматический секвенатор, с целью подтвердить присутствие заданного специфически связывающегося агента, кодирующего нуклеотидный инсерт в подходящей ориентации.

Некоторые составы пептидов по данному изобретению представляют собой такие составы, в которых "пептитело" конъюгировано с любым противоопухолевым пептидом, таким как фактор некроза опухолевых клеток (TNF). В особенно предпочтительном методе химерные пептиды TNF-специфически связывающийся агент получают в виде рекомбинантных слияний с кодирующими пептид последователь-

ностями, слитыми в рамке считывания с последовательностями, кодирующими TNF (Novagen, Madison, WI). кДНК пептид-TNF можно клонировать в вектор pET-11b (Novagen) и экспрессию TNF-пептидов в BL21 E. coli можно индуцировать в соответствии с инструкциями производителя pET11b. Растворимые TNF-пептиды можно очистить от бактериальных лизатов препаратом сульфата аммония, хроматографией с гидрофобным взаимодействием на Фенил-Сефарозе Phenil-Sepharose 6 Fast Flow, ионообменной хроматографией на DEAE-Sepharose Fast Flow и гель фильтрацией Sephacryl-S-300 HR.

Слитый белок, который можно продуцировать в виде нерастворимых телец включения в бактериях, можно очистить следующим образом. Клетки-хозяева можно разрушить центрифугированием: отмыть 0,15M NaCl, 10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA и обработать 0,1 мг/мл лизоцима (Sigma, St. Louis, MO) в течение 15 мин при комнатной температуре. Лизат можно осветлять ультразвуком и клеточный дебрис высаждают центрифугированием в течение 10 мин при 12000 X g. Пеллеты, содержащие слитый белок, снова суспендируют в 50 mM Tris, pH 8 и 10 mM EDTA, расслаивают с 50% глицерином и центрифугируют в течение 30 мин при 6000 X g. Дебрис можно снова суспендировать в стандартном фосфатно-солевом буферном растворе (PBS), не содержащем Mg^{++} и Ca^{++} . Слитый белок можно дополнительно очистить, фракционируя повторно суспендированный дебрис в денатурирующем SDS-PAGE (Sambrook et al., см. выше). Гель можно пропитать 0,4M KCl для визуализации белка, вырезать и выделить методом электроэлюции, элюируя буфером для промывания геля, не содержащим SDS. Если GST/слитый белок получают в клетках бактерий в виде растворимого белка, его можно очистить с применением GST Purification Module (Pharmacia).

Слитый белок можно подвергнуть расщеплению, чтобы отщепить GST от пептида по изобретению. Реакция гидролиза (20-40 мг слитого белка, 20-30 единиц человеческого тромбина (4000 Ед/мг, Sigma) в 0,5 мл PBS можно инкубировать в течение 16-48 ч при комнатной температуре и загружают на денатурирующем SDS-PAGE геле с целью фракционировать продукты реакции. Гель можно пропитать 0,4M KCl для визуализации полос белка. Идентичность полос белка, соответствующих ожидаемой молекулярной массе пептида, можно подтвердить анализом аминокислотной последовательности (Applied Biosystems Model 473A, Foster City CA). Или же идентичность можно подтвердить методами ВЭЖХ и/или масс-спектрометрии пептидов.

Или же последовательность ДНК, кодирующую пептид, можно клонировать в плазмиду, содержащую заданный промотор и, необязательно, лидерную последовательность [Better et al., Science 240; 1041-43 (1988)]. Последовательность этой конструкции можно подтвердить автоматическим секвенированием. Затем плазмиду можно стандартными методами трансформировать в штамм MC1061 E. coli, подвергая бактерии инкубации с $CaCl_2$ и тепловому шоку (Sambrook et al., см. выше). Трансформированные бактерии можно выращивать в среде LB, дополненной карбенициллином, и продуцирование экспрессированного белка можно индуцировать выращиванием в соответствующей среде. Если присутствует лидерная последовательность, она может осуществлять секрецию пептида и её можно отщеплять в процессе секреции.

Секретированный рекомбинантный белок можно очищать от бактериальной культуральной среды, представленными далее в настоящем описании.

Системы хозяев-млекопитающих для экспрессии рекомбинантного белка хорошо известны специалистам в данной области техники. Штаммы клеток-хозяев можно выбирать в соответствии с конкретной способности процессировать экспрессируемый белок или продуцировать некоторые посттрансляционные модификации, которые могут быть полезны для придания белку активности. Такие модификации белка включают, но без ограничения, ацетилирование, карбоксилирование, гликозилирование, фосфорилирование, обработку липидом и ацилирование. У различных клеток-хозяев, таких как CHO, HeLa, MDCK, 293, W138 и т.п., различные клеточные механизмы, и можно выбрать характеристические механизмы для такой посттрансляционной активности, чтобы гарантировать корректную модификацию и процессирование введённого чужеродного белка.

Предпочтительно, чтобы трансформированные клетки можно было применять для получения белка с высоким выходом в течение длительного времени и, следовательно, желательна стабильная экспрессия. После того как такие клетки трансформированы при использовании вектора, который содержит селективные маркёры наряду с заданной кассетой экспрессии, клетки можно выращивать в течение 1-2 дней в обогащенной среде перед тем, как поменять её на селективную среду. Создают селективный маркёр для придания резистентности к селекции, и его присутствие даёт возможность выращивать и очищать клетки, которые последовательно экспрессируют введённые последовательности.

Резистентные группы стабильно трансформированных клеток можно пролиферировать, используя методы работы с тканевыми культурами, подходящие для клетки.

Для очистки клеток, трансформированных с целью продуцирования рекомбинантных белков, можно использовать ряд систем селекции. Такие системы селекции включают, но без ограничения, гены HSV тимидинкиназы, гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазы в tk-, hgpt- или aprt-клетках соответственно. А резистентность к антиметаболитам можно использовать как основу для селекции на (ген) DHFR, который придаёт устойчивость (резистентность) к метотрексату; (ген) gpt, который придаёт устойчивость к микрофенольной кислоте; (ген) neo, который придаёт устойчивость к аминогликозиду G418 к хлорсульфону; и (ген) hyg, который придаёт устойчивость к гигромицину. Дополнительные селек-

тивные гены, которые можно применять, включают *trpB*, который делает возможным использовать в клетках индол вместо триптофана, или *hisD*, позволяющий использовать в клетках гистинол вместо гистидина. Маркёры, наличие которых даёт визуальную индикацию для идентификации трансформантов, включают антоцианины, β -глюкуронидазу и её субстрат, GUS, люциферазу и её субстрат, люциферин.

Очистка и переукладка специфически связывающихся агентов

В некоторых случаях может потребоваться "переукладка" (повторная укладка) и окисление специфически связывающихся агентов, таких как пептиды и/или "пептитела" в соответствующие третичные структуры, и образование дисульфидных связей для достижения биологической активности. "Переукладку" можно выполнить многими методами, хорошо известными в технике. Такие методы включают, например, экспонирование стабилизированного полипептидного агента при pH, как правило, выше 7 в присутствии хаотропного агента. Селекция хаотропного агента подобна отбору, используемому для селекции телцов включения, однако, хаотропный агент, как правило, используют в более низкой концентрации. Примером хаотропного агента является гуанидин. В большинстве случаев раствор для переукладки/окисления содержит также восстанавливающий агент плюс его окисленную форму в специфическом соотношении с целью достижения конкретного окислительно-восстановительного потенциала, который делает возможным "перетасовку" дисульфидных групп с образованием цистеиновых мостиков. Некоторые общепотребительные пары окислитель-восстановитель включают цистеин/цистамин, глутатион/дитиобисGSH, монохлорид меди, дитиотреитол DTT/дитианDTT и 2-меркаптоэтанол (bME)/дитио-bME.

Во многих случаях для повышения эффективности переукладки можно использовать сорастворитель. Обычно в качестве сорастворителей используют глицерин, полиэтиленгликоль с различной молекулярной массой и аргинин.

Может потребоваться очистка пептидов и "пептител" по данному изобретению. Методы очистки белков хорошо известны специалистам в данной области техники. Эти методы включают, на первой стадии, грубое разделение белковых и небелковых фракций. После отделения пептида и/или "пептитела" от других белков представляющие интерес пептид или "пептитело" можно далее очищать хроматографическими и электрофоретическими методами, достигая частичной или полной очистки (или очистки до гомогенности). Аналитическими методами, особенно пригодными для получения "пептител" и пептидов по данному изобретению, являются ионообменная хроматография, эксклюзионная хроматография; электрофорез в акриламидном геле; изоэлектрофокусировка. Особенно эффективным методом очистки пептидов является скоростная жидкостная хроматография белков или даже ВЭЖХ.

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к очистке и, в конкретных вариантах, к практически полной (существенной) очистке, "пептитела" или пептида по данному изобретению. Понятие "очищенное "пептитело" или "очищенный пептид" по данному описанию предполагает состав полипептида, способный отделяться от других компонентов, при этом "пептитело" или пептид очищают до некоторой степени, сравнимой с его естественным состоянием. Следовательно, понятие "очищенный пептид" или "очищенное "пептитело" также относятся к "пептителу" или к пептиду, не содержащему примесей среды, в которой он может встречается в природе.

Как правило, понятие "очищенный " относится к составу пептида или "пептитела", который подвергся фракционированию с целью удаления различных других компонентов, при этом составы пептида или "пептитела" практически сохраняют свою экспрессируемую биологическую активность. Если употребляется понятие "практически чистый", это обозначение относится к составу пептида или "пептитела", в котором "пептитело" или пептид образуют основной компонент состава, например, составляющий около 50, около 60, около 70, около 80, около 90, около 95% или более белков в составе.

Различные методы количественной оценки степени очистки пептида или "пептитела" станут понятны специалистам в данной области техники в свете настоящего описания. Эти методы включают, например, определение активности специфического связывания активной фракции или оценку количества пептида или "пептитела" во фракции методом SDS/PAGE. Предпочтительный метод оценки чистоты пептидной фракции или фракции "пептитела" представляет собой расчёт активности связывания фракции, сравнение с активностью связывания исходного экстракта и следующий из этого расчёт степени очистки, в данном описании оцениваемой как "-кратный показатель очистки". Действительные числа, применяемые для того, чтобы представить величину активности связывания, естественно, будут зависеть от конкретного метода анализа, выбранного для очистки, и от того, проявляют или нет "пептитело" или пептид обнаруживаемую активность связывания.

Различные методы, пригодные для очистки, хорошо известны специалистам в данной области техники. Эти методы включают, например, осаждение сульфатом аммония, ПЭГ, антителами (иммунопреципитация) и т.п. или тепловой денатурацией с последующим центрифугированием; стадии хроматографии, такие как аффинная хроматография (например, на Протеин-А-Сефарозе), ионообменная, гель-фильтрация, обращённофазовая, хроматография на гидроксилпатите и аффинная хроматография; изоэлектрофокусировка; электрофорез в геле; и комбинация этих и других методов. Как общеизвестно в технике, порядок проведения различных стадий очистки можно изменять или некоторые стадии можно опустить и всё равно получить практически чистый специфически связывающийся агент.

Не всегда требуется, чтобы пептид или "пептитело" по настоящему изобретению были абсолютно

чистыми. На самом деле, рассматривается, что в некоторых вариантах изобретения применяются менее чистые продукты специфически связывающегося агента. Частичную очистку можно осуществлять, применяя сочетание меньшего количества стадий или используя иные формы той же самой общей схемы очистки. Например, понятно, что катионообменная хроматография с применением ВЭЖХ хроматографа, как правило, даёт большую "кратность" очистки, чем тот же метод с применением хроматографической системы при низком давлении. Методы, дающие более низкую степень относительной очистки, могут иметь преимущества для тотальной очистки пептида или "пептитела" или для сохранения активности связывания пептида или "пептитела".

Известно, что миграция пептида или "пептитела" может изменяться, иногда значительно, с изменением условий SDS/PAGE [Capaldi et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 76: 425 (1977)]. Поэтому понятно, что в других условиях электрофореза явная молекулярная масса продуктов экспрессии очищенного или частично очищенного специфически связывающегося агента может изменяться.

Анализы связывания

В иммуноанализах связывания, как правило, используют агент для захвата (улавливающий, захватывающий агент) с целью специфического связывания с аналитом, антигеном-мишенью, и часто его иммобилизуют. Захватывающий агент представляет собой частицу, которая специфически связывается с аналитом. В одном варианте настоящего изобретения захватывающий агент представляет собой пептид или "пептитело" или его фрагмент, который специфически связывается с Ang-2. Эти методы иммуноанализа хорошо известны в технике [Assai, ed., *Methods in Cell Biology*, Vol. 37, *Antibodies in Cell Biology*, Academic Press, Inc., New York (1993)].

В иммуноанализах связывания часто применяют метку, которая сигнализирует, сообщая о существовании связанного комплекса, образованного захватывающим агентом и антигеном. Меткой может быть одна из молекул, составляющих связанный комплекс; т.е. это может быть меченый специфически связывающийся агент или меченое антитело против специфически связывающегося агента. Или же, меткой может быть третья молекула, обычно другое антитело, которое связывается со связанным комплексом. Метка может являться, например, антителом против специфически связывающегося агента, несущим метку. У второго антитела, специфического в отношении связанного комплекса, может отсутствовать метка, но оно может быть связано с четвёртой молекулой, специфической в отношении вида антител, представителем которого является второе антитело. Например, второе антитело можно модифицировать, используя детектируемую частицу, такую как биотин, который можно затем связать с четвёртой молекулой, такой как меченый ферментом стрептавидин. Другие белки, способные специфически связываться с константными областями иммуноглобулина, такие как протеин А или протеин G, также можно применять в качестве метки. Эти связывающиеся белки являются нормальными составляющими клеточных стенок стрептококковых бактерий и проявляют сильную неиммуногенную реакционную способность в отношении различных видов константных областей иммуноглобулинов. Akerstrom, *J. Immunol.*, 135: 2589-2542 (1985); Chaubert, *Mod. Pathol.*, 10: 585-591 (1997).

Во всех анализах после каждой комбинации реагентов могут требоваться стадии инкубации и/или отмывания. Время стадий инкубации может варьироваться от 5 с до нескольких часов, предпочтительно примерно 5 мин - 24 ч. Однако время инкубации зависит от формата анализа, аналита, объёма раствора, концентраций и т.п.

Как правило, анализы проводят при комнатной температуре, хотя их можно проводить в интервале температур.

А. Анализ методом бесконкурентного связывания.

Иммуноанализы связывания может быть или может бесконкурентного типа. В этих методах анализа непосредственно измеряется количество захваченного аналита. Например, в одном предпочтительном "сэндвич" анализе захватывающий агент (антитело или "пептитело") может непосредственно связываться с твёрдым субстратом, на котором он иммобилизуется. Эти иммобилизованные захватывающие агенты затем захватывают антиген (связываются с ним), присутствующий в испытуемом образце. Иммобилизованный таким образом белок затем связывается с меткой, такой как второе антитело, содержащее метку. В другом предпочтительном "сэндвич" анализе у второго антитела отсутствует метка, но оно может быть связано с меченым антителом, специфическим в отношении антител вида, к которому принадлежит второе антитело. Второе антитело также может быть модифицировано детектируемой частицей, такой как биотин, с которым может специфически связываться третья меченая молекула, такая как стрептавидин. См. Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Ch 14, Cold Spring Harbor, NY (1988), вводиться в данное описание в качестве ссылки.

В. Анализ методом конкурентного связывания.

Иммуноанализы связывания могут быть конкурентного типа. Количество присутствующего в образце аналита определяют опосредованно, измеряя количество добавленного аналита, замещённого или конкурентно вытесненного из захватывающего агента (антитела или "пептитела") аналитом, присутствующим в образце. В одном предпочтительном варианте анализа методом конкурентного связывания известное количество аналита, как правило, меченого, добавляют к образцу, а затем образец контактирует с захватывающим агентом. Количество меченого аналита, связанного с антителом, обратно пропорцио-

нально концентрации анализата, присутствующего в образце (См. Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Ch 14, pp. 579-583, см. выше).

В другом предпочтительном варианте анализа методом конкурентного связывания захватывающий агент иммобилизуют на твёрдом субстрате (подложке, носителе). Количество белка, связанного с захватывающим агентом, можно определить либо измеряя количество белка, присутствующего в комплексе белок/антитело, либо измеряя количество остающегося незакомплексованного белка. Количество белка можно обнаружить, делая белок меченым. Harlow and Lane, см. выше.

Ещё в одном предпочтительном варианте анализа методом конкурентного связывания используют ингибирование гаптена. В данном случае известный анализат иммобилизуют на твёрдом носителе. Известное количество антитела добавляют к образцу и образец контактирует с иммобилизованным анализатом. Количество антитела, связанного с иммобилизованным анализатом, обратно пропорционально количеству анализата, присутствующего в образце. Количество иммобилизованного антитела можно определить, детектируя либо иммобилизованную фракцию антитела, либо фракцию, которая остаётся в растворе. Обнаружение может быть прямым (непосредственным), когда антитело является меченым, или опосредованным, при использовании последующего добавления меченой частицы, которая специфически связывается с антителом, как описано выше.

С. Применение анализов методом конкурентного связывания.

Анализы методом конкурентного связывания можно применять для определения перекрёстной реактивности, что позволит специалисту в данной области определить, является ли комплекс белка или фермента, который распознаётся "пептителом" по изобретению, заданным белком, а не перекрёстно-реактивной молекулой, или определить, является ли "пептитело" специфическим в отношении данного антигена и не связывает ли неродственные антигены. В анализах этого типа антиген может быть иммобилизован на твёрдом носителе и в аналитическую смесь добавляют смесь неизвестного белка, который конкурирует со связыванием "пептител" с иммобилизованным белком. Конкурентная молекула также связывается с одним или более антигенов, не родственных данному антигену. Способность белков конкурировать со связыванием "пептител" с иммобилизованным антигеном сравнивают со связыванием тем же самым белком, который был иммобилизован на твёрдом носителе, с целью определить перекрёстную реактивность смеси белков.

Д. Другие анализы связывания.

Настоящее изобретение также охватывает методы Вестерн-блоттинга для обнаружения или количественного определения присутствия в образце Ang-2. Метод, как правило, включает разделение белков в образце по молекулярной массе электрофорезом в геле и перенос белков на соответствующую твёрдую подложку, такую как нитроцеллюлозный фильтр или дериватизированный нейлоновый фильтр. Образец инкубируют с "пептителами" или их фрагментами, которые специфически связываются с Ang-2, и обнаруживают полученный комплекс. Эти "пептитела" могут быть мечены непосредственно или их обнаруживают потом, используя меченые антитела, которые специфически связываются с "пептителом".

Диагностические методы

Производные связывающие агенты, такие как пептиды и "пептитела" или их фрагменты по данному изобретению применимы для диагностики состояний или заболеваний, характеризующихся экспрессией Ang-2 или субъединиц, или при мониторинге больных, проходящих лечение с помощью индукторов Ang-2, его фрагментов, агонистов или ингибиторов Ang-2 активности. Диагностика Ang-2 включает методы, использующие "пептитело" и метку для обнаружения Ang-2 в жидкостях или клеточных экстрактах и тканях из организма человека. "Пептитела" по данному изобретению можно использовать с модификацией или без неё. В предпочтительном диагностическом анализе "пептитела" метят, присоединяя, например, метку или репортёрную молекулу. Известен большой ряд меток и репортёрных молекул, некоторые из них уже представлены в данном описании. В частности, соединения и методы по настоящему изобретению применимы для диагностики заболеваний человека.

В технике известно множество протоколов для определения белков Ang-2 с использованием "пептител", специфических в отношении соответствующего белка. Примеры включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA, РИА) и метод, использующий лазерный анализатор (сортер, "сортировщик") клеток по интенсивности флуоресценции (FACS). Предпочтительным является двухстадийный моноклональный иммуноанализ, использующий моноклональные антитела, реактивные в отношении двух "не интерферирующих" эпитопов на Ang-2, но может использоваться конкурентное связывание. Эти методы анализа описаны, например, в Maddox et al., *J. Exp. Med.*, 158: 1211 (1983).

Для получения исходных данных ("основа") для диагностики обычно определяют нормальные или стандартные значения для экспрессии человеческого Ang-2. Это определение можно выполнять, объединяя жидкости из организма или клеточные экстракты здоровых субъектов, предпочтительно человека, с "пептителом" к Ang-2 в условиях, пригодных для образования комплекса, хорошо известных в технике. Количество образованного стандартного комплекса можно определить, сравнивая связывание "пептител" с известными количествами белка Ang-2 с контрольным образцом и образцом больного. Затем стандартные значения, получаемые из нормальных образцов, можно сравнить со значениями, полученными в образцах от субъектов, возможно, подвергнувшихся заболеванию. Отклонение от показателя стандартного

и больного субъектов наводит на мысль о том, что Ang-2 играет роль в болезненном состоянии.

Для применения в диагностике в некоторых вариантах "пептитела" или пептиды по настоящему изобретению, как правило, метят детектируемой частицей. Детектируемая частица может быть любой частицей, способной давать, прямо или опосредованно, детектируемый (обнаруживаемый) сигнал. Например, детектируемая частица может быть радиоактивным изотопом, таким как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I , флуоресцентным или хемилюминесцентным соединением, таким как флуоресцеинизоцианат, родамин или люциферин; или ферментом, таким как щелочная фосфатаза, β -галактозидаза или пероксидаза хрена. Bayer et al., Meth. Enz., 184: 138-163 (1990).

Заболевания

Настоящее изобретение охватывает связывающийся агент, такой как пептид, "пептитело", или его фрагмент, вариант или производное, которые связываются с Ang-2, применимые для лечения заболеваний и патологических состояний человека. Агенты, которые модулируют активность связывания Ang-2 или другую клеточную активность, можно использовать в комбинации с другими терапевтическими агентами с целью повышения их терапевтического эффекта или уменьшения возможных побочных эффектов.

В одном аспекте настоящее изобретение охватывает реагенты и методы, применимые для лечения заболеваний и состояний, характеризующихся нежелательными или aberrантными уровнями Ang-2 активности в клетке. Эти заболевания включают рак и другие гиперпролиферативные состояния, такие как гиперплазия, псориаз, контактный дерматит, иммунологические нарушения и бесплодие.

Настоящее изобретение также охватывает методы лечения рака у животного, включая людей, заключающиеся во введении животному эффективного количества специфически связывающегося агента, такого как "пептитело", который ингибирует или понижает Ang-2 активность. Помимо этого, изобретение относится к методам ингибирования роста раковых клеток, включая процесс клеточной пролиферации, инвазивность и метастазы в биологической системе. Методы включают применение соединения по изобретению в качестве ингибитора роста раковых клеток.

Предпочтительно методы применяются для ингибирования или уменьшения роста раковых клеток, инвазивности, метастазов или заболеваемости опухолевыми заболеваниями у животных, таких как млекопитающие. Способы по изобретению также легко адаптировать для применения в аналитических системах, например, для анализа роста раковых клеток и их свойств, а также для идентификации соединений, которые влияют на рост раковых клеток.

Типы рака, которые поддаются лечению способами по данному изобретению, предпочтительно встречаются у человека. Млекопитающие включают, например, человека и других приматов, а также домашних животных, такие как собаки и кошки, подопытные животные, такие как крысы, мыши и кролики, и сельскохозяйственные животные, такие как лошади, свиньи, овцы и крупный рогатый скот.

Опухоли или новообразования включают рост тканевых клеток, при котором размножение клеток является неконтролируемым и прогрессирующим. Некоторые из этих опухолей являются доброкачественными, но другие называются термином "злокачественные" и могут привести к гибели организма. Злокачественные новообразования отличаются от доброкачественных опухолей тем, что помимо проявления агрессивной клеточной пролиферации, они могут поражать окружающие ткани и метастазировать. Кроме того, злокачественные новообразования характеризуются тем, что они у них наблюдается большая утрата дифференцировки (большая дедифференцировка) и их организации относительно друг друга и окружающих их тканей. Это свойство также называется "анаплазия".

Новообразования, которые поддаются лечению по данному изобретению, также включают солидные опухоли, т.е. карциномы и саркомы. Карциномы включают злокачественные новообразования из эпителиальных клеток, которые проникают в (поражают) окружающие ткани и приводят к метастазам. Аденокарциномы представляют собой такие карциномы (рак), которые образуются из glandулярных (железистых) тканей или которые образуют распознаваемые glandулярные структуры. Другую большую группу раковых заболеваний составляют саркомы, представляющие собой опухоли, клетки которых расположены ("вкраплены") в фибриллярное или гомогенное вещество, подобное эмбриональной соединительной ткани. Изобретение также делает возможным лечение рака миелоидной или лимфоидной систем, включая лейкозы, лимфомы и другие разновидности рака, которые, как правило, присутствуют не в виде опухолевой массы, но распространяются в сосудистой или лимфорегикулярной системах.

Типами раковых или опухолевых клеток, поддающихся лечению по данному изобретению, являются, например, АСТН-продуцирующая опухоль, острый нелимфотический лейкоз, рак коры надпочечника, рак мочевого пузыря, рак мозга, рак молочной железы, цервикальный рак, хронический лимфолейкоз, колоректальный рак, кожная Т-клеточная лимфома, эндометриальный рак, эзофагеальный рак, саркома Юинга, рак желчного пузыря, лейкоемический ретикулёз, лимфома Ходжкина, саркома Калоши, рак почки, рак печени, рак лёгкого (мелкоклеточный и немелкоклеточный), плевральный выпот при злокачественном новообразовании, меланома, миеломная болезнь, нейробластома, глиома, лимфома не-Ходжкина, остеосаркома, рак яичника, рак яичника (половых клеток), рак поджелудочной железы, рак простаты, ретинобластома, рак кожи, саркома мягких тканей, плоскоклеточный рак, тестикулярный рак, рак щитовидной железы, трофобластные новообразования, рак матки, рак влагалища, рак вульвы и аденомиосаркома.

Изобретение в данном описании иллюстрируется, в частности, ссылкой на лечение некоторых ти-

пов экспериментально определённого рака. В этих иллюстрирующих лечение примерах используют реальные стандартные *in vitro* и *in vivo* модели. Эти методы можно использовать для идентификации агентов, которые, предположительно, эффективны в схемах лечения *in vivo*. Понятно, однако, что метод по изобретению не ограничивается лечением этих типов опухолей, но распространяется на любые солидные опухоли любых органов. Рак, инвазивность и метастазирование которого обусловлено экспрессией или активностью Ang-2, особенно восприимчив к ингибированию или даже индукции регресса по способу изобретения.

Изобретение можно осуществлять на практике, включая соединение по изобретению, такое как "пептитело", в комбинацию с другим противораковым химиотерапевтическим агентом, таким как обычный химиотерапевтический агент. Комбинация специфически связывающегося агента с таким другим агентом может усилить химиотерапевтическое действие (химиотерапевтический протокол). Опытный практик знает множество химиотерапевтических протоколов, которые можно включить в способ по изобретению. Можно использовать любой химиотерапевтический агент, включая алкилирующие агенты, антиметаболиты, гормоны и антагонисты, радиоактивные изотопы, а также природные продукты. Например, соединение по изобретению можно вводить с антибиотиками, такими как доксорубин и другие аналоги антрациклина, мустины, такие как циклофосфамид, аналоги пиримидина, такие как 5-флуораурил, цисплатин, гидроксимочевина, таксол и его натуральные и синтетические производные и т.п. Другой пример: в случае смешанных опухолей, таких как аденокарцинома молочной железы, когда опухоли содержат гонадотропинзависимые и гонадотропиннезависимые клетки, соединение можно вводить в сочетании с лейпролидом или гозерелином (синтетические пептидные аналоги LH-RH). Другие анти-неопластические протоколы включают применение тетрациклинового соединения с другими возможными методами лечения, например, хирургическим вмешательством, облучением и т.д., также называемыми в данном описании "дополнительные антинеопластические методы". Таким образом, метод по изобретению можно применять с такими обычными схемами, что благоприятствует уменьшению побочных эффектов и повышению эффективности.

Таким образом, изобретение охватывает составы и методы, применимые для лечения большого ряда разновидностей рака, включая солидные опухоли и лейкозы. Типы рака, которые можно лечить, включают, но без ограничения, аденокарциному молочной железы, простаты и ободочной кишки; все формы бронхогенного рака лёгкого; миелоидный рак; меланому; гепатому; нейробластому; папиллому; апудому; хориостому; бранхиому; злокачественный карциноидный синдром; карциноидную болезнь сердца; карциному (например, карциному Уолкера, базалиому, базосквамозный рак, карциному Брауна-Пирса, дуктальную карциному, опухоль Эрлиха, опухоль Кребса-2; рак клеток Меркеля, слизистый рак, немелкоклеточный рак лёгкого, овсяно-клеточный рак, папиллярный рак, скirrosный рак, бронхиолярный рак, бронхогенный рак, плоскоклеточный и переходно-клеточный рак); гистиоцитарные нарушения; лейкоз; злокачественный гистиоцитоз; болезнь Ходжкина; иммунопролиферативный мелкоклеточный рак лёгкого; неходжкинскую лимфому; плазмацитому; ретикулёз; меланому; хондробластому; хондрому; хондросаркому; фибросаркому; гигантоклеточные опухоли; гистиоцитому; липому; липосаркому; мезотелиому; мезоангиому; остеому; остеосаркому; хордому; краниофарингиому; дисгерминому; гемартому; мезенхимому; мезонефрому; миосаркому; амелобластому; цементому; одонтому; тератому; тимомиому; "тофобластную" (tophoblastic) опухоль. Кроме того, можно лечить следующие типы рака: аденому; холангиому; холестеатому; циклиндрому; цистаденокарциному; цистаденому; зернистоклеточная опухоль (яичника); андробластому; гепатому; гидраденому; островковоклеточную опухоль; опухоль клеток Лейдига; папиллому; опухоль клеток Сертоли; опухоль клеток слизистой оболочки желудка; лейомиому; лейомиосаркому; миобластому; миому; миосаркому; рабдомиому; рабдомиосаркому; эпендимому; ганглионейрому; глиому; медуллобластому; менингиому; нейрилеммому; нейробластому; нейроэпителиому; нейрофиброму; нейрому; параганглиому; хемадектому; ангиокератому; ангиолимфоидную гиперплазию с эозинофилией; склерозирующую ангиому; ангиоматоз; гломангиому; гемангиоэндотелиому; гемангиому; гемангиоперицитому; гемангиосаркому; лимфангиому; лимфангиомиому; лимфангиосаркому; пинеалому; карциносаркому; хондросаркому; филоидную цистосаркому; фибросаркому; гемангиосаркому; лейомиосаркому; лейкосаркому; липосаркому; лимфангиосаркому; миосаркому; миксосаркому; карциному яичников; рабдомиосаркому; саркому; новообразования; нейрофиброматоз и цервикальную дисплазию.

В другом аспекте настоящее изобретение охватывает применение материалов и способов по данному изобретению для предупреждения и/или лечения гиперпролиферативного состояния кожи, включая псориаз и контактный дерматит или другие гиперпролиферативные заболевания. Было показано, что у больных псориазом и контактным дерматитом наблюдается повышается Ang-2 активность в местах этих поражений. [Ogoshi et al., J. Inv. Dermatol., 110: 818-23 (1998)]. Предпочтительно, чтобы специфически связывающиеся агенты, специфичные в отношении Ang-2, применялись в комбинации с другими фармацевтическими агентами для лечения людей с подобными клиническими симптомами. Специфически связывающиеся агенты можно доставлять с помощью любого носителя, вводя различными способами по данному описанию и другими способами, хорошо известными специалистам в данной области техники.

Другие аспекты настоящего изобретения включают лечение различных ретинопатий (включая диабетическую ретинопатию и старческую дегенерацию жёлтого пятна), которые протекают с участием ан-

гиогенеза, а также нарушений и/или заболеваний женских половых путей, таких как эндометриоз, фиброз матки и другие подобные состояния, обусловленные нарушением сосудистой пролиферации (включая микроваскулярный эндометриальный рост) во время репродуктивного цикла у женщин.

Ещё один аспект настоящего изобретения относится к лечению аномального микроваскулярного роста, включая артериовенозные пороки развития (AVM), поражение и заживление слизистой желудочно-кишечного тракта; изъязвление слизистой желудочно-кишечного тракта с анамнезом язвенной болезни желудка, включая ишемию вследствие удара; широкий спектр сосудистых нарушений в лёгких при заболевании печени и портальную гипертензию у больных с непечёночной портальной гипертензией.

Другим аспектом настоящего изобретения является предупреждение рака с применением составов и способов, охватываемых данным изобретением. Такие реагенты включают специфически связывающиеся агенты, такие как "пептитела" против Ang-2.

Фармацевтические композиции

Фармацевтические композиции агентов, специфически связывающихся с Ang-2, таких как "пептитела", входят в объём данного изобретения. Фармацевтические композиции, содержащие антитела, подробно описаны, например, в патенте США 6171568, принадлежащем Lam et al., выданном 9 января 2001 г. Такие композиции содержат терапевтически или профилактически эффективное количество специфически связывающегося агента, такого как антитело или его фрагмент, вариант, производное или слияние по данному описанию, в смеси с фармацевтически приемлемым агентом. В предпочтительном варианте изобретения фармацевтические композиции содержат антагонистические специфически связывающиеся агенты, которые модулируют, частично или полностью, по меньшей мере одну биологическую активность Ang-2, в смеси с фармацевтически приемлемым агентом. Как правило, специфически связывающиеся агенты являются в достаточной степени очищенными, чтобы их можно было вводить животному.

Фармацевтическая композиция может содержать входящие в рецептуру материалы для модификации, поддержания или сохранения, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости диффузии или выделения, адсорбции или проникновения композиции. Подходящие вещества для рецептуры включают, но без ограничения, аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин); антимикробные вещества; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидросульфит натрия); буферные вещества (такие как борат, бикарбонат, Tris-HCl, фосфаты, цитраты, другие органические кислоты); наполнители (такие как маннит или глицин), хелатирующие агенты [такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA)]; комплексообразующие агенты (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); моносахариды; дисахариды и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины); белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); красители; ароматизаторы и разбавители; эмульгаторы; гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (такие как натрий); консерванты (такие как бензалкония хлорид, бензойная кислота, салициловая кислота, тимерозаль, фенол, фенол, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексин, сорбиновая кислота или перекись водорода); растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); спирты сахаров (такие как маннит или сорбит); суспендирующие агенты; поверхностно-активные вещества или увлажняющие агенты (такие как плуроники, ПЭГ, эфиры сорбитана, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат 80, тритон, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапаль); агенты, повышающие стабильность (сахароза или сорбит); тонирующие агенты (такие как галогениды щелочных металлов (предпочтительно хлорид натрия или калия), маннит, сорбит); носители для доставки; разбавители; эксципиенты и/или фармацевтические адъюванты (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990).

Оптимальную фармацевтическую композицию определяет специалист в данной области техники, например, в зависимости от предполагаемого способа введения, формата доставки и желательной дозировки. См., например, выше: Remington's Pharmaceutical Sciences. Такие композиции могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость *in vivo* выделения и скорость *in vivo* клиренса специфически связывающегося агента.

Основной наполнитель или носитель в фармацевтической композиции может быть либо водным, либо неводным по природе. Например, подходящий наполнитель или носитель может представлять собой воду для инъекции, физиологический раствор или искусственную спинномозговую жидкость, возможно, дополненную другими веществами, общепринятыми в композициях для парентерального введения. Физиологический раствор с нейтральным буфером или физиологический раствор в смеси с сывороточным альбумином является ещё одним примером носителя. Другие примеры фармацевтических композиций включают буфер Tris с примерным pH 7,0-8,5, или ацетатный буфер pH около 4,0-5,5, который может дополнительно включать сорбит или его соответствующий заместитель. В одном варианте настоящего изобретения можно получать композиции со связывающимся агентом для хранения, смешивая выбранную композицию с заданной степенью чистоты с необязательными агентами, входящими в рецептуру (Remington's Pharmaceutical Sciences, см. выше), в форме лиофилизированной лепёшки или водного раствора. Кроме того, продукт со связывающимся агентом можно готовить в виде лиофилизата, исполь-

зую подходящие эксципиенты, такие как сахароза.

Фармацевтические композиции можно выбирать для парентеральной доставки. Или же композиции можно выбирать для ингаляции или для энтерального способа доставки, такого как оральный; для аурального, офтальмического, ректального или вагинального способа доставки. Приготовление таких фармацевтически приемлемых композиций находится в компетенции специалистов в данной области техники.

Компоненты рецептуры присутствуют в концентрациях, которые приемлемы для данного места введения. Например, буферы применяют для поддержания композиции при физиологических значениях pH или при немного более низких значениях pH, как правило, в примерном интервале 5-8.

Если предполагается парентеральное введение, терапевтические композиции для применения по данному изобретению может быть в форме не содержащего пироген парентерально приемлемого водного раствора, содержащего заданный специфически связывающийся агент в фармацевтически приемлемом носителе. Особенно предпочтительным носителем для парентеральной инъекции является стерильная дистиллированная вода, в которой связывающийся агент приготовлен в виде стерильного изотонического раствора, соответствующим образом сохраняемого. Ещё один препарат может включать рецептуру заданной молекулы с агентом, таким как инъецируемые микросферы, биоразрушаемые частицы, полимерные соединения (полимолочная кислота, полигликолевая кислота), бусины или липосомы, обеспечивающие контролируемое или пролонгированное выделение продукта, который можно затем доставлять с помощью депо-инъекции. Можно также использовать гиалуроновую кислоту, и это может повлиять на промотирование пролонгированного пребывания в кровотоке. Другие подходящие способы введения заданной молекулы включают имплантированные устройства для доставки лекарственного препарата.

В другом аспекте фармацевтические препараты, пригодные для парентерального введения, можно готовить в водных растворах предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнкса, Рингеровский раствор или забуференный физиологический раствор. Водные суспензии для инъекций могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, например, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, сорбит или декстран. Или же суспензии активных соединений можно получать в виде соответствующих масляных суспензий для инъекций. Подходящие липофильные растворители или носители включают жирные масла, такие как кунжутное масло, или синтетические сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеат, триглицериды, или липосомы. Для доставки можно также применять нелипидные поликатионные полимерные амины. Необязательно, суспензия может также содержать подходящие стабилизаторы или агенты для повышения растворимости соединений, что позволяет готовить препараты высокой концентрацией этих веществ в растворах.

В другом варианте изобретения фармацевтическую композицию можно готовить для доставки методом ингаляции. Например, связывающийся агент можно приготовить в виде сухого порошка для ингаляции. Раствор полипептида или нуклеиновой кислоты можно также готовить с диспергатором для доставки в виде аэрозолей. Ещё в одном варианте изобретения растворы можно для распыления. Кроме того, доставка в лёгкие химически модифицированных белков описана в международной заявке PCT/US 94/001875.

Рассматривается также, что некоторые препараты можно вводить перорально. В одном варианте настоящего изобретения молекулы связывающегося агента, которые вводятся таким способом, можно приготовить с такими носителями (или без них), которые обычно применяют для приготовления твёрдых лекарственных форм, таких как таблетки и капсулы. Например, можно создать капсулу для высвобождения активного компонента препарата в точке желудочно-кишечного тракта, в которой биодоступность является максимальной, а предсистемное расщепление минимально. Для облегчения всасывания связывающегося агента можно включать дополнительные агенты. Можно применять также разбавители, вещества, придающие запах и вкус, низкоплавкие воски, растительные масла, смазывающие вещества, суспендирующие агенты, вещества, способствующие измельчению, и связующие.

Можно готовить также фармацевтические композиции для (пер)орального введения, используя фармацевтически приемлемые носители, хорошо известные в технике, в дозах, подходящих для орального введения. Такие носители способствуют тому, что фармацевтические композиции можно готовить в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, эмульсий, суспензий и т.п., проглатываемых больным. Фармацевтические препараты для орального применения можно получать, объединяя активные соединения с твёрдым эксципиентом и готовя из полученной смеси гранул (необязательно, после измельчения) таблетки или ядра драже. Если требуется, можно вводить подходящие добавки. Применимые эксципиенты включают углеводные или белковые наполнители, такие как сахара, включая лактозу, сахарозу, маннит и сорбит; маисовый крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал, картофельный крахмал или другой растительный крахмал; целлюлозу, такую как метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза или натрий-карбоксиметилцеллюлоза; камедь, включая аравийскую камедь и камедь трагаканта; и белки, такие как желатин и коллаген. При желании можно добавлять вещества, способствующие измельчению, или солубилизирующие вещества, такие как сшитый поливинилпирролидон, агар-агар и альгиновая кислота или её соль, такая как альгинат натрия.

Ядра драже можно применять в сочетании с подходящими покрытиями (оболочками), такими как концентрированные растворы сахаров, которые могут содержать также аравийскую камедь, тальк, поли-

винилпирролидон, карбопол гель, полиэтиленгликоль и/или диоксид титана, растворы лаков и подходящие органические растворители или смеси растворителей. Для идентификации продукта или для характеристики количества активного соединения, например, дозировки, в покрытие таблеток или драже можно добавлять красители или пигменты.

Фармацевтические препараты, которые можно применять перорально, также включают солидные желатиновые капсулы, а также мягкие герметичные капсулы из желатина, и покрытия, такого как глицерин или сорбит. Твёрдые капсулы могут содержать активные ингредиенты, смешанные с наполнителями или связующими, такими как лактоза или крахмал, смазки, такие как тальк или стеарат магния, и, необязательно, стабилизаторы. В мягких капсулах активные соединения можно растворить или суспендировать в подходящих жидкостях, таких как жирные масла, жидкость или жидкий полиэтиленгликоль со стабилизаторами или без них.

Другая фармацевтическая композиция может включать эффективное количество связывающегося агента в смеси с нетоксическими эксципиентами, пригодными для производства таблеток. Стандартные дозы растворов можно приготовить, растворяя таблетки в стерильной воде или в другом подходящем носителе. Соответствующие эксципиенты включают, но без ограничения, инертные разбавители, такие как карбонат кальция, карбонат или бикарбонат натрия, лактоза или фосфат кальция; или связующие, такие как крахмал, желатин или аравийскую камедь; или смазки, такие как стеарат магния, стеариновая кислота или тальк.

Дополнительные фармацевтические композиции очевидны для специалистов в данной области техники, включая рецептуры, содержащие связывающиеся агенты в препаратах пролонгированного или регулируемого (контролируемого) действия. Способы приготовления составов для доставки многих других препаратов пролонгированного или контролируемого действия, таких как липосомные носители, биоразрушаемые микрочастицы или пористые бусины и депо-инъекции, хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, международную заявку PCT/US 93/00829, в которой описано контролируемое выделение из пористых полимерных микрочастиц для доставки фармацевтических композиций. Дополнительные примеры препаратов пролонгированного действия включают полупроницаемые полимерные матрицы в форме имеющих определённые очертания изделий, например, плёнок или микрокапсул. Матрицы (носители) пролонгированного действия могут включать полиэферы, гидрогели, полилактиды (патент США 3773919, европейский патент 58481), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма этил-L-глутамат [Sidman et al., Biopolymers, 22: 547-556 (1983)], поли(2-гидроксиэтилметакрилат) [Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277, (1981)] и [Langer et al., Chem. Tech., 12: 98-105(1982)], этиленвинил ацетат (Langer et al., см. выше) или поли-(D)(-)-3-гидроксимасляную кислоту (европейский патент 133988).

Композиции пролонгированного действия также включают липосомы, которые можно получать любым из методов, известных в технике. См., например, Eppstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 82: 3688-3692 (1985); европейские патенты EP 36676; EP 88046; EP 143949.

Фармацевтическая композиция, применяемая для *in vivo* введения, как правило, должна быть стерильной. Этого можно достичь фильтрованием через стерильные фильтрующие мембраны. Если композицию лиофилизируют, стерилизацию с применением этого метода можно осуществлять либо до, либо после лиофилизации и восстановления. Композицию для парентерального введения можно хранить в лиофилизированной форме или в виде раствора. Кроме того, парентеральные формы композиции, как правило, помещают в контейнер, имеющий стерильное входное отверстие, например, контейнер или флакон с пробкой, через которую может проникнуть гиподермическая игла для инъекций.

После приготовления фармацевтической композиции её можно хранить в стерильных ампулах (флаконах) в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твёрдого вещества или в виде дегидратированного или лиофилизированного порошка. Такие препараты могут храниться либо в виде готовой формы, либо в виде формы (например, лиофилизированной), требующей восстановления перед употреблением.

В конкретном варианте настоящее изобретение относится к наборам для приготовления дозы для одноразового введения (одноразовой дозы). Каждый набор может включать как первый контейнер, содержащий сухой белок, и второй контейнер, содержащий водный препарат (препарат в воде). В объём настоящего изобретения также входят наборы, содержащие многокамерные предварительно заполненные шприцы (например, шприцы с жидкостями и "лиошприцы" (шприцы с лиофилизатом)).

Эффективное количество фармацевтической композиции для терапевтического применения зависит, например, от терапевтического контекста и от задач. Специалист в данной области техники понимает, что, следовательно, соответствующие уровни доз для лечения варьируют в зависимости, частично, от доставляемой молекулы, показания, в соответствии с которым применяется связывающийся агент, способ применения и размеров (веса тела, площади поверхности тела и величины органа) и состояния (возраст и общее состояние здоровья) пациента. Соответственно, клиницист может определить (рассчитать) дозу и модифицировать способ применения, чтобы получить оптимальный терапевтический эффект. Типичная доза обычно находится в пределах, примерно, от 0,1 вплоть до 100 мг/кг или выше в зависимости от вышеуказанных факторов. В других вариантах изобретения интервалы доз могут составлять, примерно, 0,1-100 мг/кг; или 1-100 мг/кг; или 5-100 мг/кг.

Для любого соединения терапевтически эффективную дозу можно сначала определить либо анализом клеточных культур, либо на животных моделях, таких как мыши, крысы, кролики, собаки, свиньи или мартышки. Животные модели можно также использовать для определения подходящего интервала и способа применения. Эту информацию можно использовать для определения применяемых доз и способов применения для лечения людей.

Точную дозировку определяют, принимая во внимание факторы, связанные с субъектом, подлежащим лечению. Дозы и путь введения корректируют, чтобы обеспечить достаточные уровни активного соединения или для поддержания заданного эффекта. Факторы, которые можно принимать во внимание, включают тяжесть болезненного состояния, общее состояние здоровья субъекта, возраст, вес и пол субъекта, время и частоту введения, комбинацию(-и) лекарственных веществ, чувствительность и реакция на лечение. Фармацевтические композиции пролонгированного действия можно вводить каждые 3-4 дня, раз в неделю или раз в 2 недели, в зависимости от периода полужизни и скорости клиренса конкретного препарата.

Частота введения дозы зависит от фармакокинетических показателей связывающегося агента в применяемой композиции. Как правило, композицию вводят до тех пор, пока не достигнут дозы, дающей нужный эффект. Следовательно, композицию можно вводить в виде однократной (разовой) дозы или в виде многократных доз (в тех же самых или различных концентрациях/ дозу) во времени, или в виде непрерывных вливаний. Дальнейшее уточнение подходящей дозы делается обычными методами. В том, что доза является подходящей, можно удостовериться с помощью данных об эффекте дозы.

Способ применения фармацевтической композиции представляет собой известный метод, например, оральный, внутривенная инъекция, интраперитонеальный, интрацеребральный (интрапаренхиматозный), интрацеребровентрикулярный, внутримышечный, внутриглазной, внутриартериальный, интрапортальный, интралезионный (в место поражения), интрамедуллярный, внутриоболочечный, интравентрикулярный, трансдермальный, подкожный, интраперитонеальный, интраназальный, энтеральный, местный, сублингвальный, уретральный, вагинальный или ректальный способы с помощью систем пролонгированного действия или имплантированных устройств. Если требуется, композиции можно вводить с помощью болюсной инъекции или непрерывно, с помощью вливания или с помощью имплантированного устройства.

Или же, или в дополнение к сказанному, композицию по изобретению можно вводить местно, имплантируя мембрану, тампон или другой подходящий материал, на котором абсорбировано или в который инкапсулировано нужное вещество. Если используется устройство для имплантации, прибор можно имплантировать в любую подходящую ткань или в любой подходящий орган, и доставка молекул заданного вещества может осуществляться диффузией, болюсом пролонгированного действия (с выделением во времени) или непрерывным введением.

Иногда может быть желательным применять фармацевтические композиции *ex vivo*. В таких случаях клетки, ткани или органы удаляют из организма больного и экспонируют с фармацевтическими композициями, после чего клетки, ткани и/или органы последовательно имплантируют обратно, в организм пациента.

В других случаях связывающийся агент по данному изобретению, такой как "пептител", можно доставлять, имплантируя определённые клетки, полученные с помощью генной инженерии (методом рекомбинантной ДНК), такими, которые представлены в данном описании, для экспрессии и секреции полипептида. Такие клетки могут быть животными или человеческими клетками и могут быть аутологичными, гетерологичными или ксеногенными. Необязательно, клетки могут быть иммортализованными. Чтобы понизить вероятность иммунного ответа, клетки можно инкапсулировать, чтобы избежать инфильтрации окружающих тканей. Материалы для инкапсулирования, как правило, представляют собой биосовместимые, полупроницаемые полимерные капсулы или мембраны, которые делают возможным выделение протеинового(-ых) продукта (-ов), но предотвращают разрушение клеток под действием иммунной системы больного или других вредных факторов из окружающих тканей.

Комбинированная терапия

Специфически связывающиеся агенты по изобретению, такие как "пептитела", можно применять в комбинации с другими терапевтическими средствами лечения болезней, обусловленных экспрессией Ang-2. Эти другие терапевтические методы включают, например, облучение, химиотерапию и нацеленные терапевтические средства, такие как Herceptin™, Rituxan™, Gleevec™ и т.п. Дополнительные варианты комбинированной терапии, не указываемые конкретно, также входят в объём настоящего изобретения.

В химиотерапевтическом лечении можно использовать противоопухолевые агенты, в том числе, например, алкилирующие агенты, включающие: мустины, такие как мехлорэтамин, циклофосфамид, ифосфамид, мелфалан и хлорамбуцил; нитрозомочевины, такие как кармустин (BCNU), ломустин (CCNU) и семустин (метил-CCNU); этиленимины/метилмеламин, такой как триэтиленмеламин (TEM), триэтилен, трифосфорамида (тиотепа), гексаметилмеламин (HMM, альтретамина); алкилсульфонаты, такие как бусульфид; триазины, такие как дакарбазин (DTIC); антимиетаболиты, включая аналоги фолиевой кислоты, такие как метотрексат и триметрексат, аналоги пиримидина, такие как 5-флуорурацил, флуордезоксифлуоридин, гемцитабин, цитозин арабинозид (AraC, цитарабин), 5-азатидин, 2,2'-дифлуордезоксифлуоридин, гемцитабин, цитозин арабинозид (AraC, цитарабин), 5-азатидин, 2,2'-дифлуордезоксифлуоридин.

цитидин, аналоги пурина, такие как 6-меркаптопурин, 6-тиогуанидин, азатиоприн, 2'-дезоксикоформин (пентостатин), эритрогидроксинаденин (EHNA), флударабин фосфат и 2-хлордезоксиаденозин (кладрибин, 2-CdA); природные продукты, включая антимитотические лекарственные средства, такие как паклитаксель, алкалоиды винка, включая винбластин (VLB), винкристин и винорелбин, таксотере, эстрамустин и эстрамустин фосфат; пиподофилотоксины, такие как этопозид и тенипозид; антибиотики, такие как актимомидин D, дауномицин (рубидомицин), доксорубин, митоксантрон, идарубин, блеомицины, пликамицин (митрамицин), митомицин C и актиномицин; ферменты, такие как L-аспарагиназа; модификаторы биологического ответа, такие как интерферон-альфа, IL-2, G-CSF и GM-CSF; различные агенты, включая координационные платиновые комплексы, такие как цисплатин и карбоплатин, антрацендионы, такие как митоксантрон, замещённые мочевины, такие как гидроксимочевина, производные метилгидразина, включая N-метилгидразин (МН) и прокарбазин, адренокортикальные супрессоры, такие как митотан (o,p'-DDD) и аминоксиглутимид; гормоны и антагонисты, включая адренокортикостероидные антагонисты, такие как преднизон и эквиваленты, дексаметазон и аминоксиглутимид; прогестин, такой как гидропрогестерона капронат, метилпрогестерон ацетат и мегестрол ацетат; эстроген, такой как диэтилстильбестрол и эквиваленты этинилэстрадиола; антиэстроген, такой как тамоксифен; андрогены, включая тестостерона пропионат и флуоксиместерон/эквиваленты; антиандрогены, такие как флутамид, аналоги гонадолиберина и лейпролид; и нестероидные антиандрогены, такие как флутамид.

Комбинированная терапия с применением факторов роста может включать цитокины, лимфокины, факторы роста или другие гемопоэтические факторы, такие как M-CSF, GM-CSF, 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, тромбопоэтин, фактор стволовых клеток и эритропоэтин. Другие композиции могут включать известные ангиопоэтины, например, Ang-1, -2, -4, -Y и/или человеческий Ang-подобный полипептид и/или сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF). Факторы роста включают ангиогенин, костный морфогенный белок-1, костный морфогенный белок-2, костный морфогенный белок-3, костный морфогенный белок-4, костный морфогенный белок-5, костный морфогенный белок-6, костный морфогенный белок-7, костный морфогенный белок-8, костный морфогенный белок-9, костный морфогенный белок-10, костный морфогенный белок-11, костный морфогенный белок-12, костный морфогенный белок-13, костный морфогенный белок-14, костный морфогенный белок-15, рецептор IA костного морфогенного белка, рецептор IB костного морфогенного белка, нейротрофический фактор мозга, рецептор цилиарного нейротрофического фактора, индуцируемый цитокинами хемотактический фактор 1 нейтрофилов, индуцируемый цитокинами хемотактический фактор 2 нейтрофилов, фактор роста эндотелиальных клеток, эндотелин 1, эпидермальный фактор роста, эпителиальный аттрактант нейтрофилов, фактор роста фибробластов 4, фактор роста фибробластов 5, фактор роста фибробластов 6, фактор роста фибробластов 7, фактор роста фибробластов 8, фактор роста фибробластов 8b, фактор роста фибробластов 8c, фактор роста фибробластов 9, фактор роста фибробластов 10, кислый фактор роста фибробластов, щелочной фактор роста фибробластов; рецептор-1 нейротрофического фактора глиальной клеточной линии; рецептор-2 нейротрофического фактора глиальной клеточной линии; ростовой белок, ростовой белок-1, ростовой белок-2, ростовой белок-3, гепарин-связывающий эпидермальный фактор роста, фактор роста гепатоцитов, рецептор фактора роста гепатоцитов, инсулиноподобный фактор роста I, рецептор инсулиноподобного фактора роста, инсулиноподобный фактор роста II; белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста, фактор роста кератиноцитов; фактор, ингибирующий лейкоз; рецептор-1 фактора, ингибирующего лейкоз; фактор роста нервных клеток, рецептор фактора роста нервных клеток, нейротрофин-3, нейротрофин-4, плацентарный фактор роста, плацентарный фактор роста 2; полученный из тромбоцитов фактор роста эндотелиальных клеток; полученный из тромбоцитов фактор роста цепи A; полученный из тромбоцитов фактор роста АВ; полученный из тромбоцитов фактор роста цепи В; полученный из тромбоцитов фактор роста ВВ, рецептор-1 полученного из тромбоцитов фактора роста; рецептор-2 полученного из тромбоцитов фактора роста; фактор стимуляции (роста) пре-В клеток; фактор стволовых клеток; рецептор фактора стволовых клеток; трансформирующий фактор роста-1, трансформирующий фактор роста-2, трансформирующий фактор роста-1.2, трансформирующий фактор роста-3, трансформирующий фактор роста-5, латентный трансформирующий фактор роста-1; белок I, связывающий трансформирующий фактор роста-1; белок II, связывающий трансформирующий фактор роста-1; белок III, связывающий трансформирующий фактор роста-1; рецептор типа I фактора некроза опухоли; рецептор типа II фактора некроза опухоли; рецептор плазминогенного активатора урокиназного типа; васкулярный эндотелиальный фактор роста и химерные белки и их биологически и иммунологически активные фрагменты.

Иммунотерапевтические средства

Иммунотерапевтические методы лечения, как правило, основаны на использовании иммунных эффекторных клеток и молекул для нацеливания на раковые клетки и их разрушение. Иммунные эффекторы могут представлять собой, например, "пептитело" по данному изобретению, которое распознаёт некий маркер на поверхности клетки-мишени. "Пептитело" само по себе может служить в качестве эффектора в терапии или оно может рекрутировать другие клетки для того, чтобы фактически осуществить лизис клеток. "Пептитело" может быть также конъюгировано с лекарственным веществом или токсином

(химиотерапевтическим соединением, радионуклидом, А цепью рицина, холерным энтеротоксином, токсином коклюша и т.п.) и, следовательно, может просто служить в качестве целевого агента.

В соответствии с данным изобретением мутантные формы Ang-2 могут служить целью для иммунотерапии с помощью "пептител" или конъюгатов "пептител" по изобретению. В частности предполагается, что составы "пептител" по изобретению можно применять в комбинированной терапии в сочетании с Ang-2 нацеленной терапией.

Оказалось, что пассивная терапия является особенно эффективной при лечении различных типов рака. См., например, международную заявку WO98/39027.

Нижеприведённые примеры предназначены только для целей иллюстрации и ни в коей мере не являются ограничивающими объём изобретения.

Пример 1. Экспрессия Ang-2 в патологической и нормальной ткани.

Экспрессию Ang-2 изучают в нормальной и патологической ткани *in situ* гибридизацией. Фрагменты последовательностей человеческого (Genbank Accession Number AF004327, нуклеотиды 1274-1726) и мышиного (Genbank Accession Number AF004326, нуклеотиды 1135-1588) Ang-2 амплифицируют ПЦР с обратной транскриптазой при использовании фетальной кДНК из образцов лёгкого, клонированной в плазмиду pGEM-T, и проверяют секвенированием. Зонды меченой ³³P антисмысловой РНК транскрибируют при использовании линейаризованной плазмиды с ³³-UTP и РНК полимеразой. Из блоков фиксированных в формальдегиде заключённых в парафин тканей делают срезы по 5 мкм и собирают на подготовленные предметные стёкла. Перед *in situ* гибридизацией с помощью 0,2М HCl получают пермеабелизованные ткани с последующими расщеплением протеиназой К и ацетилированием триэтаноламином и уксусным ангидридом. Срезы гибридизуют с меченым радиоактивной меткой зондом в течение ночи при 55°C, затем расщепляют с помощью РНК-азы и отмывают в очень жёстких условиях, примерно, в 0.1 X SSC при 55°C. Предметные стёкла погружают в эмульсию Kodak NTB2, экспонируют при 4°C в течение 2-3 недель, проявляют и окрашивают контрастным веществом. Срезы изучают в темноте и при стандартном освещении с целью одновременной оценки морфологии ткани и гибридизационного сигнала.

Результаты показывают, что у нормального новорождённого человека экспрессия Ang-2 ограничена несколькими тканями, содержащими ангиогенную сосудистую сеть, такими как яичник, плацента и матка. Никакой экспрессии Ang-2 не отмечается в сердце, мозгу, почках, печени, лёгких, поджелудочной железе, селезёнке, мышцах, миндалинах, тимусе, аппендиксе, лимфатическом узле, желчном пузыре, простате или яичках нормального взрослого человека. У пятидневной мыши (но не у взрослой обезьяны или взрослого человека) почки выявляют заметную экспрессию Ang-2 в семенных канальцах. Чтобы определить, является ли эта экспрессия остатком развития зародыша, этот эксперимент повторяют на почках мышей в возрасте до 1 года при использовании зонда мышиного Ang-2 и в условиях, описанных выше. Выяснено, что экспрессия Ang-2 понижается в период неонатального развития, но всё ещё явлена в почках годовалых мышей.

Экспрессия Ang-2 также обнаружена практически во всех изученных типах опухолей, включая первичные человеческие опухоли, такие как рак прямой (ободочной) кишки (5 случаев), рак молочной железы (10 случаев), рак лёгкого (8 случаев), глиобластома (1 случай), метастатические человеческие опухоли, такие как рак молочный железы (2 случая), рак лёгких (2 случая) и рак яичника (2 случая), который метастазировал в мозг, и модели опухолей у грызунов, такие как C6 (глиома у крыс), HT29 (человеческий рак прямой (ободочной) кишки), Colo-205 (человеческий рак прямой (ободочной) кишки), A431 (человеческий эпидермоидный рак), A673 (человеческая рабдомиосаркома), HT1080 (человеческая фибросаркома), PC-3 (человеческий рак простаты), B16F10 (меланома у мышей), MethA (саркома у мышей) и метастатический (mets) рак лёгкого Льюиса. Кроме того, экспрессия Ang-2 обнаружена в неососудах, растущих в матриксе (Матригель) в ответ на VEGF и у мышиной гипоксической модели ретинопатии у недоношенных.

Пример 2. Молекулярные анализы для определения Ang-2 "пептител".

Молекулярные анализы (аффинный метод ELISA, нейтрализационный метод ELISA, BIAcore) применяются для оценки непосредственного связывания пептитела с Ang-2 и представителями родственных семейств и влияния антител на взаимодействие Ang-2:Tie-2. Эти *in vitro* анализы описаны ниже.

Аффинный метод ELISA

Для начального скрининга возможных анти-Ang-2 "пептител" используют очищенный человеческий Ang-2 (R&D Systems, Inc.; номер в каталоге 623-AN; Ang-2 в виде смеси 2 усечённых вариантов) или мышиный Ang-2 полипептид (полученный, как описано выше). Для подтверждающих анализов связывания человеческий Ang-2 получают при использовании кондиционированных сред человеческих 293Т клеток, трансфицированных с помощью ДНК полноразмерного человеческого Ang-2 и культивируют в бессывороточной среде Игла, модифицированной по Дульбекко (DMEM), содержащей 50 мкг в мл альбумина бычьей сыворотки (BSA).

В каждую лунку титрационного микропланшета добавляют 100 мкл Ang-2 и планшеты инкубируют в течение 2 ч, после чего планшеты 4 раза отмывают фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), содержащим 0,1% Tween-20. Затем лунки блокируют, используя около 250 мкл на лунку 5% BSA в PBS и планшеты инкубируют при комнатной температуре, примерно, в течение 2 ч. После инкубации избыток

блокирующего раствора отбрасывают и около 100 мкл каждого возможного анти-Ang-2 "пептитела" добавляют в лунку, используя метод серийных разведений, начиная, примерно, с 40 нанолярной концентрации, а затем серийно разводят в 4 раза в PBS, содержащем 1% BSA. Планшеты затем инкубируют в течение ночи при комнатной температуре. После инкубации планшеты отмывают PBS, содержащем около 0,1% Tween-20. Отмывание повторяют ещё 4 раза, после чего добавляют около 100 мкл/лунка антитела козы к человеческому IgG(Fc)-HRP (Pierce Chemical Co., № в каталоге 31416), предварительно разведённого 1:5000 в PBS, содержащем 1% BSA. Планшеты инкубируют около 1 ч при комнатной температуре. Затем планшеты 5 раз отмывают в PBS, содержащем около 0,1% Tween-20, после чего в каждую лунку добавляют по 100 мкл субстрата TMB (система жидкого субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, № в каталоге T8665) и планшеты инкубируют около 5-15 мин до появления синего цвета. Затем оптическую плотность считывают на спектрофотометре (планшетном ридере), примерно, при 370 нм.

Метод ELISA с нейтрализацией

Микротитационные планшеты, с которыми был связан человеческий Ang-2 полипептид, готовят как описано для аффинного метода ELISA. Предполагаемые анти-Ang-2 "пептитела" титруют от 1000 нМ до 0,2 нМ в 4-кратном разведении в растворе PBS, содержащем около 1% BSA и около 1 нМ Tie-2 (при условии, что молекула Tie-2-Fc представляет собой молекулу, в которой участок Tie-2 содержит только растворимую внеклеточную область молекулы; R&D Systems, № в каталоге 313-TI). После того, как в каждую лунку добавляют около 100 мкл раствора, планшеты инкубируют в течение ночи при комнатной температуре, а затем 5 раз отмывают в PBS, содержащем около 0,1% Tween-20. После отмывания в каждую лунку добавляют около 100 мкл антитела против Tie-2 (Pharmingen Inc., № в каталоге 557039) до примерной конечной концентрации 1 мкг в мл, и планшеты инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее добавляют около 100 мкл/лунка антитела козы против мышинного IgG-HRP (Pierce Chemical CO., № в каталоге 31432) в разведении 1:10,000 в PBS, содержащем 1% BSA. Планшеты инкубируют при комнатной температуре около 1 ч, после чего их отмывают 5 раз PBS, содержащем 0,1% Tween-20. Затем добавляют около 100 мкл/лунка TMB субстрата (описанного выше) и оставляют до появления синего цвета. Затем определяют оптическую плотность на спектрофотометре (планшетном ридере), примерно, при 370 нм.

Аффинный BIAcore

Аффинный анализ каждого возможного Ang-2 "пептитела" проводят на BIAcore®2000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) с PBS и 0,005% сурфактанта P20 (Biacore, Inc.) в качестве разделяющего буфера. Рекомбинантный белок G (Repligen, Needham, MA) иммобилизуют на химически чистом датчике CM5 (Biacore, Inc.) за счёт первичных аминогрупп, используя набор Amine Coupling Kit (Biacore, Inc.) в соответствии с рекомендуемым производителем протоколом.

Анализы связывания проводят, сначала связывая (захватывая) по 100 RU каждого предполагаемого анти-Ang-2 "пептитела" с иммобилизованным протеином G, после чего huAng-2 или mAng-2 в различных концентрациях (0-100 нМ) инъецируют через поверхность связанного антитела при скорости потока 50 мкл/мин в течение 3 мин. Кинетические параметры связывания, включая k_a (константа скорости ассоциации), k_d (константа скорости диссоциации) и K_D (константа равновесной диссоциации), определяют с помощью компьютерной программы BIA evaluation 3.1 (Biacore, Inc.). Более низкие константы равновесной диссоциации указывают на более высокую аффинность "пептитела" к Ang-2.

Пример 3. Идентификация пептидов, связывающих Ang-2.

1. Получение намагниченных бус с иммобилизованным Ang-2.

А. Иммобилизация Ang-2 на намагниченных бусах.

Для неспецифической элюции биотинилированный Ang-2 белок (Biotinylated Recombinant Human Angiopoietin-2, R&D Systems, Inc.; № в каталоге BT 623) иммобилизуют на Streptavidin Dynabeads (Dyna, Lake Success, NY) с концентрацией около 4 мкг биотинилированного Ang-2 белка на 100 мкл массы бус от производителя на все три раунда селекции. Для элюции антигена (Ang-2) и рецептора (Tie-2) 2 мкг биотинилированного Ang-2 белка иммобилизуют на 50 мкл Streptavidin Dynabeads для второго раунда селекции. Концентрацию покрытия уменьшают, примерно, до 1 мкг биотинилированного Ang-2 белка на 50 мкл массы бус для третьего раунда селекции. С помощью магнита бусины перемещают на одну сторону пробирки и пипеткой отбирают жидкость, бусы дважды отмывают фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) и снова суспендируют в PBS. Биотинилированный Ang-2 белок добавляют к отмываемым бусинам с вышеуказанной концентрацией и инкубируют при вращении в течение 1 ч при комнатной температуре с последующей инкубацией в течение ночи при температуре 4°C при вращении. Бусы, покрытые Ang-2, затем блокируют, добавляя BSA до конечной концентрации около 1%, и инкубируют в течение ночи при 4°C при вращении. Затем полученные в результате покрытые Ang-2 бусы 5 раз отмывают PBS перед тем, как подвергнуть их селекции.

В. Приготовление бус для негативной селекции.

Кроме того, готовят также бусы для негативной селекции. Для каждого условия пэннинга 500 мкл исходных бус (массы бус) от производителя подвергают вышеописанной процедуре (раздел 1А), за исключением того, что опускают стадию инкубации с Ang-2. На последней стадии отмывания бусы делят

на пять аликвот по 100 мкл.

2. Селекция фага, связывающего TALL-1.

А. Общая стратегия.

Для селекции на Ang-2 связывающий фаг используют три библиотеки нитчатых фагов, обозначенных как "TN8-IX" (5×10^9 независимых трансформаций), "TN12-I" ($1,4 \times 10^9$ независимых трансформаций) и "Linear" ($2,2 \times 10^9$ независимых трансформаций) (все от Duq Corp.). Каждую библиотеку затем подвергают либо неспецифической элюции, либо Ang-2 элюции, либо рецепторной элюции (Tie-2). Девять различных условий пэннинга применяют для Ang-2 (TN8-LX с использованием метода неспецифической элюции; TN8-IX с использованием метода Ang-2 элюции; TN8-LX с применением метода Tie-2 элюции; TN12-I с использованием метода неспецифической элюции; TN12-I с использованием метода элюции с Ang-2; TN12-I с применением метода Tie-2 элюции; Linear с использованием метода неспецифической элюции; Linear с использованием метода Ang-2 элюции; Linear с применением метода Tie-2 элюции). Для всех трёх библиотек фаг из первого раунда селекции элюируют только неспецифическим методом для других раундов селекции. Элюции с Ang-2 и с Tie-2 используют во втором и в третьем раунде селекции. В случае библиотеки Linear проводят только второй раунд для Ang-2 и Tie-2 элюции.

В. Негативная селекция.

Для каждого условия пэннинга из исходных библиотек TN8-IX и TN12-I отбирают аликвоты около 100 произвольных библиотечных эквивалентов (около 5×10^{11} бое для TN8-IX и около $1,4 \times 10^{11}$ бое для TN12-I) и около 10 произвольных библиотечных эквивалентов для библиотеки Linear (около 1×10^{11} бое) и разводят с помощью PBST (PBS с 0,05% Tween-20) до 400 мкл. После последнего отмывания жидкость удаляют из первой 100 мкл аликвоты бусин, приготовленной для негативной селекции (раздел 1B), к бусам прибавляют 400 мкл разведённого представителя исходной библиотеки. Полученную смесь инкубируют в течение 10 мин при комнатной температуре при вращении. Супернатант с фагом отбирают с помощью магнита и добавляют во вторую аликвоту 100 мкл для второй стадии негативной селекции. Таким образом осуществляют пять стадий негативной селекции.

С. Селекция с применением бус с иммобилизованным белком Ang-2.

Супернатант с фагом после последней стадии негативной селекции (раздел 1B) добавляют к бусам, покрытым Ang-2 (раздел 1A). Эту смесь инкубируют при вращении в течение 1-2 ч при комнатной температуре, что делает возможным связывание фага с нацеленным белком. После того, как супернатант отбрасывают и бусы 10 раз отмывают PBST, а затем 2 раза PBS.

Д. Неспецифическая элюция.

После последней стадии отмывания жидкость отделяют (раздел 2C), к бусам добавляют около 1 мл раствора солей Min A (60 mM K_2HPO_4 , 33 mM KH_2PO_4 , 7,6 mM $(NH_4)SO_4$ и 1,7 mM цитрата натрия). Эту содержащую бусы смесь добавляют непосредственно к концентрированному образцу бактерий для инфицирования (см. ниже разделы 3A и 3B).

Е. "Антигенная" (Ang-2) элюция связанного фага.

Для второго цикла после последней стадии отмывания (раздел 2C) связанный фаг элюируют с магнитных бус, добавляя 100 мкл 1 пМ, 0,1 нМ и 10 нМ рекомбинантного Ang-2 белка (Recombinant Human Angiopoietin-2, R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota), последовательно с 30-минутной инкубацией для каждого условия. Оставшийся фаг элюируют неспецифически (раздел 2D). Элюированный фаг после элюции с добавлением 10 нМ и неспецифической элюции объединяют и подвергают третьему раунду селекции (см. далее раздел 4).

Для цикла 3 после последней стадии отмывания (раздел 2C) связанный фаг элюируют с намагниченных бус, добавляя около 1 нМ рекомбинантного Ang-2 белка и 10 нМ рекомбинантного Ang-2 белка последовательно с 30-минутной инкубацией для каждого условия. Кроме того, фаг элюируют 1 мл 100 mM раствора триэтиламина (Sigma, St. Louis, Missouri), примерно, в течение 10 мин в ротационном шейкере. pH содержащего фаг раствора триэтиламина доводят до нейтрального (pH 7,5), добавляя 0,5 мл 1M Tris-HCl. После последней элюции 100 mM раствором триэтиламина оставшийся фаг элюируют, добавляя бусы к бактериям (раздел 2D).

Ф. Рецепторная (Tie-2) элюция связанного фага.

Для второго цикла после последней стадии отмывания (раздел 2C) связанный фаг элюируют с намагниченных бус, добавляя 100 мкл 1 пМ, 0,1 нМ и 10 нМ рекомбинантного Tie-2 белка (Recombinant Human Tie-2-Fc Chimera, R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota) с последующей 30-минутной инкубацией для каждого условия. Оставшийся фаг элюируют неспецифически (раздел 2D). Элюированный фаг после элюции с добавлением 10 нМ и неспецифической элюции объединяют и подвергают третьему циклу селекции (см. далее раздел 4).

Для цикла 3 после последней стадии отмывания (раздел 2C) связанный фаг элюируют с намагниченных бус, добавляя около 1 нМ рекомбинантного Ang-2 белка и 10 нМ рекомбинантного Ang-2 белка и 10 нМ рекомбинантного Tie-2 белка последовательно с 30-минутной инкубацией для каждого условия. Кроме того, фаг элюируют 1 мл 100 mM раствора триэтиламина (Sigma, St. Louis, Missouri), примерно, в течение 10 мин на ротационном шейкере. Содержащий фаг раствор триэтиламина нейтрализуют (pH 7,5),

добавляя 0,5 мл 1М Tris-HCl. После последней элюции 100 мМ раствором триэтиламина оставшийся фаг элюируют, добавляя бусы к бактериям (раздел 2D).

3. Амплификация.

А. Приготовление препарата высевных в плашки клеток.

Свежую культуру *E. Coli* (XL-1 Blue MRF') выращивают до OD₆₀₀ около 0,5 в среде LB, содержащей около 12,5 мкг/мл тетрациклина. Для каждого условия пэннинга около 20 мл этой культуры охлаждают льдом и центрифугируют. Осадок бактерий снова суспендируют, примерно, в 1 мл раствора солей Min A.

В. Трансдукция.

Каждую смесь, получаемую различными методами элюции, представленными выше (разделы 2D, 2E и 2F), прибавляют в концентрированные образцы бактерий (раздел 3A) и инкубируют при 37°C примерно в течение 15 мин. В каждую смесь добавляют около 2 мл среды NZCYM (2XNZCYM, 50 мкг/мл ампициллина) и инкубируют примерно при 37°C в течение 15 мин, 4 мл полученного раствора помещают на большую NZCYM агаровую пластину, содержащую 50 мкл ампициллина, и инкубируют в течение ночи при 37°C.

С. Сбор (харвестинг) фага.

Каждую из смесей бактерии/фаг выращивают в течение ночи на большой NZCYM агаровой пластине (раздел 3B), после чего соскребают примерно в 35 мл среды LB. Агаровую пластину далее промывают ещё 35 мл среды LB. Полученную смесь бактерии/фаг в среде LB центрифугируют, чтобы высадить бактерии. Около 50 мл супернатанта с фагом переносят в свежую пробирку, добавляют около 12,5 мл раствора ПЭГ (20% ПЭГ8000, 3,5М ацетата аммония) и инкубируют на льду в течение 2 ч для преципитации фага. Осаждённый фаг (преципитат) центрифугируют и снова суспендируют в 6 мл буфера для повторного суспендирования фага (250 мМ NaCl, 100 мМ Tris pH8, 1 мМ EDTA). Этот раствор фага дополнительно очищают, центрифугированием удаляя оставшиеся бактерии, и повторно осаждают фаг, добавляя около 1,5 мл раствора ПЭГ. После стадии центрифугирования осадок фага (пеллеты) снова суспендируют в 400 мкл PBS. Этот раствор центрифугируют последний раз, чтобы отделить оставшийся бактериальный дебрис. Полученный препарат фага титруют стандартным методом бляшкообразования.

4. Дополнительная селекция и амплификация.

Во втором цикле препарат амплифицированного фага (около 10¹⁰ бое) после первого цикла (раздел 3C) используют в качестве исходного фага для проведения стадий селекции и амплификации (разделы 2 и 3). Для Ang-2 и Tie-2 элюции фаг от "10 нМ" и неспецифической элюции объединяют и амплифицируют для третьего цикла селекции. В свою очередь препарат амплифицированного фага (10⁹ бое) после 2 цикла используют в качестве исходного фага для проведения 3 цикла селекции и амплификации (разделы 2 и 3). После стадий элюции (разделы 2D, 2E и 2F) 3 цикла малую часть элюированного фага помещают на пластину для анализа бляшкообразования (раздел 3C). Отдельные бляшки собирают и помещают в 96-луночные титрационные микропланшеты, содержащие в каждой лунке 100 мкл буфера TE. Эти эталонные (master) планшеты инкубируют при 4°C в течение ночи с целью осуществить элюцию фага в TE буфер.

5. Клональный анализ.

Клоны фагов анализируют методами ELISA для фагов и ДНК секвенированием. Ранговое распределение последовательностей осуществляют, исходя из совместных результатов этих двух анализов.

А. Анализ фага методом ELISA.

Культуру XL-1 Blue MRF' выращивают до тех пор, пока OD₆₀₀ не достигнет примерно 0,5. Аликвоты, около трети мкл этой культуры, помещают в каждую лунку 96-луночного титрационного микропланшета. В каждую лунку добавляют около 10 мкл элюированного фага (раздел 4) и бактерии инфицируют, примерно, в течение 15 мин при комнатной температуре. В каждую лунку добавляют около 100 мкл среды LB, содержащей около 12,5 мкг/мл тетрациклина и около 50 мкг/мл ампициллина. Затем микротитрационный планшет инкубируют в течение ночи примерно при 37°C. Рекомбинантный Ang-2 белок (около 1 мг/мл в PBS) иммобилизуют на поверхности лунок 96-луночных планшетов Maxisorp (NUNC) в течение ночи при 4°C. В качестве контроля чистый стрептавидин иммобилизуют на поверхности отдельного планшета Maxisorp при концентрации около 2 мкг/мл в PBS.

На следующий день жидкости в планшетах Maxisorp с иммобилизованным белком сливают и каждую лунку блокируют, примерно используя 300 мкл 5%-ого раствора молока примерно при 4°C в течение ночи (или же в течение 1 ч при комнатной температуре). Молочный раствор отбрасывают и лунки трижды отмывают раствором PBST. После последней стадии отмывания в каждую лунку планшетов Maxisorp с иммобилизованным белком добавляют около 50 мкл PBST-4% молоко. Культуры (примерно по 50 мкл) после выдерживания в течение ночи в 96-луночном микротитрационном планшете переносят в соответствующие лунки планшетов с иммобилизованным Ang-2, а также в лунки контрольных планшетов с иммобилизованным на их поверхности стрептавидином.

100 мкл смеси в двух видах планшетов инкубируют в течение примерно 1 ч при комнатной температуре. Жидкости из планшетов Maxisorp отбрасывают и лунки 3 раза отмывают PBST. HRP-конъюгированное антитело против M13 (Amersham Pharmacia Biotech) разводят примерно до 1:7500 и в каждую лунку планшетов Maxisorp добавляют примерно по 100 мкл разведённого раствора и инкубируют около 1 ч при комнатной температуре. Жидкость снова отбрасывают и лунки примерно 5 раз отмывают.

вают PBST. Затем в каждую лунку помещают около 100 мкл субстрата TMB (Sigma) и реакцию прекращают, прибавляя около 50 мкл 5N раствора H₂SO₄. OD₆₀₀ считывают с помощью планшетного ридера (Molecular Devices).

В. Секвенирование фаговых клонов.

Для каждого фагового клона методом PCR (ПЦР) получают матрицы для секвенирования. Для амплификации примерно 500 нуклеотидных фрагментов используют следующие пары олигонуклеотидов:

Праймер 1: 5'-CGGCGCAACTATCGGTATCAAGCTG-3' (SEQ ID NO: 54)

Праймер 2: 5'-CATGTACCGTAACACTGAGTTTCGTC-3' (SEQ ID NO: 55)

Следующие смеси готовят для каждого клона.

Реагенты	объём (мкл)/пробирка
dH ₂ O	26.25
50% глицерин	10
Буфер 10X PCR (без MgCl ₂)	5
25 mM MgCl ₂	4
10 mM dNTP смесь	1
100 мкМ праймер 1	0.25
100 мкМ праймер 2	0.25
Полимераза Taq	0.25
Фаг в ТЕ (раздел 4)	3
Конечный объём реакционной смеси	50

Для проведения ПЦР с целью осуществления следующей программы: 94°C в течение 5 мин (94°C за 30 с, 55°C за 30 с, 72°C за 45 с) × 30 циклов; 72°C в течение 7 мин; охлаждение до 4°C - используют термоблок (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems). Продукт каждой ПЦР (PCR) реакции очищают с помощью набора QIAquick Multiwell PCR Purification Kit (Qiagen) в соответствии с протоколом изготовителя. Затем очищенный продукт ПЦР анализируют, пропуская около 10 мкл каждой ПЦР реакционной смеси с 1 мкл красителя (лодинг-краситель в 10 X BBXS агарозном геле) на 1%-ном агарозном геле. Оставшийся продукт затем секвенируют, используя секвенатор ABI 377 (Perkin-Elmer) в соответствии с протоколом, рекомендуемым изготовителем.

6. Ранговое распределение последовательностей и определение согласованной последовательности.

А. Ранговое распределение последовательностей и анализ.

Пептидные последовательности, транслируемые при использовании переменных нуклеотидных последовательностей (раздел 5B), коррелируют с данными ELISA. Клоны, показывающие высокое значение OD₄₅₀ в лунках с иммобилизованным Ang-2 и низкое значение OD₄₅₀ в лунках с иммобилизованным стрептавидином, рассматриваются как более важные (им присвоен более высокий ранг). Также важными (имеющими ранг с высоким приоритетом) считаются последовательности, встречающиеся много раз. Исходя из этих критериев, выбирают последовательности-"кандидаты" для дальнейшего анализа в качестве пептидов или "пептител".

В. Определение согласованной последовательности.

Три различных класса консенсусных мотивов были получены при использовании библиотеки TN8-IX, а именно

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

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

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

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

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

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

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

Один консенсусный мотив получают при использовании TN12-I библиотеки

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

Для всех последовательностей консенсусных мотивов подчеркнутые "основные (core, коровые) аминокислотные последовательности" из каждой согласованной последовательности получают, определяя наиболее часто встречающуюся в каждом положении аминокислоту. "X" относится к любой природной аминокислоте. Два цистеиновых остатка, прилегающие к основным (коровым) последовательностям, представляют собой фиксированные аминокислоты в библиотеках TN8-IX и TN12-I.

Пептиды, идентифицированные как связывающиеся с Ang-2, представлены далее в табл. 3.

Таблица 3

Пептиды, связывающиеся с Ang-2

Пептид	Seq Id No	Последовательность
TN8-8	1	KRPCCEEMWGGCNYD
TN8-14	2	HQICKWDPWNCKHW
TN8-Con1	3	KRPCEEIFGGCTYQ
TN8-Con4	4	QEECEWDPWTCEHM
TN12-9	5	FDYCEGVDPFTFGCNH
L1	6	KFNPLDEETLYEQFTQQ
C17	7	QYGCDFLYGCMIN

Пример 4. Конструкция ДНК, кодирующей "пептитела".

Модифицированные пептиды, выбираемые в качестве возможных ингибиторов связывания Ang-2:Tie-2 (см. табл. 3), используют для построения слитых белков, в которых либо мономер каждого пептида, либо тандемный димер каждого пептида (с линкером между мономерными единицами) слит в рамке считывания с ДНК, кодирующей линкер с последующей Fc областью человеческого IgG1. Каждый модифицированный пептид создан гибридизацией пар олигонуклеотидов ("олиго") с образованием полинуклеотидных дуплексов, кодирующих пептид вместе с линкером, состоящим, в зависимости от пептида, либо из пяти остатков глицина, либо из восьми остатков глицина, либо одного остатка лизина; эти конструкции получают в виде фрагментов от NdeI до XhoI. Эти дуплексные полинуклеотидные молекулы лигируют в вектор (pAMG21-Fc N-концевой, подробнее описан далее), содержащий человеческий Fc ген, который был предварительно гидролизован с помощью NdeI и XhoI. Смеси, полученные при лигировании, трансформируют электропорацией в клетки *E. coli* штамм 2596 (GM221, подробно описанный далее) по обычным методикам. Клоны подвергают скринингу на способность продуцировать рекомбинантный белковый продукт и на содержание слияния генов с правильной нуклеотидной последовательностью. Такой единственный клон отбирают для каждого модифицированного пептида (т.е. продуктов слияния Fc-пептид).

Конструкция pAMG21-Fc N-концевой вектор.

pAMG21.

Плазмиду экспрессии pAMG21 (ATCC No. 98113) получают при использовании pCFM1656 (ATCC No. 69576) и экспрессирующей векторной системы, описанной в патенте США 4710473, по методике, описанной в опубликованной международной патентной заявке WO 00/24782 (см. раздел в примере 2 в этой заявке со страниц 100-103, а также фиг. 17A и 17B).

Fc N-концевой вектор.

Fc N-концевой вектор создают, используя в качестве матрицы штамм 3788 *E. coli*, pAMG21 Tro_Gly5_Fc мономер. Информация о клонировании этого штамма обнаружена в WO 00/24782 (см. пример 2 и фиг. 10 в этой заявке). 5' ПЦР праймер (описанный ниже подробнее) создают с целью удаления Tro пептидной последовательности в pAMG21 Tro_Gly5 и замены его полилинкером, содержащим сайты ApaI и XhoI. Используя штамм 3788 в качестве темплата, осуществляют ПЦР с полимеразой для наращивания цепи, используя олигонуклеотид SEQ ID NO: 8, представленный ниже, в качестве 5' праймера и универсальный 3' праймер, SEQ ID NO: 9, изображенный далее. Полученный ПЦР продукт очищают гель-хроматографией и расщепляют рестриктазами NdeI и BsrGI. Как плазмиду, так и полинуклеотид, кодирующий представляющий интерес пептид, вместе с его линкером очищают гель-хроматографией на вращающихся (spin) колонках Qiagen (Chatsworth, CA). Затем лигируют плазмиду и инсерты обычными методами лигирования, и полученную в результате лигирования смесь трансформируют в *E. coli* клетки (штамм 2596). Отбирают одиночные клоны и осуществляют секвенирование ДНК. Правильный (корректный) клон идентифицируют и используют в качестве источника вектора для модифицированных пептидов по данному описанию.

5' Праймер:

ACAAACAAACATATGGGTGCACAGAAAGCGGCCGCAAAAAAACTCGAGGGTGGAGGCGGTG
GGGACA (SEQ ID NO: 8)

3' Праймер:

GGTCATTACTGGACCGGATC (SEQ ID NO: 9)

Помимо приготовления таких модифицированных пептидов в качестве N-концевых слияний с Fc (N-концевых "пептител"), некоторые из них получают в качестве продуктов слияния по C-концу (C-концевых "пептител"). Вектор, используемый для получения C-концевых слияний, описан далее.

Конструкция Fc C-концевого вектора.

Fc C-концевой вектор для модифицированных пептидов создают, используя *E. coli* штамм 3728, pAMG21 Fc_Gly5_Tro мономер, в качестве темплата. Информация о клонировании этого штамма обнаружена в WO 00/24782 (см. пример 2 и фиг. 7 в описании в этой заявке). 3' ПЦР праймер (SEQ ID NO: 10)

создают с целью удаления Трo пептидной последовательности и замены его полилинкером, содержащим сайты *Apa*I и *Xho*I. Используя штамм 3728 в качестве темплата, осуществляют ПЦР с полимеразой для наращивания цепи, используя универсальный праймер (SEQ ID NO: 11) и вышеуказанный праймер 3' праймер. Полученный ПЦР продукт очищают гель-хроматографией и расщепляют рестриктазами *Bsr*GI и *Bam*HI. Как плазмиду, так и полинуклеотид, кодирующий представляющие интерес пептиды, вместе с его линкером очищают гель-хроматографией на вращающихся (spin) колонках Qiagen. Затем лигируют плазмиду и инсерт обычными методами лигирования, и полученную в результате лигирования смесь трансформируют в *E. coli* клетки (штамм 2596). Отбирают одиночные клоны и осуществляют секвенирование ДНК. Правильный (корректный) клон идентифицируют и используют в качестве источника вектора для модифицированных пептидов по данному описанию.

5' Праймер:

CGTACAGGTTTACGCAAGAAAATGG (SEQ ID NO: 10)

3' Праймер:

TTTGTTGGATCCATTACTCGAGTTTTTTTTGCGGCCGCTTCTGTGCACCACCACCTCCACCTTTAC (SEQ ID NO: 11)

GM221 (#2596).

Штамм-хозяин #2596, используемый для белков слияния Fc-пептид, представляет собой *E. coli* K-12 штамм, модифицированный таким образом, чтобы содержать промотор *lux* и как термочувствительный репрессор лямбда *cI857s7* в ранней *ebg* области, так и *lacI*^Q репрессор в поздней *ebg* области. Присутствие этих двух генов репрессоров позволяет использовать этого хозяина с различными системами экспрессии. В ATCC этот штамм имеет обозначение 202174.

Пример 5. Получение "пептител".

Экспрессия в *E. coli*.

Культуры каждой из слитых конструкций pAMG21-Fc в *E. coli* GM221 выращивают при 37°C бульоне Террифика (Terrific) (См. Tartof and Hobbs, "Improved media for growing plasmid and cosmid clones", Bethesda Research Labs Focus, Volume 9, page 12, 1987, цитируется в виде ссылки в вышеупомянутой книге Sambrook et al.). Индукцию экспрессии генного продукта с использованием промотора *luxPR* осуществляют, добавляя в культуральную среду синтетический аутоиндуктор лактон N-(3-оксогексаноил)-DL-гомосерина до конечной концентрации 20 нг/мл. Культуры инкубируют при 37°C ещё в течение 6 ч. Затем бактериальные культуры исследуют под микроскопом на присутствие телец включения и собирают центрифугированием. Рефрактильные тельца включения наблюдают в индуцированных культурах; это указывает, что, вероятнее всего, Fc-слияния продуцируются в нерастворимой фракции в *E. coli*. Клеточные пеллеты лизируют непосредственным ресуспендированием в буфере Лэммли для подготовки образцов, содержащем 10% β-меркаптоэтанол, и анализируют методом SDS-PAGE. В каждом случае на SDS-PAGE геле наблюдается интенсивная полоса, окрашенная Кумасси голубым, соответствующего молекулярного веса.

Очистка.

Клетки разрушают в воде (1/10), используя гомогенизацию под высоким давлением (два пассажа при 14000 PSI, 96.53 кПа), и тельца включения собирают центрифугированием (4000 RPM на центрифуге J-6B в течение 1 ч). Тельца включения солибилизируют в растворе 6М гуанидина, 50 мМ Tris, 10 мМ DTT, pH 8,5, в течение 1 ч при соотношении 1/10. Для линейных пептидов, слитых с Fc, солибализованную смесь разводят в 25 раз в 2М мочевины, 50 мМ Tris, 160 мМ аргинина, 2 мМ цистеина, pH 8,5. Окисление проводят в течение 2 дней при 4°C, при этом образуется соединение с дисульфидной связью (т.е. гомодимер Fc-пептид). Для циклических пептидов, слитых с Fc, следуют тому же самому протоколу, добавляя три следующих условия укладки (скручивания): (1) 2 М мочевины, 50 мМ Tris, 160 мМ аргинина, 4 мМ цистеина, 1 мМ цистамина, pH 8,5; (2) 4М мочевины, 20% глицерина, 50 мМ Tris, 160 мМ аргинина, 2 мМ цистеина, pH 8,5; и (3) 4М мочевины, 20% глицерина, 50 мМ Tris, 160 мМ аргинина, 4 мМ цистеина, 1 мМ цистамина, pH 8,5. Вновь скрученный белок подвергают диализу против 1,5М мочевины, 50 мМ NaCl, 50 мМ Tris, pH 9,0. Значение pH этой смеси понижают до pH 5, добавляя уксусную кислоту. Осадок удаляют центрифугированием и pH супернатанта доводят до 5-6,5 в зависимости от изоэлектрической точки каждого продукта слияния. Белок отфильтровывают и наносят при 4°C на колонку SP-Sepharose HP, уравновешенную раствором 20 мМ NaAc, 50 мМ NaCl при pH, определённом для каждой конструкции. Белок элюируют, используя линейный градиент в объёме, равном 20 объёмам колонки, в том же самом буфере от 50 мМ NaCl до 500 мМ NaCl. Фракции с максимальным объёмом удерживания (пик) собирают и фильтруют.

"Пептитела", полученные вышеуказанными методами, представлены ниже, в табл. 4.

Таблица 4

Peptibody	Peptibody Sequence
L1 (N)	MGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:12)
L1 (N) WT	MKFNPLDELEETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:13)
L1 (N) 1K WT	MKFNPLDELEETLYEQFTFQQSGSATGGSGSTASSGSGSATHLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:14)
2xL1 (N)	MGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQGGGGGGGKFNPLDELEETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:15)
2xL1 (N) WT	MKFNPLDELEETLYEQFTFQQGGGGGGGKFNPLDELEETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:16)
Con4 (N)	MGAQQEECEWDPWTCEHMLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:17)
Con4 (N) 1K-WT	MQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:18)
2xCon4 (N) 1K	MGAQQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWDPWTCEHMLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:19)
L1 (C)	M-Fc-GGGGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQLE (SEQ ID NO:20)
L1 (C) 1K	M-Fc-GGGGAQGGSGSATGGSGSTASSGSGSATHKFNPLDELEETLYEQFTFQQLE (SEQ ID NO:21)
2xL1 (C)	M-Fc-GGGGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQGGGGGGGKFNPLDELEETLYEQFTFQQLE (SEQ ID NO:22)
Con4 (C)	M-Fc-GGGGAQQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:23)
Con4 (C) 1K	M-Fc-GGGGAQGGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:24)
2xCon4 (C) 1K	M-Fc-GGGGAQQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:25)
Con4-L1 (N)	MGAQEECEWDPWTCEHMGGGGGGGKFNPLDELEETLYEQFTFQQSGSATGGSGSTASSGSGSATHLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:26)
Con4-L1 (C)	M-Fc-GGGGAQGGSGSATGGSGSTASSGSGSATHKFNPLDELEETLYEQFTFQQGGGGGQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:27)
TN-12-9 (N)	MGAQ-FDYCEGVDPFTFGCDNHLE-GGGGG-Fc (SEQ ID NO:28)
C17 (N)	MGAQ-QYCDGFLYGCMNLE-GGGGG-Fc (SEQ ID NO:29)
TN8-8 (N)	MGAQ-KRPCCEMWGGCNYDLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:30)
TN8-14 (N)	MGAQ-HQICKWDPWTCKHWLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:31)
Con1 (N)	MGAQ-KRPCCEIFGGCTYQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:32)

В табл. 4 "Fc" относится к последовательности человеческого Fc IgG1. В столбце 2 представлены аминокислотные последовательности "пептител". Область Fc в них представляет собой меченый Fc" и представлена ниже в SEQ ID NO: 60. Ясно, что там, где в названии используется метка, например, "Con4" или "Con-4", это относится к пептиду Con-4, тогда как применение суффикса "C", "(C)" или "-C"; или "N", "(N)" или "-N" указывает, что молекула представляет собой "пептитело" по данному описанию. Суффиксы "N", "(N)" или "-N" в названии "пептитела" указывают, что Ang-2-связывание пептида (или пептидов) является/являются N-концевым(-и) к Fc домену, а суффиксы "C", "(C)" или "-C" указывают, что Ang-2-связывание пептида (или пептидов) является/являются C-концевым(-и) к Fc домену. Кроме того, 2xCon4 (C) 1K, по определению в SEQ ID NO: 25, может в данном описании также употребляться без суффикса "1K".

Аминокислотная последовательность Fc области каждого "пептитела" суть следующая (от аминоконца до карбоксильного конца):

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL
 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
 LSPGK (SEQ ID NO: 60)

Последовательность ДНК (SEQ ID NO: 33-53), кодирующей "пептитела", соответствующие последовательностям SEQ ID NO: 12-32, соответственно, в табл. 4 представлена ниже.

SEQ ID NO: 33

ATGGGTGCACAGAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAACTCT
 GTACGAACAGTTCACTTTCCAGCAGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGG
 ACAAACTCACACATGTCCACCTTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGG
 GACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGAT
 CTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA
 AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC
 ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC
 CGTGTGGTCAAGCTCCTCACCGTCTGACCAAGGACTGGCTGAATGGC
 AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATC
 GAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT
 GTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAG
 CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGA
 GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAGCAAACTACAAGACCACGCCTC
 CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGT
 GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT
 GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC
 TCCGGGTAAATAATGGATCC

SEQ ID NO:34

ATGAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAACTCTGTACGAACA
 GTTCACTTTCCAGCAGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAACTCA
 CACATGTCCACCTTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGT
 TTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC
 CCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
 GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA
 GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
 GCGTCTCACCGTCTGACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA
 AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA
 TCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG
 CCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGC
 CTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
 AATGGGCAGCCGAGAGCAAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA
 CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG
 CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC
 TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA
 ATAA

SEQ ID NO:35

ATGAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAACTCTGTACGAACA
 GTTCACTTTCCAGCAGGGATCCGGTTCTGCTACTGGTGGTTCGGGCTCC
 ACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGTGCGACTCATCTCGAGGGTGGAGGC
 GGTGGGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTC
 CTGGGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACC
 CTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG
 AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT
 GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA
 GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC
 TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA
 GCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA
 ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAA
 CCAGGTACGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT
 CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACTACAAGA
 CCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAA
 GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT
 GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC
 TCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

SEQ ID NO:36

ATGGGTGCACAGAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAACTCT
 GTACGAACAGTTCACTTTCCAGCAGGGTGGTGGTGGTGGCGGTGG
 TAAGTTCAACCCACTGGATGAGCTGGAAGAGACTCTGTATGAACAGTT
 CACTTTCCAGCAACTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCACA
 CATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTT
 TCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC
 CTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG
 GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
 ACAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
 CGTCTTACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA
 GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCAT
 CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCTGC
 CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCCTGACCTGCC
 TGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
 ATGGGCAGCCGGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTCTGGAC
 TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC
 AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
 CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA
 TAA

SEQ ID NO:37

ATGAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAACTCTGTACGAACA
 GTTCACTTTCCAGCAGGGTGGTGGTGGTGGCGGTGGTAAGTTCAACCC
 ACTGGATGAGCTGGAAGAGACTCTGTATGAACAGTTCACTTTCCAGCA
 ACTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTT
 GCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCC
 AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATG
 CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG
 GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG
 AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC
 TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
 AACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA
 AGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG
 ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT
 TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
 GAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCC
 TTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
 GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC
 TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

SEQ ID NO:38

ATGGGTGCACAGCAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCGA
ACACATGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCACACATGTC
CACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTTTCTCTT
CCCCCAAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT
CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
AGCCAAAGGCGAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT
CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

SEQ ID NO:39

ATGCAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACACATGGG
ATCCGGTTCTGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCA
GGCAGTGCGACTCATCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCA
CACATGTCCACCTTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGT
TTTCTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC
CCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
GGTCAAAGTTCAAAGTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA
GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
GCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA
AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA
TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG
CCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC
CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
AATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGA
CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG
CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC
TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA
ATAA

SEQ ID NO:40

ATGGGTGCACAGCAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCGA
ACACATGGGATCCGGTTCTGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAG
CTCTGGTTTCAGGCAGTGCGACTCATCAGGAAGAATGCGAATGGGACCC
ATGGACTTGCGAACACATGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAA
CTCACACATGTCCACCTTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGT
CAGTTTTCTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG
GACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC
CTGAGGTCAAAGTTCAAAGTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG
CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG
GTCAGCGTCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG
TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAA
ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGAC
CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGC
TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACA
AGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG
AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
GTAAATAA

SEQ ID NO:41

ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
 GGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTC
 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
 CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
 CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
 ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAAGCCCTCCCAGCC
 CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
 ACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
 GGTACGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
 CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA
 CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCT
 CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
 CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
 CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGAAATTCAACCC
 GCTGGACGAGCTGGAAGAGACTCTGTACGAACAGTTTACTTTTCAACA
 GCTCGAGTAA

SEQ ID NO:42

ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
 GGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTC
 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
 CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
 CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
 ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAAGCCCTCCCAGCC
 CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
 ACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
 GGTACGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
 CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA
 CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCT
 CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
 CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
 CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGGGATCCGGTTC
 TGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTTCAGGCAGTGC
 GACTCATAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAAACTCTGTACGA
 ACAGTTCACTTTCCAGCAACTCGAGTAA

SEQ ID NO:43

ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
 GGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTC
 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
 CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
 CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
 ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAAGCCCTCCCAGCC
 CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
 ACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
 GGTACGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
 CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA
 CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCT
 CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
 CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
 CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGAAATTCAACCC
 GCTGGACGAACTGGAAGAAACTCTGTACGAACAGTTCACTTTCCAGCA
 GGGTGGTGGTGGTGGTGGCGGTGTAAGTTCAACCCACTGGATGAGCT
 GGAAGAGACTCTGTATGAACAGTTCACTTTCCAGCAACTCGAGTAA

SEQ ID NO:44

ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
 GGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCCTC
 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
 CACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
 CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
 ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCC
 CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
 ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
 GGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
 CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCA
 CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCT
 CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
 CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
 CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGCAGGAAGAAT
 GCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACACATGCTCGAGTAA

SEQ ID NO:45

ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
 GGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCCTC
 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
 CACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
 CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
 ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCC
 CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
 ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
 GGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
 CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCA
 CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCT
 CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
 CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
 CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGGGATCCGGTTC
 TGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGTGC
 GACTCATCAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACACA
 TGCTCGAGTAA

SEQ ID NO:46

ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
 GGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCCTC
 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
 CACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
 CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
 ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCC
 CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
 ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
 GGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
 CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCA
 CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCT
 CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
 CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
 CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGCAGGAAGAAT
 GCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACACATGGGATCCGGTTCGTGTA
 CTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGCGGACTC
 ATCAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACACATGCTC
 GAGTAA

SEQ ID NO:47

ATGGGTGCACAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACA
CATGGGTGGTGGTGGTGGTGGCGGTGGTAAATTCAACCCGCTGGACGA
ACTGGAAGAACTCTGTACGAACAGTTCACTTTCCAGCAGGGATCCGG
TTCTGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCACT
GCGACTCATCTCGAGGGTGGAGCGGTGGGACAAAACTCACACATGT
CCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCTCT
TCCCCCAAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG
TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT
TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAAG
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT
CCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
CAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

SEQ ID NO:48

ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
GGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGC
CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCT
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGGGATCCGGTTC
TGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGTGC
GACTCATAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAACTCTGTACGA
ACAGTTCACTTTCCAGCAGGGTGGTGGCGGTGGTCAGGAAGAATGCGA
ATGGGACCCATGGACTTGCGAACACATGCTCGAGTAA

SEQ ID NO:49

ATGGGTGCACAGTTCGACTACTGCGAAGGTGTTGAAGACCCGTTCACT
TTCGGTTGCGACAACCACCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAAC
TCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTC
AGTTTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGG
ACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC
GAGGTCAAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT
CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA
CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAAC
CATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC
TGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCT
GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG
GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG
AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG
GCTCTGCAACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT
AAATAA

SEQ ID NO:50

ATGGGTGCACAGCAGTACGGTTGCGACGGTTTTCTGTACGGTTGCATG
 ATCAACCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCACACATGTCC
 ACCTTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCCTCTTC
 CCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
 ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC
 AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC
 GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA
 CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
 GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA
 GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC
 CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
 AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
 AGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGAC
 GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
 CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
 AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

SEQ ID NO:51

ATGGGTGCACAGAAACGCCCATGCGAAGAAATGTGGGGTGGTTGCAA
 CTACGACCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCACACATGTC
 CACCTTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCCTCTT
 CCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
 CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT
 CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
 CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
 ACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
 GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
 AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT
 CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
 AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
 CAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGAC
 GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
 CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
 AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

SEQ ID NO:52

ATGGGTGCACAGCACCAGATCTGCAAATGGGACCCGTGGACCTGCAA
 AACTGGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACCTCACACATGTC
 CACCTTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCCTCTT
 CCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
 CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT
 CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
 CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
 ACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
 GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
 AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT
 CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
 AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
 CAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGAC
 GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
 CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
 AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

SEQ ID NO:53

ATGGGTGCACAGAAACGTCCATGCGAAGAAATCTTCGGTGGTTGCACC
TACCAGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAACTCACACATGTCC
ACCTTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTTTCTCTTC
CCCCAAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC
AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC
GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA
CCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA
GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC
CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
AGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

Пример 6. Анализ "пептител".

Четырнадцать пептител испытывают методом ELISA нейтрализацией, а три "пептитела" испытывают методом аффинного ELISA. Результаты представлены в табл. 5.

Таблица 5

Пептитело	hAng-2		mAng-2		hAng-2	
	IC50 (нМ)	EC50 (нМ)	IC50 (нМ)	EC50 (нМ)	IC50 (нМ)	EC50 (нМ)
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	Нет ингибирования	Нет связывания
2xL1 (C)	0.90		1.0			
Con4 (N) 1K-WT			1.9			
L1 (N)	6		11		Нет ингибирования	
C17 (N)	9		13		Нет ингибирования	
12-9 (N)	21		7.7		Нет ингибирования	
Con1 (N)	26		~200		Нет ингибирования	
8-14 (N)	45		33		Нет ингибирования	
L1 (C)	65		37			
8-8 (N)	80		~700		Нет ингибирования	
Негативный контроль "Пептитело" 4883	Нет ингибирования	Нет связывания	Нет ингибирования	Нет связывания	Нет ингибирования	Нет связывания

Аминокислотная последовательность негативного контрольного "пептитела" 4883 представляет собой следующую последовательность (Fc область подчеркнута, линкер "GGGGG", а пептидная область выделена жирным шрифтом):

MDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK-GGGGG-CTAGYHWNSDCECCRRN (SEQ ID NO: 243)

Понятно, что фраза "Нет ингибирования" в данном описании не означает, что соединение не имеет ингибирующих свойств. Скорее, выражение "Нет ингибирования", применяемое в данном описании, относится к таким соединениям, для которых в ходе испытания методом ELISA с нейтрализацией в условиях по данному описанию получено значение IC₅₀ выше, чем 1000 нМ, что является наивысшей концен-

трацией, при которой проводится скрининг этих соединений. Несмотря на то, что заметных ингибирующих свойств не наблюдается для молекул с пометкой "Нет ингибирования", ясно, что эти молекулы в действительности могут демонстрировать ингибирующие свойства в других условиях анализа или в других методах анализа. Ясно, что в предпочтительном варианте изобретение относится к "пептителам", проявляющим ингибирующие свойства в анализах по данному описанию.

Два "пептитела" изучают аффинным анализом BIAcore (как описано в примере 2). Результаты представлены ниже, в табл. 6.

Таблица 6

"Пептитело"	hAng-2			mAng-2		
	K _D (нМ)	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	K _D (нМ)	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
TN19-9 (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

Пример 7. Изучение терапевтической эффективности при системном введении Ang-2 "пептитела".

Ang-2 "пептитело", TN8-Con4-C, вводят подкожно A431 мышам, несущим опухоль, по схеме "1 раз в день" через 72 ч после введения опухоли. Дозы "пептитела" составляют 1000, 200, 40 и 8 μ г/мышь/день. Всего 20 дают всем животным. Объем опухоли и вес тела записывают 3 раза в неделю. По окончании исследования животных умерщвляют и их сыворотку собирают для измерения уровней "пептитела" методом ELISA. Во всех группах собирают опухоли и панель нормальных тканей.

Результаты показаны на фиг. 1. Как можно видеть, заметная разница в росте опухоли наблюдается между группой, обработанной Ang-2 "пептителом" и контролем с носителем. Все четыре дозы Ang-2 "пептитела" ингибируют рост опухоли по сравнению с контролем (носителем) ($p < 0,0001$ по сравнению с контрольным носителем, ANOVA). Напротив, опухоли в контрольной группе продолжали расти со значительно более высокой скоростью. Обработка этим "пептителом" не оказала заметного влияния на конечный вес тела, вес органов или гематологические параметры животных, получавших указанные выше дозы.

Пример 8.

1. Конструкция вторичных пептидных библиотек Ang-2.

A. Электрокомпетентные E.coli клетки.

Полученные электропорацией компетентные клетки Epicurian Coli[®] XL1-Blue MRF' (Stratagene #200158) получают от фирмы Stratagene (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA).

B. Модификация вектора pCES1.

ПЦР осуществляют, используя ПЦР темплатные системы для наращивания цепи системы (Extend Long Template PCR Systems, Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN) с 1 мкг вектора pCES1 (TargetQuest Inc.) в качестве темплата. Объем ПЦР-смеси, составляющий 100 мкл, содержит 1х буфера для проведения ПЦР, 200 нМ каждого из двух праймеров:

5'-CAAACGAATGGATCCTCATTAAGCCAGA-3' (SEQ ID NO: 244) и

5'-GGTGGTGGCGCCGCACTCGAGACTGTTGAAAGTTGTTTAGCA-3' (SEQ ID NO: 245),

200 нМ dNTP и 3 единицы (U) Tag ДНК полимеразы. ПЦР система TRIO Thermoblock (Biometra) PCR работает следующим образом: 94°C в течение 5 мин; 30 циклов 94°C по 30 с, 50°C по 30 с, 72°C по 45 с; и 72°C по 10 мин; охлаждение до 4°C.

Затем продукты ПЦР наносят на 1% агарозный гел и очищают на вращающейся колонке QIAGEN Spin Column (QIAGEN Inc., Valencia, CA) в соответствии с протоколами производителя. Вторую ПЦР реакцию осуществляют с 5 мкл продуктов ПЦР и 200 нМ каждого из двух праймеров:

5'-CAAACGAATGGATCCTCATTAAGCCAGA-3' (SEQ ID NO: 246) и

5'-AACACAAAAGTGCACAGGGTGGAGGTGGTGGTGGCGCCGCAGT-3' (SEQ ID NO: 247), в тех же условиях ПЦР, что и описанные выше.

Продукты ПЦР и исходный вектор pCES1 затем расщепляют по отдельности в 100 мкл реакционной смеси, содержащей буфера 1х NEB2, 60 Ед (U) ApaI (New England Biolabs, Beverly, MA), 60 Ед (U) BamHI (New England Biolabs) при 37°C в течение 1 ч. ДНК после отщепления очищают на колонке QIAGEN Spin Column и лигируют вместе в 40 мкл реакционной смеси, содержащей 1х буфера для лигирования и 40 Ед (U) N4 ДНК лигазы (New England Biolabs) при комнатной температуре в течение ночи.

Векторы трансфецируют в E. coli и инкубируют при 37°C в течение ночи. Выделенные единичные колонии отбирают и затем очищают плазмиду на колонке QIAGEN Spin Column. Правильный инсерт подтверждают секвенированием ДНК.

C. Получение векторной ДНК.

1 мкг векторной ДНК модифицированного pCES1 (из раздела 1B, см. выше) трансформируют в 40 мкл электрокомпетентных клеток XL1-blue E. coli (из раздела 1A, см. выше), используя Gene Pulser II (ген-

ный импульсный генератор) (BIO RAD, Hercules, CA), установленный при 2500 В, 25 мкФ, и 200 ом. Затем образец трансформированных бактерий немедленно переносят в пробирку, содержащую 960 мкл SOC (2% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM глюкозы, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂), и культуры выращивают при 37°C при встряхивании в течение 1 ч.

Затем клетки наносят на 2х YTAGT (2хYT с 100 µg/мл ампициллина, 12,5 µg/мл тетрациклина и 2% глюкозы) агаровую пластинку и инкубируют при 37°C в течение ночи. Одиночную колонию подтверждают секвенированием и используют для инокуляции 2 л среды 2хYTAQT при 37°C с помощью встряхивания в течение ночи. Плазмидную векторную ДНК очищают, используя набор QIAGEN Plasmid Maxi Kit в соответствии с протоколами производителя.

Д. Расщепление (гидролиз) векторной ДНК.

Всего около 2000 мкг векторной ДНК (из раздела 1С, см. выше) расщепляют в 5000 мкл реакционной смеси, содержащей 1х NEB буфер 2, 300 Ед (U) ApaI и 300 Ед (U) XhoI, при 37°C в течение ночи. Реакцию расщепления рестриктазами инкубируют при 37°C и анализируют в предварительно приготовленном 0,8% агарозном геле (Embi Tec, San Diego, CA). Затем линейаризованный вектор ДНК вырезают из геля и экстрагируют, используя набор для экстракции в геле -QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc.) в соответствии с рекомендациями производителя.

Е. Получение олигонуклеотидов из библиотеки.

Шесть олигонуклеотидов из библиотеки (1 закреплённый-фиксированный и 5 нанесённых) создают на основе последовательностей, полученных в результате описанных выше процедур. Один фиксированный олигонуклеотид из библиотеки представляет собой

5'-CACAGTGCACAGGGTNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKS

ARTGGGATCCGTGGASCNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKCATTT

CTCTCGAGATCA-3' (номер библиотеки 20) (SEQ ID NO: 248);

и два из 70% нанесённых библиотечных олигонуклеотидов суть следующие:

5'-CACAGTGCACAGGGTNNKNNKNNKaaKcgKccKNNKga

KgaKatKttKggKggKNNKacKtaKcaKNNKNNKNNKCATTTCTC

TCGAGATCA-3' (номер библиотеки 27); (SEQ ID NO: 249);

5'-CACAGTGCACAGGGTNNKaaKttKaaKccKctKgaKgaKctKgaKga

KacKctKtaKgaKcaKttKacKttKcaKcaKNNKCATTTCTCTCGAGATCA-

3' (номер библиотеки 99); (SEQ ID NO: 250)

Строчные буквы обозначают смесь 70% указанного основания и 10% любого из трёх других нуклеотидов). Другие три из 91% нанесённых библиотечных олигонуклеотидов суть следующие:

5'-CACAGTGCACAGGGTNNKNNKNNKcaKgaKgaKTGCgaKtg

KgaKccKtgKacKTGCgaKcaKatKNNKNNKNNKCATTTCTCTCGAGA

TC A-3' (номер библиотеки 94); (SEQ ID NO: 251);

5'-CACAGTGCACAGGGTNNKttKgaKtaKNNKgaKggKgtKgaKgaKcc

KttKacKttKggKNNKgaKaaKcaKNNKCATTTCTCTCGAGATCA-3'

(номер библиотеки 25); (SEQ ID NO: 252);

и

5'-CACAGTGCACAGGGTNNKaaKttKaaKccKctKgaKgaKctKgaKga

KacKctKtaKgaKcaKttKacKttKcaKcaKNNKCATTTCTCTCGAGATCA- 3'

(номер библиотеки 26); (SEQ ID NO: 253)

Как понимают специалисты в данной области техники, в вышеприведённых олигонуклеотидах (олиго, oligos) "N" указывает, что каждый из четырёх нуклеотидов (А, Т, С и G) в равной мере представлен в процессе синтеза "олиго", а "K" показывает, что нуклеотиды G и T равно представлены в синтезе олиго. Строчные буквы обозначают смесь 91% указанного основания и 3% каждого из других трёх нуклеотидов. Каждый из этих олигонуклеотидов используют в качестве темплата в ПЦР.

Для проведения ПЦР реакций используют набор ПЦР системы с высокоточным наращиванием цепи (Expand High Fidelity PCR System kit (Roche Diagnostics Corp.)). Каждую библиотеку олигонуклеотидов амплифицируют в 96-луночном планшете в 50 мкл ПЦР-реакционной смеси, которая содержит 1 нМ олигонуклеотида из библиотеки, 1X буфера для ПЦР, 300 нМ каждого из праймеров:

5'-CACAGTGCACAGGGT-3' (SEQ ID NO: 254); и

5'-TGATCTCGAGAGAATG-3', (SEQ ID NO: 255);

200 мМ dNTP, 1,5 mM MgCl₂ и 350 U полимеразы для наращивания цепи.

Термоблок (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) применяют для осуществления сле-

дующей программы: 94°C за 5 мин; 25 циклов (94°C за 30 с, 52,5°C за 60 с, 72°C за 30 с); 72°C за 10 мин; охлаждение 4°C. Затем свободные нуклеотиды удаляют с помощью набора для ПЦР-очистки QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN Inc. Cat. #28104) в соответствии с протоколами производителя.

Ф. Расщепление олигонуклеотидов из библиотек.

Для каждой библиотеки ПНР продукты (раздел 1Е) гидролизуют (расщепляют) в 1200 мкл реакционной смеси, которая содержит 1x NEB буфер 2, 750 Ед (U) ApaLI и 750 Ед (U) XhoI, при 37°C в течение ночи. ДНК после расщепления отделяют на предварительно приготовленном 3% агарозном геле (Embi Tec). Нужную полосу ДНК из каждой реакции вырезают из геля и извлекают (экстрагируют), используя целлюлозно-ацетатный фильтр 0,22 мкм (Corning Inc. Cat# 8160) центрифужной пробирки COSTAR Spin-X.

Г. Лигирование вектора с олигонуклеотидами библиотеки.

450 мкл реакционной смеси для лигирования, содержащей линеаризованный вектор (раздел 1D) и каждый ПЦР продукт расщепляемой библиотеки (раздел 1F) в молярном соотношении 1:5, 1x NEB буфер для лигирования и 20000 Ед (U) T4 ДНК лигазы, выдерживают при 16°C в течение ночи. Продукты лигирования инкубируют при 65°C в течение 20 мин, чтобы инактивировать T4 ДНК лигазу, и дополнительно инкубируют со 100 Ед (U) NotI при 37°C в течение 2 ч, чтобы свести к минимуму самолигирование вектора. Затем дотированные продукты очищают стандартной экстракцией смесью фенол/хлороформ (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Maniatis et al., 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000) и снова суспендируют в 120 мкл H₂O.

Н. Трансформация методом электропорации.

Для каждой библиотеки проводят двенадцать реакций электропорации. Для каждой трансформации 10 мкл лигированного вектора ДНК (раздел 1G) и 300 мкл клеток XL1-BLUE MRF' (раздел 1А) смешивают в кювете 0,2 см (BIO-RAD). Полученную смесь выдерживают в пульсовом режиме в Gene Pulser II, установленном при 2500 В, 25 мкФ и 200 ом. Затем трансформированные в результате двенадцати реакций электропорации бактерии объединяют и переносят в колбу, содержащую 26 мл SOC, для инкубации при 37°C в течение 1 ч. Клетки добавляют в 450 мл 2x YTAG и выращивают при 37°C при встряхивании в течение 5 ч. Клетки центрифугируют при 4000 об./мин 15 мин при 4°C. Клеточный осадок затем снова суспендируют в 12 мл 15% глицерин/2xYT и хранят при -80°C. Это является первичным штаммом библиотек. Титры указывают размеры библиотек 5,0×10⁹ (номер библиотеки 20), 3,3×10¹⁰ (номер библиотеки 94), 4,7×10⁹ (номер библиотеки 25), 5,0×10⁹ (номер библиотеки 26), 3,0×10⁹ (номер библиотеки 27) и 4,2×10⁹ (номер библиотеки 99) независимых трансформантов.

2. Амплификация библиотек.

А. Приготовление вторичного штамма библиотек.

Из первичного штамма клеток библиотек (из раздела 1Н, см. выше) достаточное количество клеток, чтобы покрыть 10X размер каждой библиотеки, используют для инокуляции 2xYTAGT (2YT с 100 мкг/мл ампициллина, 12,5 мкг/мл тетрациклина и 2% глюкозы) среды, так чтобы начальная величина OD₆₀₀ составляла 0,1. Культуры выращивают при 37°C при встряхивании в течение нескольких часов до достижения OD₆₀₀=0,5. Аликвоту - одну десятую часть этой библиотеки отбирают и выращивают в отдельных колбах в течение ещё двух часов при 37°C. Затем эти субкультуры центрифугируют при 4000 об./мин на роторе Beckman JA-14 в течение 10 мин при 4°C и осадок бактерий снова суспендируют в 7,0 мл (для каждой библиотеки) 15% глицерин/2xYT для хранения при -80°C.

В. Индукция фага.

Аликвоты M13K07 хелперного фага (Amersham Pharmacia Biotech) добавляют к оставшимся бактериальным культурам при OD₆₀₀=0,5 (из раздела 2А, см. выше) до конечной концентрации 3 × 10⁹ б.е./мл. Оставляют хелперный фаг инфицировать бактерии при 37°C в течение 30 без встряхивания и 30 мин при слабом встряхивании. Инфицированные клетки центрифугируют при 5000 об./мин в течение 15 мин при 4°C. Клеточный осадок (пеллеты) снова суспендируют в том же самом объёме (из раздела 2А, см. выше) средой 2xYTAK (2YT с 100 мкг/мл ампициллина и 40 мкг/мл канамицина). Получение фагемид осуществляют при 30°C в течение ночи при встряхивании.

С. Сбор фага.

Бактериальные культуры из раздела 2В, см. выше, центрифугируют при 5000 об./мин в течение 15 мин при 4°C. Затем супернатанты переносят в новые пробирки, добавляют 0,2 объёма 20% ПЭГ/2,5М NaCl и инкубируют на льду в течение 1 ч, чтобы высадить фагемиды. Осаждённые фагемиды центрифугируют при 10000 об./мин 30 мин при 4°C и осторожно снова суспендируют со 100 мл холодного PBS. Раствор фагемид дополнительно очищают, отделяя центрифугированием оставшиеся клетки при 4000 об./мин в течение 10 мин при 4°C и осаждая фагемиды добавлением 0,2 объёма 20% ПЭГ/2,5М NaCl. Фагемиды центрифугируют при 10000 об./мин в течение 30 мин при 4°C и пеллеты фагемид снова суспендируют с 18 мл холодного PBS. 6 мл 60% раствора глицерина прибавляют к раствору фагемид для хранения при -80°C. Титры фагемид определяют по стандартной методике (Molecular Cloning, Maniatis et al., 3rd Edition).

3. Селекция Ang-2 связывающего фага.

А. Иммунизация Ang-2 на намагниченных бусах.

Биотинилированный Ang-2 (из раздела 3А, см. выше) иммобилизуют на Streptavidin M-280 Dynabeads (DINAL, Lake Success, NY) с концентрацией около 2000 нг Ang-2 белка на 100 мкл массы бус от производителя. С помощью магнита бусины перемещают на одну сторону пробирки и пипеткой отбирают жидкость, бусы дважды отмывают фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) и снова суспендируют в PBS. Биотинилированный Ang-2 белок добавляют к отмывым бусинам с вышеуказанной концентрацией и инкубируют при вращении в течение 1 ч при комнатной температуре. Бусы, покрытые Ang-2, затем блокируют, добавляя BSA до конечной концентрации 2%, и инкубируют в течение ночи при 4°C при вращении. Затем полученные в результате покрытые Ang-2 бусы дважды отмывают PBST (PBS с 0,05% Tween-20) перед тем, как подвергнуть их селекции.

В. Селекция с применением бус, покрытых Ang-2.

Около 1000-кратного библиотечного эквивалента фагемид (из раздела 2С, см. выше) блокируют в течение 1 ч с помощью 1 мл PBS, содержащего 2% BSA. Осуществляют три стадии негативной селекции заблокированного образца фагемид, добавляя его к чистым бусам (те же бусы, что и в разделе 3А, но не покрытые белком Ang-2), и эту смесь инкубируют при комнатной температуре в течение 15 мин при вращении. Содержащий фагемиды супернатант отбирают с помощью магнита и переносят во вторую пробирку, содержащую чистые бусы (те же бусы, что и описанные в разделе 3А, но не покрытые белком Ang-2), и эту смесь инкубируют при комнатной температуре в течение 15 мин при вращении.

Процедуру повторяют. Содержащий фагемиды супернатант отбирают с помощью магнита и переносят в новую пробирку, содержащую бусы, покрытые белком Ang-2 (из раздела 3А), и эту смесь инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч при вращении. После того как супернатант отбрасывают, бусы, связанные с фагемидами, 10 раз отмывают с помощью 2% молоко-PBS; 10 раз с помощью 2% BSA-PBS; 10 раз с помощью PBST и дважды с помощью PBS. Затем фагемиды элюируют в 1 мл 100 мМ раствора триэтиламина (Sigma, St. Louis, MO) в течение 10 мин на шюттль-аппарате. pH раствора, содержащего фагемиды, нейтрализуют, добавляя 0,5 мл 1М Tris-HCl (pH 7,5). Полученные фагемиды используют для инфицирования 10 мл свежесинтезированных бактерий XL1-BLUE MRF' (OD₆₀₀ около 0,5) при 37°C в течение 30 мин без встряхивания и 30 мин при медленном встряхивании. Все инфицированные XL1-BLUE MRF' клетки затем помещают в плашку 15×15 см 2хYTAG и инкубируют при 30°C в течение ночи.

С. Индукция и сбор фага.

Аликвоту 10 мл среды 2хYTAGT добавляют в плашку (из раздела 3В) для повторного суспендирования XL1-BLUE MRF' клеток. Все XL1-BLUE MRF' клетки собирают в пробирку, аликвоту 250 мкл этих клеток добавляют к 25 мл 2хYTAGT и выращивают при 37°C до OD₆₀₀=0,5. M13KO7 хелперный фаг добавляют до конечной концентрации 3×10 КОЕ/мл и инкубируют при 37°C в течение 30 мин без встряхивания и 30 мин при медленном встряхивании. Клетки центрифугируют при 5000 об./мин в течение 10 мин при 4°C и снова суспендируют с 25 мл 2хYTAG. Эти бактерии выращивают при 30°C в течение ночи при встряхивании. Индуцированные фагемиды собирают и очищают как в разделе 2С.

Д. Второй раунд селекции.

Второй раунд селекции проводят, как подчёркнуто в разделе 3В-3С, за исключением следующего. Около 100-кратного библиотечного эквивалента фагемид, полученных в разделе 3С, используют в качестве исходных фагемид. Количество биотинилированного белка Ang-2 (раздел 3А), нанесённого на бусы Dynabead M-280 Streptavidin, уменьшают до 20 нг. Затем связанные с фагом бусы отмывают 10 раз с помощью 2% молоко-PBS; 10 раз - 2% BSA-PBS; 10 раз - PBST, при этом последнее отмывание включает 60-минутную инкубацию при комнатной температуре в PBST. Бусы дважды отмывают PBS. Условия элюции те же, что и в первом раунде (раздел 3В).

Е. Второй раунд селекции.

Третий раунд селекции проводят, как подчёркнуто в разделе 3В-3С, за исключением следующего. Около 10-кратного библиотечного эквивалента фагемид, полученных в разделе 3Д, используют в качестве исходных фагемид. Около 2 нг биотинилированного белка Ang-2 (из раздела 3А) используют для нанесения на бусы Dynabead M-280 Streptavidin. Связанные с фагом бусы отмывают 10 раз с помощью 2% молоко-PBS; 10 раз - 2% BSA-PBS; 10 раз - PBST, при этом последнее отмывание включает 60-минутную инкубацию при комнатной температуре в PBST. Бусы дважды отмывают PBS. Условия элюции те же, что и в первом раунде (раздел 3В).

Ф. Четвёртый раунд селекции.

Четвёртый раунд селекции проводят, как подчёркнуто в разделе 3В-3С, см. выше, за исключением следующего. Библиотечный эквивалент фагемид, полученных в разделе 3Е, используют в качестве исходных фагемид. Количество биотинилированного белка Ang-2 (раздел 3А), нанесённого на Dynabead M-280 Streptavidin, уменьшают до 0,4 нг для библиотек 25, 26 и 27. Для библиотек 20 и 94 количество нанесения сохраняется такое же, как и в третьем раунде, 2 нг. Библиотека 99 не участвует в четвёртом раунде стадии селекции. Условия элюции те же, что и в первом раунде (раздел 3В).

4. Клональный анализ.

А. Приготовление эталонного планшета.

Отбирают одиночные колонии из второго раунда селекции и инокулируют в 96-луночные планшеты, содержащие 120 мкл 2хYTAGT в лунке. 96-луночные планшеты инкубируют при 30°C в шюттль-аппарате в течение ночи. В каждую лунку прибавляют 40 мкл 60% глицерина и хранят при -80°C.

В. Анализ фагемид методом ELISA.

Аликвоты около 2 мкл клеток из эталонного планшета (из раздела 4А см. выше) инокулируют в свежий Costar 96-луночный планшет (Corning incorporated, Corning, NY, cat.# 69794), который содержит 100 мкл 2хYTAGT в лунке, и клетки в этом новом планшете выращивают при 37°C примерно до OD₆₀₀=0,5.

40 мкл 2хYTAGT, содержащей M13K07 хелперный фаг ($1,5 \times 10^{13}$ КОЕ/мл), добавляют в каждую лунку и 96-луночный планшет инкубируют при 37°C в течение 30 мин без встряхивания и ещё в течение 30 мин при слабом встряхивании. Планшет центрифугируют при 2000 об./мин (настольная центрифуга Beckman CS-6R) в течение 10 мин при 4°C. Супернатанты удаляют из лунок и каждый клеточный осадок (пеллеты) снова суспенсируют, используя 150 мкл 2хYTAK на лунку. Планшет инкубируют при 30°C в течение ночи для экспрессии фагемид.

Человеческий Ang-2 белок наносят на 96 луночный планшет Maxisorp (NUNC) при 1 мкг/мл в 1хPBS при 4°C в течение ночи. В качестве контроля 2% BSA (Sigma) наносят на отдельный Maxisorp планшет. На следующий день стоявшие в течение ночи клеточные культуры центрифугируют при 2000 об./мин в течение 10 мин при 4°C. 10 мкл супернатанта из каждой лунки переносят в новый 96-луночный планшет, содержащий раствор BSA/PBS для разведения супернатанта 1:10. Полученные смеси инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре при встряхивании для блокирования фагемид. В то же время планшет, покрытый белком Ang-2, блокируют 400 мкл 2% раствора BSA/PBS на лунку в течение 1 ч при комнатной температуре при встряхивании. Раствор BSA отбрасывают и каждую лунку трижды отмывают раствором PBS. После последней стадии отмывания в каждую лунку планшета, покрытого белком Ang-2, а также контрольного планшета добавляют по 100 мкл раствора заблокированных фагемид и инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре при встряхивании. Жидкость отбрасывают, а каждую лунку трижды отмывают раствором PBST. 100 мкл HRP-конъюгированного анти-M13 mAb (мышинного антитела) (Amersham Pharmacia Biotech) при разведении 15000 добавляют в каждую лунку планшета, покрытого белком Ang-2, а также контрольного планшета, и эти планшеты инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре при встряхивании. Жидкость снова отбрасывают, а каждую лунку трижды отмывают раствором PBST. 100 мкл хемилюминесцентных субстратов LumiGLO (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) добавляют в лунки и каждую лунку прочитывают на приборе Luminoskan Ascent DLRearly machine (LabSystems, Franklin, MA).

С. Секвенирование фаговых клонов.

Реакцию ПЦР проводят, используя в качестве темплата 1 мкл бактерий из каждой лунки эталонного планшета (раздел 4А). Объём каждой ПЦР смеси составляет 50 мкл, и в него входит 1х буфера для ПЦР, 300 нМ каждого из двух праймеров:

5'-GTTAGCTCACTCATAGGCAC-3' (SEQ ID NO: 256) и

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

200 мкМ dNTP, 2 мМ MgCl₂ и 2,5 Ед (U) taq ДНК полимеразы (Roche Molecular Biochemicals). Систему GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) используют для осуществления следующей программы: 94°C за 5 мин; 40 циклов (94°C за 45 с, 55°C за 45 с, 72°C за 90 с); 72°C за 10 мин; охлаждение до 4°C. ПЦР продукт очищают с помощью набора QIAquick 96 PCR Purification Kit (QIAGEN Inc.) в соответствии с рекомендациями производителя. Все очищенные ПЦР продукты секвенируют с применением праймера 5'-TTACACTTTATGCTTCCG-3' (SEQ ID NO: 258), используя секвенатор ABI 3770 Sequencer (Perkin Elmer) в соответствии с рекомендациями производителя.

5. Ранговое распределение последовательностей.

Пептидные последовательности, транслированные при использовании нуклеотидных последовательностей (из раздела 4С, см. выше) коррелируют с данными ELISA. Клоны, которые показывают высокую OD при прочитывании в лунках, покрытых Ang-2, и низкую OD при прочитывании в лунках, покрытых BSA, считаются важными. 24 пептидных последовательности из библиотеки 20, 26 пептидных последовательностей из библиотеки 94, 7 пептидных последовательностей из библиотеки 25, 18 пептидных последовательностей из библиотеки 26, 6 пептидных последовательностей из библиотеки 27 и 4 пептидных последовательности из библиотеки 99 выбирают для дальнейшего анализа и образования "пептител". Кроме того, 11 согласованных последовательностей из библиотек 20 и 94, 3 согласованные последовательности из библиотек 26 и 99 и 2 из библиотеки 25 выведены и использованы для образования "пептител". "Пептитела" в табл. 7 оценивают, используя протокол ELISA с нейтрализацией, описанный в примере 10 в данном описании. Результаты показаны в табл. 7.

Таблица 7

Зрелые по аффинности Pbs ("пептида") из Con4	hAng-2: Tie2 IC ₅₀ (нМ)	Последовательность "пептида" (Seq Id No:)
Con4-44 (C)	0.09	M-Fc-GGGGGAQ-PIRQEEDWDPWTCEHMWEV-LE (SEQ ID NO: 259)
Con4-40 (C)	0.10	M-Fc-GGGGGAQ-TNQECEWDPWTCDHMPGK-LE (SEQ ID NO: 260)
Con4-4 (C)	0.12	M-Fc-GGGGGAQ-WYEQDACEWDPWTCEHMAEV-LE (SEQ ID NO: 261)
Con4-31 (C)	0.16	M-Fc-GGGGGAQ-NRLQEVCEWDPWTCEHMENV-LE (SEQ ID NO: 262)
Con4-C5 (C)	0.16	M-Fc-GGGGGAQ-AATQECEWDPWTCEHMPRS-LE (SEQ ID NO: 263)
Con4-42 (C)	0.17	M-Fc-GGGGGAQ-LRHQEGCEWDPWTCEHMFWD-LE (SEQ ID NO: 264)
Con4-35 (C)	0.18	M-Fc-GGGGGAQ-VPRQKCEWDPWTCEHMYVG-LE (SEQ ID NO: 265)
Con4-43 (C)	0.18	M-Fc-GGGGGAQ-SISHECEWDPWTCEHMQVG-LE (SEQ ID NO: 266)
Con4-49 (C)	0.19	M-Fc-GGGGGAQ-WAAQECEWDPWTCEHMGRM-LE (SEQ ID NO: 267)
Con4-27 (C)	0.22	M-Fc-GGGGGAQ-TWPQDKCEWDPWTCEHMGST-LE (SEQ ID NO: 268)
Con4-48 (C)	0.26	M-Fc-GGGGGAQ-GHSQECCWDPWTCEHMGTS-LE (SEQ ID NO: 269)
Con4-46 (C)	0.26	M-Fc-GGGGGAQ-QHWQEBCEWDPWTCDHMPSK-LE (SEQ ID NO: 270)
Con4-41 (C)	0.26	M-Fc-GGGGGAQ-NVRQEKCEWDPWTCEHMPVR-LE (SEQ ID NO: 271)
Con4-36 (C)	0.28	M-Fc-GGGGGAQ-KSGQVECNWDPWTCEHMPRN-LE (SEQ ID NO: 272)
Con4-34 (C)	0.28	M-Fc-GGGGGAQ-VKTQEHCDWDPWTCEHMRW-LE (SEQ ID NO: 273)
Con4-28 (C)	0.30	M-Fc-GGGGGAQ-AWGQEGCDWDPWTCEHMLPM-LE (SEQ ID NO: 274)
Con4-39 (C)	0.30	M-Fc-GGGGGAQ-PVNQEDCEWDPWTCEHMPPM-LE (SEQ ID NO: 275)
Con4-25 (C)	0.31	M-Fc-GGGGGAQ-RAPQEDCEWDPWTCAHMDIK-LE (SEQ ID NO: 276)

Con4-50 (C)	0.38	M-Fc-GGGGGAQ-HGQNMECEWDPWTCEHMFY-LE (SEQ ID NO: 277)
Con4-38 (C)	0.40	M-Fc-GGGGGAQ-PRLQEECVWDPWTCEHMPILR-LE (SEQ ID NO: 278)
Con4-29 (C)	0.41	M-Fc-GGGGGAQ-RTTQEEKCEWDPWTCEHMESQ-LE (SEQ ID NO: 279)
Con4-47 (C)	0.44	M-Fc-GGGGGAQ-QTSQEDCVWDPWTCDHMOVSS-LE (SEQ ID NO: 280)
Con4-20 (C)	0.48	M-Fc-GGGGGAQ-QVIGRPCEWDPWTCEHLEGL-LE (SEQ ID NO: 281)
Con4-45 (C)	0.48	M-Fc-GGGGGAQ-WAQEECAWDPWTCDHMOVGL-LE (SEQ ID NO: 282)
Con4-37 (C)	0.49	M-Fc-GGGGGAQ-LPGQEDCEWDPWTCEHMYRS-LE (SEQ ID NO: 283)
Con4-33 (C)	0.52	M-Fc-GGGGGAQ-PMNQVECDWDPWTCEHMPRS-LE (SEQ ID NO: 284)
AC2-Con4 (C)	0.52	M-Fc-GGGGGAQ-FGWSHGCEWDPWTCEHMGST-LE (SEQ ID NO: 285)
Con4-32 (C)	0.75	M-Fc-GGGGGAQ-KSTQDDCDWDPWTCEHMYGP-LE (SEQ ID NO: 286)
Con4-17 (C)	0.96	M-Fc-GGGGGAQ-GPRISTCQWDPWTCEHMDQL-LE (SEQ ID NO: 287)
Con4-8 (C)	1.20	M-Fc-GGGGGAQ-STIGDMCEWDPWTCAHMQVD-LE (SEQ ID NO: 288)
AC4-Con4 (C)	1.54	M-Fc-GGGGGAQ-VLGGQGCEWDPWTCRLQGW-LE (SEQ ID NO: 289)
Con4-1 (C)	2.47	M-Fc-GGGGGAQ-VLGGQGCQWDPWTCSHLEDG-LE (SEQ ID NO: 290)
Con4-C1 (C)	2.75	M-Fc-GGGGGAQ-TTIGSMCEWDPWTCAHMQGG-LE (SEQ ID NO: 291)
Con4-21 (C)	3.21	M-Fc-GGGGGAQ-TKGKSVQWDPWTCSHMQSG-LE (SEQ ID NO: 292)
Con4-C2 (C)	3.75	M-Fc-GGGGGAQ-TTIGSMCQWDPWTCAHMQGG-LE (SEQ ID NO: 293)
Con4-18 (C)	4.80	M-Fc-GGGGGAQ-WVNEVVCEWDPWTCHWDTP-LE (SEQ ID NO: 294)
Con4-19 (C)	5.76	M-Fc-GGGGGAQ-VVQVGMQWDPWTCKHMLQ-LE (SEQ ID NO: 295)
Con4-16 (C)	6.94	M-Fc-GGGGGAQ-AVGSQTCEWDPWTCAHLEV-LE (SEQ ID NO: 296)
Con4-11 (C)	9.70	M-Fc-GGGGGAQ-QGMKMFCEWDPWTCAHIVYR-LE (SEQ ID NO: 297)
Con4-C4 (C)	9.80	M-Fc-GGGGGAQ-TTIGSMCQWDPWTCEHMQGG-LE (SEQ ID NO: 298)
Con4-23 (C)	9.88	M-Fc-GGGGGAQ-TSQRVGCWDPWTCQHLTYT-LE (SEQ ID NO: 299)
Con4-15 (C)	15.00	M-Fc-GGGGGAQ-QWSWPPCEWDPWTCQTVWPS-LE (SEQ ID NO: 300)
Con4-9 (C)	20.11	M-Fc-GGGGGAQ-GTSPFCQWDPWTCSHMQVQ-LE (SEQ ID NO: 301)
Con4-10 (C)	86.61	M-Fc-GGGGGAQ-TQGLHQCEWDPWTCKVLWPS-LE (SEQ ID NO: 302)
Con4-22 (C)	150.00	M-Fc-GGGGGAQ-VWRSQVCWDPWTCNLGGDW-LE (SEQ ID NO: 303)
Con4-3 (C)	281.50	M-Fc-GGGGGAQ-DKILEECQWDPWTCQFFYGA-LE (SEQ ID NO: 304)

Con4-5 (C)	No Inhibition	M-Fc-GGGGGAQ-ATFARQCQWDPWTCALGGNW-LE (SEQ ID NO: 305)
Con4-30 (C)	No Inhibition	M-Fc-GGGGGAQ-GPAQEECEWDPWTCEPLPLM-LE (SEQ ID NO: 306)
Con4-26 (C)	No Inhibition	M-Fc-GGGGGAQ-RPEDMCSQWDPWTWHLQGYC-LE (SEQ ID NO: 307)
Con4-7 (C)	No Inhibition	M-Fc-GGGGGAQ-LWQLAVCQWDPQTCDHMGAL-LE (SEQ ID NO: 308)
Con4-12 (C)	No Inhibition	M-Fc-GGGGGAQ-TQLVSLCEWDPWTCRLLDGW-LE (SEQ ID NO: 309)
Con4-13 (C)	No Inhibition	M-Fc-GGGGGAQ-MGGAGRCWDPWTCQLLQGW-LE (SEQ ID NO: 310)
Con4-14 (C)	No Inhibition	M-Fc-GGGGGAQ-MFLPNÉCQWDPWTCSNLPEA-LE (SEQ ID NO: 311)
Con4-2 (C)	No Inhibition	M-Fc-GGGGGAQ-FGWSHGCEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 312)
Con4-6 (C)	No Inhibition	M-Fc-GGGGGAQ-WPQTEGCQWDPWTCRLLHGW-LE (SEQ ID NO: 313)
Con4-24 (C)	No Inhibition	M-Fc-GGGGGAQ-PDTRQGCQWDPWTCRLYGMW-LE (SEQ ID NO: 314)
AC1-Con4 (C)	No Inhibition	M-Fc-GGGGGAQ-TWPQDKCEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 315)
AC3-Con4 (C)	No Inhibition	M-Fc-GGGGGAQ-DKILECEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 316)
AC5-Con4 (C)	No Inhibition	M-Fc-GGGGGAQ-AATQEECEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 317)
Зрелые по аффинности Pbs ("пептида") из L1	hAng-2: Tie2 IC ₅₀ (нМ)	Последовательность "пептида" (Seq Id No:)
L1-7 (N)	0.03	MGAQ-TNFMPMDDLEQRLYEQFILQQG-LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 318)
AC6-L1 (N)	0.03	MGAQ-TNYKPLDELDATLYEHWLQHS-LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 319)
L1-15 (N)	0.04	MGAQ-QKYQPLDELDKTLTDQFMLQQG-LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 320)
L1-2 (N)	0.04	MGAQ-LNFTPLDELEQTLYEQWTLQQS-LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 321)
L1-10 (N)	0.05	MGAQ-QKFQPLDELEQTLYEQFMLQQA-LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 322)
L1-13 (N)	0.05	MGAQ-QEYEPDELDETLYNQWMFHQR-LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 323)
L1-5 (N)	0.05	MGAQ-VKYKPLDELDEILYEQQTQER-LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 324)
L1-C2 (N)	0.05	MGAQ-TKFQPLDELDQTLYEQWTLQQR-LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 325)
L1-C3 (N)	0.06	MGAQ-TNQPLDELDQTLYEQWTLQQR-LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 326)
L1-11 (N)	0.07	MGAQ-QNFKPMDELEDTLKQFLFQHS-LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 327)

L1-17 (N)	0.08	MGAQ-VKYKPLDELDEWLYHQFTLHHQ LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 328)
L1-12 (N)	0.08	MGAQ-YKFTPLDDLEQTLYEQWTLQHV LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 329)
L1-1 (N)	0.08	MGAQ-QNYKPLDELDATLYEHFIFHYT LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 330)
L1-4 (N)	0.08	MGAQ-VKFKPLDALEQTLYEHWMFQQA LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 331)
L1-20 (N)	0.09	MGAQ-EDYMPDLALDAQLYEQFILLHG LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 332)
L1-22 (N)	0.09	MGAQ-YKFNPMDELEQTLYEEFLFQHA LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 333)
L1-14 (N)	0.11	MGAQ-SNFMPLDELEQTLYEQFMLQHQ LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 334)
L1-16 (N)	0.11	MGAQ-QKFQPLDELEETLYKQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 335)
L1-18 (N)	0.16	MGAQ-QKFMPLDELDEILYEQFMFQQS LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 336)
L1-3 (N)	0.16	MGAQ-TKFNPLDELEQTLYEQWTLQHQ LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 337)
L1-21 (N)	0.17	MGAQ-HTFQPLDELEETLYYQWLYDQL LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 338)
L1-C1 (N)	0.56	MGAQ-QKFKPLDELEQTLYEQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 339)
L1-19 (N)	1.26	MGAQ-QTFQPLDDLEEYLYEQWIRRYH LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 340)
L1-9 (N)	1.62	MGAQ-SKFKPLDELEQTLYEQWTLQHA LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 341)
Зрелые по аффинности Pbs ("пептида") из Con1	hAng-2: Tie2 IC₅₀ (нМ)	Последовательность "пептида" (Seq Id No:)
Con1-4 (C)	1.68	M-Fc-GGGGGAQ-SGQLRPCIEIRGCGTQNLAL-LE (SEQ ID NO: 342)
Con1-1 (C)	3.08	M-Fc-GGGGGAQ-AGGMRPYDGMLGWPNYDVQA-LE (SEQ ID NO: 343)
Con1-6 (C)	8.60	M-Fc-GGGGGAQ-GQDLRPCEDMFGCGTKDWYG-LE (SEQ ID NO: 344)
Con1-3 (C)	16.42	M-Fc-GGGGGAQ-APGQRPYDGMLGWPTYQRIV-LE (SEQ ID NO: 345)
Con1-2 (C)	No Inhibition	M-Fc-GGGGGAQ-QTWDDPCMHLGPVTWRRCI-LE (SEQ ID NO: 346)
Con1-5 (C)	No Inhibition	M-Fc-GGGGGAQ-FGDKRPLECMFGGPIQLCPR-LE (SEQ ID NO: 347)
Parent: Con1 (C)	26.00	M-Fc-GGGGGAQ-KRPCIEIFGGCTYQ-LE (SEQ ID NO: 348)

Зрелые по аффинности Pbs ("пептитела") из 12-9	hAng-2:Tie2 IC ₅₀ (нМ)	Последовательность "пептитела" (Seq Id No:)
12-9-3 (C)	0.81	M-Fc-GGGGGAQ-LQEWCEGVDPFTFGCEKQR-LE (SEQ ID NO: 349)
12-9-7 (C)	0.93	M-Fc-GGGGGAQ-MLDYCEGMDDPFTFGCDKQM-LE (SEQ ID NO: 350)
12-9-6 (C)	0.95	M-Fc-GGGGGAQ-HQEYCEGMEDPFTFGCEYQG-LE (SEQ ID NO: 351)
12-9-C2 (C)	1.41	M-Fc-GGGGGAQ-LQDYCEGVDPFTFGCENQR-LE (SEQ ID NO: 352)
12-9-5 (C)	1.56	M-Fc-GGGGGAQ-LLDYCEGVQDPFTFGCENLD-LE (SEQ ID NO: 353)
12-9-1 (C)	1.84	M-Fc-GGGGGAQ-GFEYCDGMEDPFTFGCDKQT-LE (SEQ ID NO: 354)
12-9-4 (C)	2.05	M-Fc-GGGGGAQ-AQDYCEGMEDPFTFGCEMQK-LE (SEQ ID NO: 355)
12-9-C1 (C)	2.68	M-Fc-GGGGGAQ-LQDYCEGVDPFTFGCEKQR-LE (SEQ ID NO: 356)
12-9-2 (C)	8.42	M-Fc-GGGGGAQ-KLEYCDGMEDPFTQGCDNQS-LE (SEQ ID NO: 357)
Parent: 12-9 (C)	15.00	M-Fc-GGGGGAQ-FDYCEGVDPFTFGCDNH-LE (SEQ ID NO: 358)

Пример 9.

Шесть примеров анти-Ang2 "пептител" испытывают на активность связывания с huAng2 (R&D Systems, BNO12103A) на BIAcore. Протеин G иммобилизуют на CM5 датчике в соответствии со стандартным протоколом взаимодействия амина (BIAcore Inc.), а "пептитела" затем инъецируют через поверхность протеина G для захвата (RL ~ 100 Ru). Для испытания связывания между huAng2 и захваченным "пептителом" 0,3-40 нМ huAng2 инъецируют через поверхности захваченных "пептител" и отражающие связывание показания датчиков анализируют, используя программу BIAevaluation (BIAcore Inc.). В табл. 8 суммированы результаты этого эксперимента.

Таблица 8

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

Пример 10. Нейтрализационный метод ELISA.

Кондиционированные среды человеческого, мышинного, суно и крысиного Ang-2 и человеческого и мышинного Ang-1 разводят в DMEM/50 мкг/мл BSA следующим образом: hAng-2-1:64 разведение; mAng-2-1:64 разведение; крысиный Ang-2-без разведения; суно Ang-2-1:32 разведение; hAng-1-1:4 разведение; и mAng-1-1:4 разведение.

Степень разведения каждой из этих кондиционированных сред определяют по их способности связываться с 1 нМ hTie2-Fc (при условии, что в молекуле Tie-2-Fc область Tie-2 содержит только растворимый внеклеточный домен молекулы; R&D Systems, номер в каталоге 313 TI) с величиной 50% максимально достижимого связывания (т.е плато). Микротитрационные планшеты покрывают с помощью 100 мкл разведённых кондиционированных сред. Для Ang-2 по нейтрализационному методу ELISAs возможные анти-Ang-2 "пептитела" (кандидаты) титруют от 2,5 нМ до 0,015 пМ в четырёхкратных разведениях в растворе PBS, содержащем около 1% BSA и около 1 нМ Tie-2 (при условии, что в молекуле Tie-2-Fc область Tie-2 содержит только растворимый внеклеточный домен молекулы; R&D Systems, номер в каталоге 313 TI). Для Ang-1 нейтрализационного ELISAs, возможные (кандидаты) анти-Ang-2 "пептитела"

титруют от 1000 нМ до 0,2 пМ в четырёхкратных разведениях в растворе PBS, содержащем около 1% BSA и около 1 нМ Tie-2 (при условии, что в молекуле Tie-2-Fc область Tie-2 содержит только растворимый внеклеточный домен молекулы; R&D Systems, номер в каталоге 313 TI).

После добавления примерно 100 мкл раствора "пептитела"/Tie-2 в каждую лунку планшеты инкубируют в течение ночи при комнатной температуре, а затем отмывают 5 раз в PBS, содержащем около 0,1% Tween-20. После отмывания добавляют около 100 мкл на лунку анти-Tie-2 антитела (Pharmingen Inc., catalog #557039) до примерной конечной концентрации 1 мкг/мл и планшеты инкубируют около 1 ч при комнатной температуре. Далее около 100 мкл/лунка антитела козы против мышиного IgG-HRP (Pierce Chemical Co., catalog #31432) добавляют в разведении 1:10000 в PBS, содержащем около 1% BSA.

Планшеты инкубируют при комнатной температуре примерно 1 ч, после чего их отмывают 5 раз PBS, содержащем около 0,1% Tween-20. Затем добавляют в каждую лунку по 100 мкл субстрата TMB (SIGMA, catalog # T8665) и ожидают появления голубого цвета. Затем на спектрофотометре (ридере) прочитывают оптическую плотность при 370 нм. Результаты представлены в табл. 9, см. ниже.

Таблица 9

Опосредуемая "пептителом" нейтрализация взаимодействий ангиопозтин:Tie2

	hAng-2	mAng-2	rAng-2	cAng-2	hAng-1	mAng-1
Пептитело	IC₅₀ (нМ)	IC₅₀ (нМ)	IC₅₀ (нМ)	IC₅₀ (нМ)	IC₅₀ (нМ)	IC₅₀ (нМ)
2xCon4 (C)	0.026	0.035	0.024	0.047	3.0	3.2
Con4 (C)	0.197	0.289	0.236	0.540	200	300
Con4-44 (C)	0.08	0.16	0.22	----	43	----
Con4-40 (C)	0.20	0.27	0.35	----	>1000	----
L1-7 (N)	0.046	0.063	0.035	0.108	>1000	>1000
L1-10 (N)	0.06	0.06	0.06	----	>1000	----

Пример 11.

Дизайн исследования.

Самцов мышей CD-1 весом 20-30 г произвольно разделяют на группы, получающие определённые "пептитела" (2xCon4-C, L1-7-N и L1-21-N). Животным вводят разовую IV (в.в.) болюсную (n=38/группа) или разовую SC (подкожную) инъекцию 50 мкг "пептитела" (n=34/группа). Инъекции делают в хвостовую вену и под кожу в плечо для IV и SC введения соответственно.

Отбор проб крови и аналитические методы.

Пробы крови отбирают для измерения каждой концентрации анти-Ang-2 "пептитела" перед введением дозы и через 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 216, 264, 312 и 336 ч после введения для SC и IV (в.в.) групп. Дополнительные пробы отбирают через 5 и через 30 мин для IV групп. Одновременно берут пробу крови у двух животных и по окончании отбора проб животных умерщвляют. Кровь (примерно 0,50 мл) отбирают пункцией перикарда в полипропиленовые пробирки Микротейнер® для сепарации сыворотки. Пробы хранят на льду примерно 20 или до образования сгустка. Сыворотку отделяют от образца крови центрифугированием в течение примерно 10 мин при 2-8°C и хранят примерно при -70°C до момента анализа. Измерение в образцах проводят методом флуоресценции с разрешением по времени (TRF) с нижним пределом квантификации (LLOQ) 100 нг/мл. Микротитрационные планшеты NUNC fluoroMaxisorp покрывают рекомбинантным мышинным белком Ang-2. Затем планшеты блокируют раствором белка с целью уменьшить неспецифическое связывание. Эталонные образцы, образцы для качественного контроля и неизвестные образцы готовят в 10% буфере для анализа мышинной сыворотки и пипеткой вносят в лунки микротитрационных планшетов. "Пептитела" специфически связываются с иммобилизованным Ang-2. После отмывания всех несвязанных веществ (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.) в лунки добавляют биотинилированное моноклональное антитело козы к человеческому IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.). После стадии отмывания для удаления всех несвязанных биотинилированных моноклональных антител в лунки добавляют стрептавидин, меченый европием, связанный европий выделяют из стрептавида с помощью кислого раствора, пипеткой вносимого в каждую лунку. Сигнал флуоресценции получают и читают на флуорометрическом ридере Wallac. Анти-Ang-2 "пептитело" анализируют в интервале 0,078-5 мкг/мл.

Фармакокинетический анализ.

Сложные средние данные зависимости концентрация-время для каждой группы анализируют с помощью "некомпарментального" анализа, используя WinNonlin Professional (Version 3.3; Pharsight Crp., Mountain View, CA). Для PK анализа используют номинальное время выборки, так образцы отбирают в течение 10% номинального времени. Всем концентрациям ниже LLOQ перед PK анализом задают нулевые значения. Рассчитывают следующие PK параметры.

Конечный период полужизни ($t_{1/2}$) рассчитывают как $t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_{el}}$, где k_{el} обозначает константу конечной скорости первого порядка, рассчитываемой по уравнению линейной регрессии конечной фазы log-линейного затухания.

Область (площадь поверхности) под кривой концентрация в сыворотке-время ($AUC_{(0-last)}$) рассчитывают по линейному/log методу трапеций от времени 0 до last, времени последней поддающейся расчёту концентрации (C_{last}).

Область (площадь поверхности) под кривой от 0 бесконечности ($AUC_{(0-\infty)}$) рассчитывают как сумму значений соответствующего $AUC_{(0-last)}$ и предсказанного C_{last}/k_{el} :

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

Абсолютную биодоступность (F) после SC введения рассчитывают как

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

Результаты представлены на фиг. 2.

Пример 12.

Самкам бестимусных ("голых") мышей инъецируют подкожно 1×10^7 A431 клеток в день исследования 0. В день 3 Ang-2 "пептитело" 2xCon4-C вводят подкожно в дозе 200 мкг/мышь/день. Через регулярные временные интервалы регистрируют объёмы опухолей и вес тела, как показано на фигуре. Наблюдают заметное различие роста опухоли между группой, получающей Ang-2 "пептитело", относительно группы, получающей в качестве контроля носитель, и группы, получающей контрольное "пептитело", ($p < 0,0001$ по сравнению (vs) с каждой контрольной группой при использовании повторного измерения ANOVA, с post hoc (последующим) тестом Шеффе (Scheffe)). Лечение этим "пептителом" не оказывает значительного влияния на вес тела. Результаты представлены на фиг. 3.

Пример 13. Кривая роста A431 In vitro.

Клетки A431 засевают в 96-луночные планшеты для тканевых культур, по 2000 клеток в лунке, в 200 мкл среды DMEM, дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS). Через 16 ч после посева среду отсасывают. Затем в лунки добавляют следующее (и устанавливают в тройном повторе): 100 мкл/лунка DMEM, 10% FBS, 1 мг/мл негативного контрольного "пептитела" 4883 или "пептитела" TN8-Con4. Такие же комплекты повторяют на 5 планшетах. Среду из одного планшета отсасывают через 24, 48, 72, 96 и 120 ч после обработки. Затем добавляют 100 мкл 10% трихлоруксусной кислоты (TCA) на лунку и планшеты хранят при 4°C. Всё содержимое планшетов собирают, когда 10% TCA находится в последнем планшете, как минимум, 4 ч. 10% TCA отбрасывают и лунки промывают 5 раз водопроводной водой. Затем клетки окрашивают с помощью 100 мкл 0,4% сульфородамина В (Sigma S-9012) в 1% уксусной кислоте (Sigma A-6283) в течение 10 мин при комнатной температуре, а затем 5 раз отмывают 1% уксусной кислотой. Затем планшеты сушат на воздухе. Краситель солибилизируют, используя 300 мкл 20 mM незабуференного Tris (pH>10) в течение 2 ч на роторном шейкере. Затем прочитывают оптическую плотность (OD) при 540 нм на ридере для микротитрационных планшетов. Результаты представлены на фиг. 4.

Пример 14.

Самкам "голых" мышей подкожно инъецируют 2×10^6 клеток Colo-205 плюс Матригель (2:1) в день исследования 0. С дня 3 Ang-2 "пептитела" L1-7-N, L1-21-N, Con4-C и 2xCon4-C вводят подкожно в дозе 14 мкг/мышь, дважды в неделю. Антитело против Ang-2 Ab536, 47 мкг/мышь, трижды в неделю вводят в качестве позитивного контроля. Через регулярные временные интервалы регистрируют объёмы опухолей и вес тела.

Наблюдают заметное различие роста опухоли между каждой из групп, получающих Ang-2 "пептитело", по сравнению с группой, получающей в качестве контроля носитель, и группой, получающей контрольное "пептитело", ($p < 0,0001$ по сравнению (vs) с каждой контрольной группой при использовании повторного измерения ANOVA, с post hoc (последующим) тестом Шеффе (Scheffe)). Лечение этими "пептителами" не оказывает значительного влияния на вес тела (результаты не показаны). Результаты представлены на фиг. 5.

Пример 15.

Самкам "голых" мышей подкожно инъецируют 2×10^6 Colo-205 клеток плюс Матригель (2:1) в день исследования 0. Начиная со дня 3, Ang-2 "пептитело" 2xCon4-C вводят подкожно в дозах 14, 2,8 и 0,56 мкг/мышь, дважды в неделю. Объёмы опухолей и вес тела записывают через регулярные интервалы, как показано. Наблюдают значительную разницу в росте опухоли между группой, получающей две наивысшие дозы Ang-2 "пептитела", и группами, получающими в качестве контроля носитель и контрольное "пептитело" ($p = 0,003$ для промежуточной дозы и $p < 0,0001$ для высокой дозы, при использовании повторного измерения ANOVA, с post hoc (последующим) тестом Шеффе (Scheffe)). Лечение этими "пептителами" не оказывает значительного влияния на вес тела. Пунктирной линией показано уменьшение общего n группы с 10 до 9 вследствие смерти одной из мышей по неизвестным причинам. Результаты представлены на

фиг. 6.

Пример 16.

Анти-Ang-2 "пептитела" против ксенотрансплантатов опухолей Colo-205.

Самкам "голых" мышей подкожно инъецируют 2×10^6 клеток Colo-205 плюс Матригель (2:1) в день исследования 0. С дня 3 Ang-2 "пептитела" 2хCon4-С или контрольное "пептитело" вводят подкожно в дозе 350 мкг/день. Опухоли из групп, получавших контрольное "пептитело" (как описано в табл. 5), собирают либо в день 14 (контроль по размеру) или в день 18 (контроль по времени). Затем в день 18 собирают опухоли в группе, получающей 2хCon4(С). Через регулярные временные интервалы регистрируют объёмы опухолей, как показано. Наблюдают заметное различие роста опухоли между групп контроля по времени и группой, получающей в качестве контроля носитель, и группой, получающей 2хCon4-С, ($p=0,0154$ при использовании повторного измерения ANOVA, с post hoc (последующим) тестом Шеффе (Scheffe)). Лечение этими "пептителами" не оказывает значительного влияния на вес тела.

Опухоли, приготовленные для анализа изображений, рассекают коронально на две половины и одну половину быстро замораживают в OCT (Sakura Finetek USA Inc., Torrance, CA). Кriosрезы окрашивают иммуногистохимически, используя CD31 против иммуноглобулинов мыши (catalogue #553370, BD Pharmingen, San Diego, CA) по 2 мкг/мл, с DAB в качестве хромогена. Делают цифровые фотографии срезов опухолей объективом с увеличением 20X. Захватывают четыре поля по "компасным румбам", по десять опухолей на обрабатываемую группу. Систему анализа изображений MetaMorph (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA) применяют, чтобы увидеть (отразить) в изображении окрашенные CD31 кровеносные сосуды. Площадь CD31-позитивного окрашивания выражают в виде отношения к общей площади опухолевой ткани внутри каждого поля. Результаты представлены на фиг. 7.

Пример 17.

Самкам "голых" мышей подкожно инъецируют 2×10^6 Colo-205 клеток плюс Матригель (2:1) в день исследования 0. Лечение с помощью подкожного введения дважды в неделю 350 мкг/мышь Ang-2 "пептитела" 2хCon4-С или эквивалентного контрольного "пептитела" начинают в день исследования 3, 10 или 15. Объёмы опухолей и вес тела записывают через регулярные интервалы. Наблюдают значительную разницу в росте опухоли между всеми группами, получающими Ang-2 "пептитело", и группой, получающей в качестве контроля носитель ($p=0,089$ для группы, начавшей получать "пептитело" в день 15, и $p<0,0001$ для групп, начавших лечение в дни 3 и 10, при использовании повторного измерения ANOVA, с post hoc (последующим) тестом Шеффе (Scheffe)). Лечение этими "пептителами" не оказывает значительного влияния на вес тела. Результаты представлены на фиг. 8 (вес тела не показан).

Пример 18.

Резюме скоростей объективных ответов (CR) получают, используя антитело Ab536 в количестве 47 мкг/самка "голой" мыши, вводимое интраперитонеально 3 раза в неделю, или "пептитело" 2хCon4(С), вводимое подкожно по схемам многократного введения в исследованиях различной длительности (время введения доз ≥ 10 недель), обоим, A431 и Colo-205, моделям ксенотрансплантатов. CR по данному описанию относится к результату, когда после лечения не остаётся определяемой (измеряемой) опухоли. Результаты представлены на фиг. 9.

Пример 19.

а) Комбинация Pb ("пептитела") с Таксотером на Colo-205 опухолевой модели.

Самкам "голых" мышей подкожно инъецируют 2×10^6 Colo-205 клеток плюс Матригель (2:1) в день исследования 0. В день исследования 14 начинают лечение с помощью а) подкожного (s.c.) введения дважды в неделю 350 мкг/мышь Ang-2 "пептитела" 2хCon4-С; б) 20 мг/кг Таксотера по схеме qwx3 i.p.; или с) их комбинации. Объёмы опухолей и вес тела записывают через регулярные интервалы. Наблюдают значительную разницу в росте опухоли между всеми группами и группой, получающей в качестве контроля носитель ($p<0,0001$ при использовании повторного измерения ANOVA, с post hoc (последующим) тестом Шеффе (Scheffe)). Помимо этого, группа с комбинированной терапией значительно отличается от любой из групп с монотерапией ($p<0,0001$ vs. 2хCon-4-С и $p=0,0122$ vs. Таксотера). Пунктирной линией показано уменьшение n группы, с 10 до 9 мышей, вследствие смерти одной из мышей по неизвестной причине. Лечение этими "пептителами" не оказывает значительного влияния на вес тела. Результаты представлены на фиг. 10а.

б) Комбинация Pb с 5-FU на Colo-205 опухолевой модели.

Самкам "голых" мышей подкожно инъецируют 2×10^6 Colo-205 клеток плюс Матригель (2:1) в день исследования 0. В день исследования 14 начинают лечение с помощью а) подкожного (s.c.) введения дважды в неделю 350 мкг/мышь Ang-2 "пептитела" 2хCon4-С; б) 50 мг/кг 5-FU по схеме qwx5 i.p.; или с) их комбинации. Объёмы опухолей и вес тела записывают через регулярные интервалы.

Наблюдают значительную разницу в росте опухоли между всеми группами и группой, получающей в качестве контроля носитель ($p<0,0001$ при использовании повторного измерения ANOVA, с post hoc (последующим) тестом Шеффе (Scheffe)). Помимо этого, группа с комбинированной терапией значительно отличается от любой из групп с монотерапией ($p=0,0375$ vs. 2хCon-4-С и $p=0,0453$ vs. 5-FU). Временное снижение веса тела наблюдают в группе 5-FU (18% в день исследования 20), а также в группе с

комбинированной терапией (16% в день исследования 20), с последующим полным восстановлением веса тела. Результаты представлены на фиг. 10b.

Пример 20.

Модель адьювантного артрита.

Самцов крыс Льюиса (120-130 г, Charles River, Wilmington MA) помещают по двое в клетку с дверцей-фильтром в комнате с регулируемой окружающей средой (температура $23 \pm 2^\circ\text{C}$, относительная влажность $50 \pm 20\%$) с соблюдением цикла с 12-часовым световым днём. Животным дают корм для грызунов (Рецептура 8640; Тек Lab, Madison, WI) и отфильтрованную водопроводную воду ad libitum (по желанию). Содержание кальция и фосфора в пище составляет 1,2 и 1,0% соответственно.

Адьювантный артрит вызывают разовой инъекцией 0,5 мг термоинактивированных *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco Laboratories, Detroit, MI), суспендированных в 0,05 мл парафинового масла (Crescent Chemical Co., Nauppaug, NY), интрадермально в основание хвоста. Клиническое начало артрита наступает в день 9, на что указывает опухание задней лапы и трудности с передвижением. За исключением группы, получающей 2хCon4(с) (которая начинает получать это "пептитело" с 1 дня после иммунизации), препараты вводят в виде ежедневных подкожных инъекций, начиная с дня 9 после иммунизации (до начала артрита), и продолжают давать вплоть до дня 18.

Клинический мониторинг адьювантного артрита.

Прогрессирование воспаления оценивают клинически, периодически измеряя объём задней лапы методом "водной" плетизмографии, описанным Feige et al., Cellular Molec. Life Sci., 57:1457-1470 (2000). Подавление воспаления лапы рассчитывают, исходя их площади под кривой (AUC) в соответствии с правилом трапеций по формуле:

$$[1 - \{(\text{Обработан. AdA-норм.}) / (\text{Необработан. AdA-норм.})\}] \times 100$$

Кроме того, ежедневно в течение 9-дневного введения препарата (по схеме) в качестве дополнительного параметра (концевой точки), так как показано, что потеря веса тела идёт параллельно прогрессированию воспаления суставов в этой модели артрита. Животных умерщвляют в атмосфере CO_2 на 18 день.

Снижение минеральной плотности костей (BMD) изучают при аутопсии (18 день после иммунизации). Задние лапы удаляют по линии шерсти (непосредственно рядом с голеностопным (скакательным) суставом), погружают в 70% этанол, а затем сканируют в горизонтальном направлении на веерном рентгеновском денситометре (Model QDR-4500A; Hologic, Waltham, MA). См. выше Feige et al. После сканирования прямоугольный корпус (29×25 мм), центрированный по пяточной кости, позиционируют так, чтобы очертить ("оконтурить") анализируемый участок, и с помощью соответствующих алгоритмов (программное обеспечение Hologic) рассчитывают площадь кости, минеральное содержание костей и минеральную плотность костей.

Все результаты выражают как среднее $\pm$ стандартная ошибка. Значение $p < 0,05$ используют, чтобы описать значительные различия между группами. Тест Kruskal-Wallis ANOVA и Mann-Whitney U. тест, использующий промышленное статистическое программное обеспечение (Statsoft v3.0; Statsoft, Tulsa, OK) проводят, используя клинические данные (непрерывные переменные).

Результаты представлены на фиг. 11a, 11b и 11c соответственно.

Пример 21.

Модель ангиогенеза в роговице.

Влияние CON4(C) на VEGF-индуцированный ангиогенез у крыс.

Ang-2 "пептитело" CON4(C) оценивают на модели ангиогенеза у крыс. Ангиогенез вызывают, имплантируя намоченный в VEGF- (или в BSA-контрольный) нейлоновый диск в строму роговицы ($n=8/\text{группа}$). "Пептитело" TN8CON4-C вводят в виде подкожной инъекции в дозе 1,0 или 0,1 мг крыса/день в течение 7 дней. Двум другим группам животных дают ту же дозу негативного контрольного "пептитела" 4883. Всем группам предварительно дают разовую ударную дозу 3,0 или 0,3 мг, что в 3 раза выше поддерживающей дозы 1,0 или 0,1 мг (см. фигуру). Через 7 дней лечения на каждом цифровом изображении роговицы глаза крыс определяют две васкулярные концевые точки; число сосудов, пересекающих среднюю точку (центр) между диском и лимбом, и площадь кровеносных сосудов, лечение с помощью TN8CON4-C заметно подавляет VEGF-индуцированный ангиогенез в зависимости от дозы ($p < 0,04$), тогда как введение контрольного "пептитела" не оказывает заметного влияния ни на одну концевую точку. Вес тела пролеченных животных не свидетельствует о токсичности. Результаты представлены на фиг. 12.

Пример 22. Эпитопное картирование.

Полноразмерные (аминокислоты 1-495) N-концевые (аминокислоты 1-254) и C-концевые (аминокислоты 255-495) человеческие Ang-2 (hAng-2) белки клонируют в CMV-контролируемый вектор экспрессии млекопитающих с C-концевыми 6xHis хвостами. Три полученных в результате конструкции плюс элемент контроля вектора транзитивно экспрессируют в клетки 293T. Затем из трансфицированных клеток собирают кондиционированную среду и оценивают уровень Ang-2 в средах методом анти-6xhis ELISA и Вестерн-блоттингом.

Связывающий эпитоп антител против Ang-2 и "пептител" определяют по их способности связываться с тремя вариантами человеческого hAng-2 методом ELISA в соответствии со следующим протоколом: 96-луночный аналитический планшет с высоким связыванием покрывают 100 мкл кондициониро-

ванной среде на лунку и инкубируют при 37°C в течение 1 ч. Кондиционированные среды отсасывают и планшет блокируют с помощью 200 мкл/лунка 5% BSA в PBS при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем отсасывают блокирующий раствор. Добавляют 100 мкл/лунка антитела, "пептитела" или Tie2-Fc количестве 1 мкг/мл в 1% BSA в PBS и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч. Лунки 4 раза отмывают в 200 мкл 0,1% Tween в PBS. Добавляют 100 мкл/лунка HRP-конъюгированного антитела козы к человеческому IgG или антитела козы к мышиному IgG и инкубируют в течение 45 мин при комнатной температуре. Затем лунки 4 раза отмывают в 200 мкл 0,1% Tween в PBS. Далее добавляют 100 мкл/лунка субстрат TMB. OD. прочитывают при 370 нм. Результаты представлены на фиг. 13a, 13b и 13c.

Пример 23.

Вследствие некоторых ограничений, связанных с чувствительностью, присущей методу анализа BicaCore, аффинность связывания определяют методом анализа Sepidyne KinExA.

Связывание 2хCON4-С (Pb5714) с huAng-2 проверяют на KinExA (Sapidyne, Boise, ID). Бусы Reacti-Gel 6х (Pierce, Rockford, IL) предварительно покрывают huAng-2 и блокируют BSA. Образцы 10 и 30 пМ 2хCON4-С инкубируют с различными концентрациями (0,3 пМ - 3 нМ) huAng-2 при комнатной температуре в течение 8 ч прежде, чем пропустить их через покрытые huAng-2 бусы. Количество связанного с бусами "пептитела" определяют с помощью меченого флуоресцентной (Cy5) меткой антитела козы против человеческого Fc антитела (Jackson Immuno Research, West Grove, PA). Сигнал (его интенсивность) связывания пропорционален концентрации свободного "пептитела" в равновесном состоянии.

Константу равновесной диссоциации (K_D) определяют нелинейной регрессией конкурентных кривых, применяя односайтовую гомогенную модель связывания по двум кривым (программное обеспечение KinExTM). Затем определяют, что K_D составляет, примерно, 2 пМ для связывания 2хCON4-С с huAng-2.

Как видно на фиг. 14, методом KinExA показано, что аффинность "пептитела" 2хCON4 к huAng-2 составляет ~2 пМ.

Пример 24.

ПЭГированные пептиды.

L1-7 пептид синтезируют в 431 ABI синтезаторе по стандартному протоколу связывания и двойного связывания остатка 14 (met) с N-концевым остатком 1 (Cys), нумерация идёт от N-конца к C-концу.

Конъюгация L1-7 пептида с метоксиполи(этиленгликоль)малеинимидом; синтез конъюгата с MW: 5 КДа; обозначенного "mPEG5K-(L1-7 Peptide)".

Раствор 0,8 мг L1-7 пептида в 400 мкл буфера 1 (20 mM фосфата, 5 mM EDTA, pH 6,5) обрабатывают 13,5 мг метоксиполи(этиленгликоль)малеинимида (MW = 5 КДа; Shearwater Corp.); 0,27 мл раствора с концентрацией 50,0 мг/мл в буфере 1. Реакционную смесь инкубируют при 4°C в течение ночи, затем разводят в 1,6 мл буфера А (20 mM Tris гидрохлорида, pH 7,2) и подвергают диализу в кассете Slide-A-Lyzer (3500 MWCO, Pierce) против того же буфера. Диализованную реакционную смесь очищают ионообменной хроматографией на колонке 1,0 мл HiTrap Q Sepharose HP (Amersham Biosciences Corp.). Пик продукта элюируют в виде двух фракций по 1,0 мл в градиенте от 100% буфера А до 100% буфера В (буфер А + 0,5M NaCl) в объёме, равном 40 объёмам колонки. Объединённые фракции с продуктом упаривают до 250 мкл с содержанием 0,23 мг белка/мл в центрифуге Microsep 1K Centrifugal Device (Pall Life Sciences).

Конъюгация L1-7 пептида с 1,11-бисмалеинимидотетраэтиленгликолем; синтез конъюгата, обозначенного "PEO4(L1-7 Peptide)".

Раствор 1,0 мг of L1-7 пептида в 500 мкл буфера 1 (20 mM фосфата, 5 mM EDTA, pH 6,5) обрабатывают 0,0375 мг 1,11-бисмалеинимидотетраэтиленгликолем (Pierce) (0,375 мл раствора 0,1 мг/мл в буфере 1). Реакционную смесь инкубируют при 4°C в течение 3,33 ч, затем подвергают диализу в кассете Slide-A-Lyzer (3500 MWCO, Pierce) против буфера А (20 mM Tris гидрохлорида, pH 7,2). Диализованную реакционную смесь очищают ионообменной хроматографией на колонке 1,0 мл HiTrap Q Sepharose HP (Amersham Biosciences Corp.). Пик димерного продукта элюируют в виде трёх фракций по 1,0 мл в градиенте от 100% буфера А до 100% буфера В (буфер А + 0,5 M NaCl) в объёме, равном 40 объёмам колонки. Объединённые фракции с продуктом упаривают до 550 мкл с содержанием 0,12 мг белка/мл в центрифуге Microsep 1K Centrifugal Device (Pall Life Sciences).

Конъюгация L1-7 пептида с поли(этиленгликоль)бисмалеинимидом; синтез конъюгата с MW 3,4 КДа, обозначенного "PEG3.4K(L1-7 Peptide)".

К раствору 3,0 мг L1-7 пептида в 1.5 мл буфера 1 (20 mM фосфата, 5 mM EDTA, pH 6,5) прибавляют 1,125 мг поли(этиленгликоль)бисмалеинимида (MW=3,4 КДа, Shearwater Corp.); 0,563 мл раствора 2.0 мг/мл в буфере 1. Реакционную смесь инкубируют при 4°C в течение ночи, затем подвергают диализу в кассете Slide-A-Lyzer (3500 MWCO, Pierce) против буфера А (20 mM Tris гидрохлорида, pH 7,2). Диализованную реакционную смесь очищают ионообменной хроматографией на колонке 5,0 мл HiTrap Q Sepharose HP (Amersham Biosciences Corp.). Пик продукта элюируют в виде трёх фракций по 3,0 мл в градиенте от 100% буфера А до 100% буфера В (буфер А + 0,5M NaCl) в объёме, равном 40 объёмам колонки. Объединённые фракции с продуктом упаривают до 850 мкл с содержанием 0,24 мг белка/мл в двух центрифугах Microsep 1K Centrifugal Device (Pall Life Sciences).

Результаты MALDI-TOF масс-спектрологии представлены ниже.

Образец#	Идентичность	Расч. MS	Найд. MS
1	L1-7 (неПЭГированный пептид)	3545	3538.7
2	mPEG5K-(L1-7 Peptide)	8500	8851
3	PEO4(L1-7 Peptide) ₂	7443	7446.29
4	PEG3.4K(L1-7 Peptide) ₂	10550	10552 6882.61 3550.13

Ясно, что нижний индекс "2" для PEG3.4K(L1-7 Peptide)₂ и PEO4(L1-7 Peptide)₂ указывает, что на одну пептидную цепь приходится два пептида, по одному на каждом конце полимера.

Определение ID₅₀.

IC₅₀ ингибирования hAng2:hTie2-Fc для L1-7 свободного и ПЭГированного пептидов определяют нейтрализационным методом ELISA, описанным в примере 2. Для нейтрализационного метода ELISA микротитрационные планшеты, с которыми связывается человеческий Ang-2 полипептид, получают, как описано в примере 2 для аффинного метода ELISA. Возможные (кандидаты) анти-Ang-2 L1-7 ПЭГированный и свободный пептиды титруют от 1000 до 0,2 нМ в 4-кратном разведении в растворе PBS, содержащем около 1% BSA и около 1 нМ Tie2 (при условии, что молекула Tie-2-Fc представляет собой молекулу, в которой участок Tie-2 содержит только растворимую внеклеточную область молекулы; R&D Systems, № в каталоге 313-TI). После того, как в каждую лунку добавляют около 100 мкл раствора, планшеты инкубируют в течение ночи при комнатной температуре, а затем пять раз отмывают в PBS, содержащем около 0,1% Tween-20. После отмывания в каждую лунку добавляют около 100 мкл антитела против Tie-2 (Pharmingen Inc., № в каталоге 557039) до примерной конечной концентрации 1 мкг в мл, и планшеты инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее добавляют около 100 мкл/лунка антитела козы против мышиного IgG-HRP (Pierce Chemical CO., № в каталоге 31432) в разведении 1:10000 в PBS, содержащем около 1% BSA. Планшеты инкубируют при комнатной температуре около 1 ч, после чего их отмывают 5 раз PBS, содержащем 0,1% Tween-20. Затем добавляют около 100 мкл/лунка TMB субстрата (описанного выше) и оставляют до появления синего цвета. Затем определяют оптическую плотность на спектрофотометре (планшетном ридере) при 370 нм.

L1-7 пептиды (C-GGGGG-AQ-TNFMPPMDLEQRLYEQFILQQG-LE) (SEQ ID NO: 359) включают N-концевой цистеин для связывания с ПЭГ и линкер 5Gly. Фланкирующие последовательности AQ и LE присутствуют как в оригинальном (исходном) клоне фага, так и в "пептителе". Результаты IC₅₀ ингибирования hAng-2: Tie2 приведены ниже.

Пептид	IC ₅₀ (нМ)
L1-7 пептид	0.49
mPEG5K-(L1-7 Peptide)	11.7
PEO4(L1-7 Peptide) ₂	0.064
PEG3.4K(L1-7 Peptide) ₂	0.058

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, способный связываться с Ang-2, содержащий аминокислотную последовательность
WDPWT

(SEQ ID NO: 65)

длиной в 5-50 аминокислот, и его физиологически приемлемые соли.

2. Полипептид, способный связываться с Ang-2, содержащий аминокислотную последовательность
WDPWTC

(SEQ ID NO: 66)

и его физиологически приемлемые соли.

3. Полипептид, способный связываться с Ang-2, содержащий аминокислотную последовательность
Cz²WDPWT

(SEQ ID NO: 67)

где z² представляет собой кислый или нейтральный полярный аминокислотный остаток, и его физиологически приемлемые соли.

4. Полипептид по п.3, содержащий аминокислотную последовательность
Cz²WDPWTC

(SEQ ID NO: 68)

где z² обозначает кислый или нейтральный полярный аминокислотный остаток, и его физиологически приемлемые соли.

5. Полипептид, способный связываться с Ang-2, содержащий аминокислотную последовательность формулы



где a^1 , a^2 и a^3 , каждый независимо, обозначают аминокислотные остатки;

a^5 обозначает аминокислотный остаток;

a^{12} отсутствует или обозначает аминокислотный остаток;

a^{13} отсутствует или обозначает нейтральный гидрофобный, нейтральный полярный или основной аминокислотный остаток;

a^{14} обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

и его физиологически приемлемые соли.

6. Полипептид по п.5, отличающийся тем, что

a^1 обозначает V, I, P, W, G, S, Q, N, E, K, R или H;

a^2 обозначает V, P, M, G, S, Q, D, E, K, R или H;

a^3 обозначает A, V, P, M, F, T, G, D, E, K или H;

a^8 обозначает A, V, G, Q, N, D или E;

a^{12} обозначает S, Q, N, D, E, K или R;

a^{13} обозначает L, T или H;

a^{14} обозначает V, L, I, W или M;

и его физиологически приемлемые соли.

7. Полипептид по п.5, отличающийся тем, что

a^1 обозначает Q;

a^2 обозначает E;

a^3 обозначает E;

a^5 обозначает D или E;

a^{12} обозначает D или E;

a^{13} обозначает H и

a^{14} обозначает M,

и его физиологически приемлемые соли.

8. Полипептид, способный связываться с Ang-2, содержащий аминокислотную последовательность формулы



где b^1 отсутствует или обозначает аминокислотный остаток;

b^2 отсутствует или обозначает нейтральный гидрофобный, нейтральный полярный или основной аминокислотный остаток;

b^3 , b^4 , b^5 и b^6 , каждый независимо, отсутствуют или обозначают аминокислотные остатки;

b^8 обозначает аминокислотный остаток;

b^{15} отсутствует или обозначает аминокислотный остаток;

b^{16} отсутствует или обозначает нейтральный гидрофобный, нейтральный полярный или основной аминокислотный остаток;

b^{17} отсутствует или обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

b^{18} , b^{19} и b^{20} , каждый независимо, отсутствуют или обозначают аминокислотные остатки;

и его физиологически приемлемые соли.

9. Полипептид по п.8, отличающийся тем, что

b^1 отсутствует или обозначает A, V, L, P, W, F, T, G, S, Q, N, K, R или H;

b^2 отсутствует или обозначает A, V, L, I, P, W, M, T, G, S, Y, N, K, R или H;

b^3 отсутствует или обозначает A, L, I, P, W, M, T, G, S, Q, N, E, R или H;

b^4 обозначает V, I, P, W, G, S, Q, N, E, K, R или H;

b^5 обозначает V, P, M, G, S, Q, D, E, K, R или H;

b^6 обозначает A, V, P, M, F, T, G, D, E, K или H;

b^8 обозначает A, V, G, Q, N, D или E;

b^{15} обозначает S, Q, N, D, E, K или R;

b^{16} обозначает L, T или H;

b^{17} обозначает V, L, I, W или M;

b^{18} отсутствует или обозначает A, V, L, P, W, F, T, G, Y, Q, D, E или R;

b^{19} отсутствует или обозначает V, L, I, P, T, G, S, Y, Q, N, D, E или R и

b^{20} отсутствует или обозначает V, L, P, W, M, T, G, S, Y, Q, N, D, K или R;

и его физиологически приемлемые соли.

10. Полипептид по п.8, отличающийся тем, что

b^1 отсутствует или обозначает P или T;

b^2 отсутствует или обозначает I или N;

b^3 отсутствует или обозначает R или I;

- b^4 обозначает Q;
 b^5 обозначает E;
 b^6 обозначает E;
 b^8 обозначает D или E;
 b^{15} обозначает D или E;
 b^{16} обозначает H;
 b^{17} обозначает M;
 b^{18} отсутствует или обозначает W или P;
 b^{19} отсутствует или обозначает G или E и
 b^{20} отсутствует или обозначает V или K;

и его физиологически приемлемые соли.

11. Полипептид, способный связываться с Ang-2, содержащий по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, приведенной в табл. 1, состоящей из SEQ ID NO: 4 и с SEQ ID NO: 76 по SEQ ID NO: 118 включительно, и его физиологически приемлемые соли.

Таблица 1

ПЕПТИД	SEQ ID NO	ПЕПТИДНАЯ ПОСЛЕДОВА - ТЕЛЬНОСТЬ
Con4-44	76	PIRQEEDWDPWTCEHMEV
Con4-40	77	TNIQECEWDPWTCDHMPGK
Con4-4	78	WYEQDACEWDPWTCEHMAEV
Con4-31	79	NRLQEVCEWDPWTCEHMENV
Con4-C5	80	AATQECEWDPWTCEHMPRS
Con4-42	81	LRHQEGCEWDPWTCEHMFWD
Con4-35	82	VPRQKCEWDPWTCEHMYVG
Con4-43	83	SISHEECEWDPWTCEHMQVG
Con4-49	84	WAAQECEWDPWTCEHMGRM
Con4-27	85	TWPQDKCEWDPWTCEHMGST
Con4-48	86	GHSQECEWDPWTCEHMGTS
Con4-46	87	QHWQECEWDPWTCDHMPK
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	PRLQECCVWDPWTCEHMLR
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	VLGGQCEWDPWTCRLQGW
Con4-1	107	VLGGQGCQWDPWTCSHLEDG
Con4-C1	108	TTIGSMCEWDPWTCAHMQGG
Con4-21	109	TKGKSVCQWDPWTCSHMQSG
Con4-C2	110	TTIGSMCQWDPWTCAHMQGG
Con4-18	111	WVNEVVCWDPWTCHNWDTP
Con4-19	112	VVQVGMQWDPWTCKHMLQ
Con4-16	113	AVGSQTCEWDPWTCAHLVEV
Con4-11	114	QGMKMFCEWDPWTCAHIVYR
Con4-C4	115	TTIGSMCQWDPWTCEHMQGG
Con4-23	116	TSQRVGCEWDPWTCHLTYT
Con4-15	117	QWSWPPCEWDPWTCQTVWPS
Con4-9	118	GTSPSFCQWDPWTCSHMOVQ
TN8-Con4*	4	QECEWDPWTCEHM

12. Слитый полипептид, способный связываться с Ang-2, содержащий по меньшей мере один пеп-

тид по пп.1, 5, 8 или 11 и носитель, и его физиологически приемлемые соли.

13. Слитый полипептид по п.12, отличающийся тем, что указанный носитель представляет собой по меньшей мере один из группы: Fc область (домен), полиэтиленгликоль, липид, группа холестерина, углевод и олигосахарид.

14. Полипептид по пп.1, 5, 8 или 11, который является циклическим.

15. Димер или мультимер полипептидов по пп.1, 5, 8 или 11.

16. Состав полипептида, имеющий формулу

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

и его мультимеры,

где F^1 обозначает носитель;

X^1 и X^2 , каждый независимо, выбирают из

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

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

$-(L^1)_c-P^1-(L^2)_d-P^2-(L^3)_e-P^3$; и

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

где один или более из P^1 , P^2 , P^3 и P^4 , каждый независимо, представляют собой полипептид, выбираемый из группы, состоящей из:

(a) аминокислотной последовательности WDPWT (SEQ ID NO: 65), отличающейся тем, что указанный полипептид имеет протяжённость 5-50 аминокислот;

(b) аминокислотной последовательности WDPWTC (SEQ ID NO: 66),

(c) аминокислотной последовательности Cz^2 WDPWT (SEQ ID NO: 67) и

(d) аминокислотной последовательности Cz^2 WDPWTC (SEQ ID NO: 68),
где z^2 обозначает кислый или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

L^1 , L^2 , L^3 и L^4 , каждый независимо, обозначает линкеры и

a, b, c, d, e и f, каждый независимо, обозначает 0 или 1, при условии, что по меньшей мере один из a и b обозначает 1;

и его физиологически приемлемые соли.

17. Состав полипептида по п.16, отличающийся тем, что z^2 обозначает A, V, G, Q, N, D или E.

18. Состав полипептида по п.16, отличающийся тем, что один или более из P^1 , P^2 , P^3 или P^4 , каждый независимо, представляет собой полипептид, выбираемый из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и с SEQ ID NO: 76 по SEQ ID NO: 118 включительно.

19. Состав полипептида по п.16, соответствующий формулам

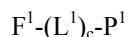


или



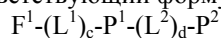
и его физиологически приемлемые соли.

20. Состав полипептида по п.16 формулы



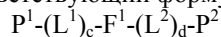
и его физиологически приемлемые соли.

21. Состав полипептида по п.16, соответствующий формуле



и его физиологически приемлемые соли.

22. Состав полипептида по п.16, соответствующий формуле



и его физиологически приемлемые соли.

23. Состав полипептида по п.16, отличающийся тем, что F^1 обозначает домен Fc или его фрагмент.

24. Состав полипептида по п.16, отличающийся тем, что F^1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60.

25. Полинуклеотид, кодирующий состав полипептида по пп.1, 5, 8 или 11.

26. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п.25.

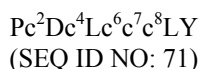
27. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п.26.

28. Клетка-хозяин по п.27, отличающаяся тем, что является клеткой прокариот.

29. Клетка-хозяин по п.28, отличающаяся тем, что является клеткой E. coli.

30. Клетка-хозяин по п.27, отличающаяся тем, что является клеткой эукариот.

31. Полипептид, способный связываться с Ang-2, содержащий аминокислотную последовательность формулы



где c^2 обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток;

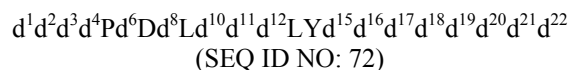
c^4 обозначает A, D или E;

c^6 обозначает кислый аминокислотный остаток;
 c^7 обозначает аминокислотный остаток и
 c^8 обозначает нейтральный гидрофобный, нейтральный полярный или основной аминокислотный остаток;
и его физиологически приемлемые соли.

32. Полипептид по п.31, отличающийся тем, что c^2 обозначает L или M.

33. Полипептид по п.31, отличающийся тем, что c^6 обозначает D или E.

34. Полипептид, способный связываться с Ang-2, содержащий аминокислотную последовательность формулы



где d^1 отсутствует или обозначает аминокислотный остаток;

d^2 отсутствует или обозначает нейтральный полярный, кислый или основной аминокислотный остаток;

d^3 отсутствует или обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

d^4 отсутствует или обозначает аминокислотный остаток;

d^6 обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток;

d^8 обозначает A, D или E;

d^{10} обозначает кислый аминокислотный остаток;

d^{11} обозначает аминокислотный остаток;

d^{12} обозначает нейтральный гидрофобный, нейтральный полярный или основной аминокислотный остаток;

d^{15} отсутствует или обозначает нейтральный полярный, кислый или основной аминокислотный остаток;

d^{16} отсутствует или обозначает нейтральный полярный, кислый или основной аминокислотный остаток;

d^{17} отсутствует или обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

d^{18} отсутствует или обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

d^{19} отсутствует или обозначает нейтральный гидрофобный, нейтральный полярный или основной аминокислотный остаток;

d^{20} отсутствует или обозначает аминокислотный остаток;

d^{21} отсутствует или обозначает нейтральный полярный, кислый или основной аминокислотный остаток;

d^{22} отсутствует или обозначает нейтральный гидрофобный, нейтральный полярный или основной аминокислотный остаток;

и его физиологически приемлемые соли.

35. Полипептид по п.34, отличающийся тем, что:

d^1 обозначает T, S, Q, R или H;

d^2 обозначает T, Q, N или K;

d^3 обозначает F;

d^4 обозначает M, Q, E или K;

d^6 обозначает L или M;

d^8 обозначает D или E;

d^{10} обозначает E;

d^{11} обозначает Q или E;

d^{12} обозначает T или R;

d^{15} обозначает Y, D, E или K;

d^{16} обозначает Q;

d^{17} обозначает W или F;

d^{18} обозначает L, I, M или T;

d^{19} обозначает L, F или Y;

d^{20} обозначает Q, D или E;

d^{21} отсутствует или обозначает Q или H;

d^{22} отсутствует или обозначает A, L, G, S или R;

и его физиологически приемлемые соли.

36. Полипептид, способный связываться с Ang-2, содержащий по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, приведенной в табл. 2, состоящей из SEQ ID NO: 6 и с SEQ ID NO: 119 по SEQ ID NO: 142 включительно, и его физиологически приемлемые соли.

Таблица 2

Пептид	SEQ ID NO	Последовательность
L1-1	119	QNYKPLDELDATLYEHFIFHYT
L1-2	120	LNFTPLDELEQTLYEQWTLQQS
L1-3	121	TKFNPLDELEQTLYEQWTLQHQ
L1-4	122	VKFKPLDALEQTLYEHWMFQQA
L1-5	123	VKYKPLDELDLIEYEQQTQER
L1-7	124	TNFMPLDDEQRLYEQFLLQGG
L1-9	125	SKFKPLDELEQTLYEQWTLQHA
L1-10	126	QKFQPLDELEQTLYEQFMLQQA
L1-11	127	QNFKPMDELEDTLYEQFLFQHS
L1-12	128	YKFTPLDDLEQTLYEQWTLQHV
L1-13	129	QEYEPLEDELDETLYNQWMFHQR
L1-14	130	SNFMPLDELEQTLYEQFMLQHQ
L1-15	131	QKYQPLDELDKTLYDQFMLQGG
L1-16	132	QKFQPLDELEETLYEQWTLQQR
L1-17	133	VKYKPLDELDLWLYHQTLLHHQ
L1-18	134	QKFMPLEDELDEILYEQFMFQQS
L1-19	135	QTFQPLDDLEEYLYEQWIRRYH
L1-20	136	EDYMPLDALDAQLYEQFILLHG
L1-21	137	HTFQPLDELEETLYYQWLYDOL
L1-22	138	YKFNPMDELEQTLYEELFQHA
AC6-L1	139	TNYKPLDELDATLYEHWLQHS
L1-C1	140	QKFQPLDELEQTLYEQWTLQQR
L1-C2	141	TKFQPLDELDQTLYEQWTLQQR
L1-C3	142	TNFQPLDELDQTLYEQWTLQQR
L1	6	KFNPLDELEETLYEQFTFQQ

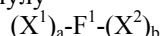
37. Слитый полипептид, способный связываться с Ang-2, содержащий по меньшей мере один пептид по пп.31, 34 или 36 и носитель, и его физиологически приемлемые соли.

38. Слитый полипептид по п.37, отличающийся тем, что указанный носитель представляет собой по меньшей мере один из группы: Fc область (домен), полиэтиленгликоль, липид, группа холестерина, углевод и олигосахарид.

39. Полипептид по пп.31, 34 или 36, который является циклическим.

40. Димер или мультимер полипептидов по пп.31, 34 или 36.

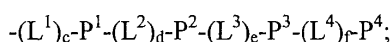
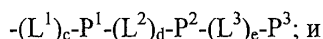
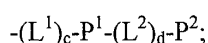
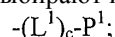
41. Состав полипептида, имеющий формулу



и его мультимеры,

где F^1 обозначает носитель;

X^1 и X^2 , каждый независимо, выбирают из



где один или более из P^1 , P^2 , P^3 и P^4 , каждый независимо, представляют собой полипептид по пп.31, 34 или 36;

L^1 , L^2 , L^3 и L^4 , каждый независимо, обозначают линкеры и

a, b, c, d, e и f, каждый независимо, обозначают 0 или 1, при условии, что по меньшей мере один из a и b обозначает 1;

и его физиологически приемлемые соли.

42. Состав полипептида по п.41, отличающийся тем, что один или более из P^1 , P^2 , P^3 и P^4 , каждый независимо, представляет собой полипептид, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и с SEQ ID NO: 119 по SEQ ID NO: 142 включительно.

43. Состав полипептида по п.41, соответствующий формулам

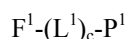


или



и его физиологически приемлемые соли.

44. Состав полипептида по п.41 формулы



и его физиологически приемлемые соли.

45. Состав полипептида по п.41, соответствующий формуле

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

и его физиологически приемлемые соли.

46. Состав полипептида по п.41, соответствующий формуле

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

и его физиологически приемлемые соли.

47. Состав полипептида по п.41, отличающийся тем, что F^1 обозначает домен Fc или его фрагмент.

48. Состав полипептида по п.41, отличающийся тем, что F^1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60.

49. Полинуклеотид, кодирующий полипептид по любому из пп.31, 34 или 36.

50. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п.49.

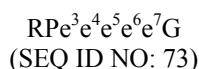
51. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п.50.

52. Клетка-хозяин по п.51, отличающаяся тем, что является клеткой прокариот.

53. Клетка-хозяин по п.52, отличающаяся тем, что является клеткой E. coli.

54. Клетка-хозяин по п.51, отличающаяся тем, что является клеткой эукариот.

55. Полипептид, способный связываться с Ang-2, содержащий аминокислотную последовательность формулы



где e^3 обозначает нейтральный полярный аминокислотный остаток;

e^4 обозначает кислый аминокислотный остаток;

e^5 обозначает нейтральный полярный или кислый аминокислотный остаток;

e^6 обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток;

e^7 обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток;

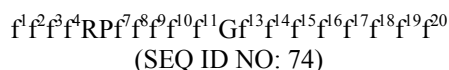
и его физиологически приемлемые соли.

56. Полипептид по п.55, отличающийся тем, что e^3 обозначает Y или C.

57. Полипептид по п.55, отличающийся тем, что e^4 обозначает D или E.

58. Полипептид по п.55, отличающийся тем, что e^6 обозначает I или M.

59. Полипептид, способный связываться с Ang-2, содержащий аминокислотную последовательность формулы



где f^1 обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

f^2 обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

f^3 обозначает нейтральный полярный или кислый аминокислотный остаток;

f^4 обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

f^7 обозначает нейтральный полярный аминокислотный остаток;

f^8 обозначает кислый аминокислотный остаток;

f^9 обозначает нейтральный полярный или кислый аминокислотный остаток;

f^{10} обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток;

f^{11} обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток;

f^{13} обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

f^{14} обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

f^{15} обозначает нейтральный полярный аминокислотный остаток;

f^{16} обозначает нейтральный полярный аминокислотный остаток;

f^{17} обозначает нейтральный полярный или кислый аминокислотный остаток;

f^{18} обозначает нейтральный гидрофобный или основной аминокислотный остаток;

f^{19} обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток и

f^{20} обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

и его физиологически приемлемые соли.

60. Полипептид по п.59, отличающийся тем, что

f^1 обозначает S, A или G;

f^2 обозначает G, Q или P;

f^3 обозначает Q, G или D;

f^4 обозначает L, M или Q;

f^7 обозначает C или Y;

f^8 обозначает E или D;

f^9 обозначает E, G или D;

f^{10} обозначает I или M;

f^{11} обозначает F или L;

f^{13} обозначает C или W;

f^{14} обозначает G или P;
 f^{15} обозначает T или N;
 f^{16} обозначает Q, Y или K;
 f^{17} обозначает N, D или Q;
 f^{18} обозначает L, V, W или R;
 f^{19} обозначает A, Q, Y или I и
 f^{20} обозначает L, A, G или V;

и его физиологически приемлемые соли.

61. Полипептид, способный связываться с Ang-2, содержащий по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, приведенной в табл. 3, состоящей из SEQ ID NO: 3 и с SEQ ID NO: 143 по SEQ ID NO: 148 включительно, и его физиологически приемлемые соли

Таблица 3

Пептид	SEQ ID NO	Последовательность
Con1-1	143	AGGMRPYDGMGLGWPNYDVQA
Con1-2	144	QTWDDPCMHLGPVTWRRCI
Con1-3	145	APGQRPYDGMGLGWPTYQRIV
Con1-4	146	SGQLRPC EEIFGCGTQNLAL
Con1-5	147	FGDKRPLECMFGGPIQLCPR
Con1-6	148	GQDLRPCEDMFGCGTKDWYG
Con1	3	KRPC EEIFGCGTYQ

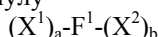
62. Слитый полипептид, способный связываться с Ang-2, содержащий по меньшей мере один полипептид по пп.55, 59 или 61 и носитель и его физиологически приемлемые соли.

63. Слитый полипептид по п.62, отличающийся тем, что указанный носитель представляет собой по меньшей мере один из группы: Fc область (домен), полиэтиленгликоль, липид, группа холестерина, углевод и олигосахарид.

64. Полипептид по пп.55, 59 или 61, который является циклическим.

65. Димер или мультимер полипептидов по пп.55, 59 или 61.

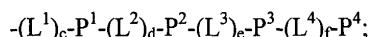
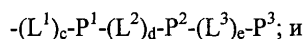
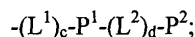
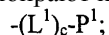
66. Состав полипептида, имеющий формулу



и его мультимеры,

где F^1 обозначает носитель;

X^1 и X^2 , каждый независимо, выбирают из



где один или более из P^1 , P^2 , P^3 и P^4 , каждый независимо, представляют собой полипептид по пп.55, 59 или 61;

L^1 , L^2 , L^3 и L^4 , каждый независимо, обозначают линкеры и

a, b, c, d, e и f, каждый независимо, обозначают 0 или 1, при условии, что по меньшей мере один из a и b обозначает 1;

и его физиологически приемлемые соли.

67. Состав полипептида по п.66, отличающийся тем, что один или более из P^1 , P^2 , P^3 и P^4 , каждый независимо, представляет собой полипептид, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 и с SEQ ID NO: 143 по SEQ ID NO: 148 включительно.

68. Состав полипептида по п.66, соответствующий формулам

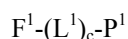


или



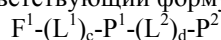
и его физиологически приемлемые соли.

69. Состав полипептида по п.66 формулы



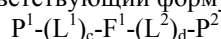
и его физиологически приемлемые соли.

70. Состав полипептида по п.66, соответствующий формуле



и его физиологически приемлемые соли.

71. Состав полипептида по п.66, соответствующий формуле



и его физиологически приемлемые соли.

72. Состав полипептида по п.66, отличающийся тем, что F¹ обозначает домен Fc или его фрагмент.
73. Состав полипептида по п.66, отличающийся тем, что F¹ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60.
74. Полинуклеотид, кодирующий полипептид по любому из пп.55, 59 или 61.
75. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п.74.
76. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п.75.
77. Клетка-хозяин по п.76, отличающаяся тем, что является клеткой прокариот.
78. Клетка-хозяин по п.77, отличающаяся тем, что является клеткой E. coli.
79. Клетка-хозяин по п.76, отличающаяся тем, что является клеткой эукариот.
80. Полипептид, способный связываться с Ang-2, содержащий аминокислотную последовательность формулы



где g² обозначает кислый аминокислотный остаток;

g⁴ обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток;

g⁵ обозначает E, D или Q;

g¹⁰ обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

g¹³ обозначает кислый остаток;

и его физиологически приемлемые соли.

81. Полипептид по п.80, отличающийся тем, что g² обозначает E или D.

82. Полипептид по п.80, отличающийся тем, что g⁴ обозначает V или M.

83. Полипептид по п.80, отличающийся тем, что g¹⁰ обозначает F или Q.

84. Полипептид по п.80, отличающийся тем, что g¹³ обозначает D или E.

85. Полипептид, способный связываться с Ang-2, содержащий аминокислотную последовательность формулы



где h¹ отсутствует или обозначает нейтральный гидрофобный, нейтральный полярный или основной аминокислотный остаток;

h² обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

h³ обозначает кислый аминокислотный остаток;

h⁴ обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

h⁶ обозначает кислый аминокислотный остаток;

h⁸ обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток;

h⁹ обозначает E, D или Q;

h¹⁴ обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

h¹⁷ обозначает кислый аминокислотный остаток;

h¹⁸ обозначает нейтральный гидрофобный, нейтральный полярный или основной аминокислотный остаток;

h¹⁹ обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток и

h²⁰ отсутствует или обозначает аминокислотный остаток;

и его физиологически приемлемые соли.

86. Полипептид по п.85, отличающийся тем, что

h¹ отсутствует или обозначает A, L, M, G, K или H;

h² обозначает L, F или Q;

h³ обозначает D или E;

h⁴ обозначает W или Y;

h⁶ обозначает D или E;

h⁸ обозначает V или M;

h¹⁴ обозначает F или Q;

h¹⁷ обозначает D или E;

h¹⁸ обозначает M, Y, N или K;

h¹⁹ обозначает L или Q и

h²⁰ отсутствует или обозначает M, T, G, S, D, K или R;

и его физиологически приемлемые соли.

87. Полипептид, способный связываться с Ang-2, содержащий по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, приведенной в табл. 4, состоящей из SEQ ID NO: 5 или с SEQ ID NO: 149 по SEQ ID NO: 157 включительно, и его физиологически приемлемые соли.

Таблица 4

Пептид	SEQ ID NO	Последовательность
12-9-1	149	GFEYCDGMEDPFTFGCDKQT
12-9-2	150	KLEYCDGMEDPFTQGCNDQS
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

88. Слитый полипептид, способный связываться с Ang-2, содержащий по меньшей мере один пептид по пп.80, 85 или 87 и носитель, его физиологически приемлемые соли.

89. Слитый полипептид по п.88, отличающийся тем, что носитель представляет собой по меньшей мере один из группы: Fc область (домен), полиэтиленгликоль, липид, группа холестерина, углевод и олигосахарид.

90. Полипептид по пп.80, 85 или 87, который является циклическим.

91. Димер или мультимер полипептидов по пп.80, 85 или 87.

92. Состав полипептида, имеющий формулу

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

и его мультимеры,

где F^1 обозначает носитель;

X^1 и X^2 , каждый независимо, выбирают из

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

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

$-(L^1)_c-P^1-(L^2)_d-P^2-(L^3)_e-P^3$; и

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

где один или более из P^1 , P^2 , P^3 и P^4 , каждый независимо, представляют собой полипептид по пп.80, 85 или 87;

L^1 , L^2 , L^3 и L^4 , каждый независимо, обозначает линкеры и

a, b, c, d, e и f, каждый независимо, обозначает 0 или 1, при условии, что по меньшей мере один из a и b обозначает 1;

и его физиологически приемлемые соли.

93. Состав полипептида по п.92, отличающийся тем, что один или более из P^1 , P^2 , P^3 и P^4 , каждый независимо, представляет собой полипептид, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 и с SEQ ID NO: 149 по SEQ ID NO: 157 включительно.

94. Состав полипептида по п.92, соответствующий формулам

$$X^1-F^1$$

или

$$F^1-X^2$$

и его физиологически приемлемые соли.

95. Состав полипептида по п.92 формулы

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

и его физиологически приемлемые соли.

96. Состав полипептида по п.92, соответствующий формуле

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

и его физиологически приемлемые соли.

97. Состав полипептида по п.92, соответствующий формуле

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

и его физиологически приемлемые соли.

98. Состав полипептида по п.92, отличающийся тем, что F^1 обозначает домен Fc или его фрагмент.

99. Состав полипептида по п.92, отличающийся тем, что F^1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60.

100. Полинуклеотид, кодирующий полипептид по любому из пп.80, 85 или 87.

101. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п.100.

102. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п.101.

103. Клетка-хозяин по п.102, отличающаяся тем, что является клеткой прокариот.

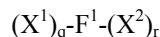
104. Клетка-хозяин по п.103, отличающаяся тем, что является клеткой E. coli.

105. Клетка-хозяин по п.102, отличающаяся тем, что является клеткой эукариот.

106. Полипептид в соответствии с любой из последовательностей SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4 или его вариант.

107. Полипептид в соответствии с любой из последовательностей SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7 или его вариант.

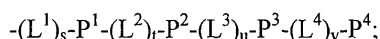
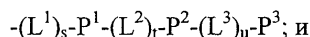
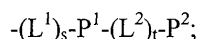
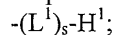
108. Состав полипептида формулы



и его мультимеры,

где F^1 обозначает носитель;

X^1 и X^2 , каждый независимо, выбирают из



где один или более из P^1 , P^2 , P^3 и P^4 , каждый независимо, представляют собой полипептид, выбранный из группы, состоящей из:

(a) аминокислотной последовательности WDPWT (SEQ ID NO: 65), причём указанный полипептид имеет в длину 5-50 аминокислот;

(b) аминокислотной последовательности WDPWTC (SEQ ID NO: 66);

(c) аминокислотной последовательности Cz^2 WDPWT (SEQ ID NO: 67), где z^2 обозначает кислый или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

(d) аминокислотной последовательности Cz^2 WDPWTC (SEQ ID NO: 68), где z^2 обозначает кислый или нейтральный полярный аминокислотный остаток;

(e) аминокислотной последовательности $Pe^2Dc^4Lc^6c^7c^8LY$ (SEQ ID NO: 71), где c^2 обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток; c^4 обозначает A, D или E; c^6 обозначает кислый аминокислотный остаток; c^7 обозначает аминокислотный остаток и c^8 обозначает нейтральный гидрофобный, нейтральный полярный или основной аминокислотный остаток;

(f) аминокислотной последовательности $RPe^3e^4e^5e^6e^7G$ (SEQ ID NO: 73), где e^3 обозначает нейтральный полярный аминокислотный остаток; e^4 обозначает кислый аминокислотный остаток; e^5 обозначает нейтральный полярный или кислый аминокислотный остаток; e^6 обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток и e^7 обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток;

(g) аминокислотной последовательности $Cg^2Cg^4g^5DPFTg^{10}GCg^{13}$ (SEQ ID NO: 75), где g^2 обозначает кислый аминокислотный остаток; g^4 обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток; g^5 обозначает нейтральный полярный или кислый аминокислотный остаток; g^{10} обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток и g^{13} обозначает кислый остаток;

(h) полипептида SEQ ID NO: 1;

(i) полипептида SEQ ID NO: 2 и

(j) полипептида SEQ ID NO: 7;

L^1 , L^2 , L^3 и L^4 , каждый независимо, обозначает линкеры и

q , r , s , t , u и v , каждый независимо, обозначает 0 или 1, при условии, что по меньшей мере один из q и r обозначает 1;

и его физиологически приемлемые соли.

109. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество состава полипептида по пп.1, 31, 55 или 80 в смеси с фармацевтически приемлемым носителем.

110. Способ ингибирования нежелательного ангиогенеза у млекопитающих, заключающийся во введении терапевтически эффективного количества состава полипептида по пп.12, 16, 37, 41, 62, 66, 88 или 92.

111. Способ лечения ангиогенеза у субъекта, заключающийся во введении эффективного количества состава полипептида по пп.12, 16, 37, 41, 62, 66, 88 или 92.

112. Способ модулирования ангиогенеза у млекопитающих, заключающийся во введении терапевтически эффективного количества состава полипептида по пп.12, 16, 37, 41, 62, 66, 88 или 92.

113. Способ подавления роста опухоли, характеризующейся нежелательным ангиогенезом, у млекопитающих, заключающийся во введении терапевтически эффективного количества состава полипептида по пп.12, 16, 37, 41, 62, 66, 88 или 92.

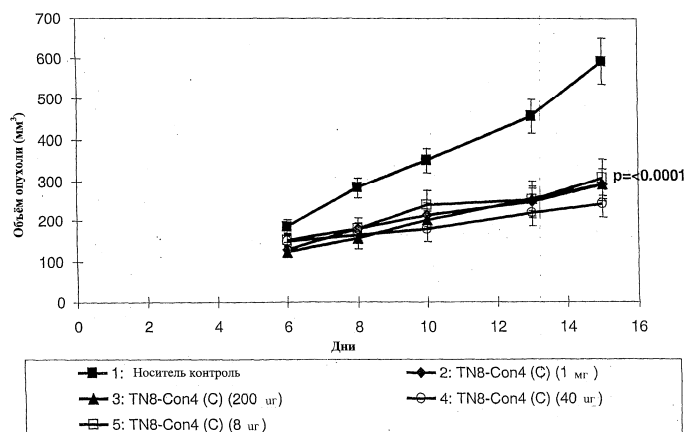
114. Способ лечения рака у млекопитающих, заключающийся во введении терапевтически эффективного количества состава полипептида по пп.12, 16, 37, 41, 62, 66, 88 или 92 и химиотерапевтического агента.

115. Способ по п.114, отличающийся тем, что химиотерапевтический агент является по меньшей мере одним из 5-FU, CPT-11 и Таксотер.

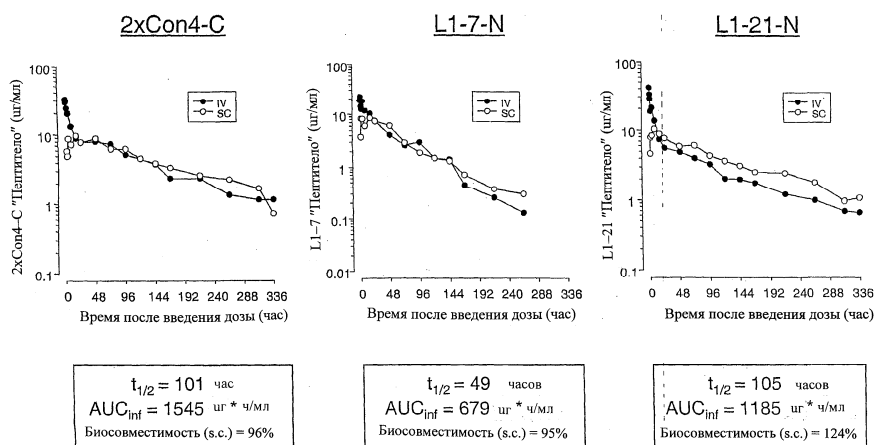
116. Способ модулирования по меньшей мере одного нарушения у млекопитающего: сосудистой

проницаемости или истечения плазмы, заключающийся во введении терапевтически эффективного количества состава полипептида по пп.12, 16, 37, 41, 62, 66, 88 или 92.

117. Способ лечения по меньшей мере одного из заболеваний: реваскулярного заболевания глаза, ожирения, ангиоретикулёмы, гемангиомы, атеросклероза, воспалительного заболевания, воспалительных нарушений, атеросклероза, эндометриоза, опухолевого заболевания, костного заболевания или псориаза, у млекопитающего, заключающийся во введении терапевтически эффективного количества состава полипептида по пп.12, 16, 37, 41, 62, 66, 88 или 92.

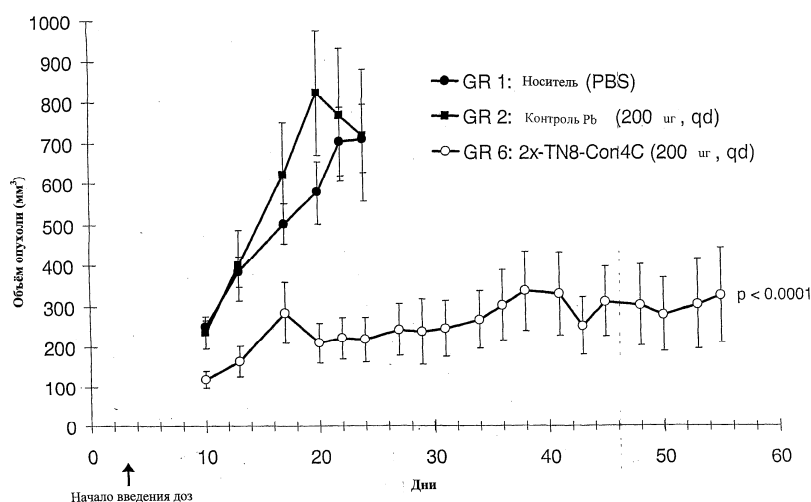


Фиг. 1



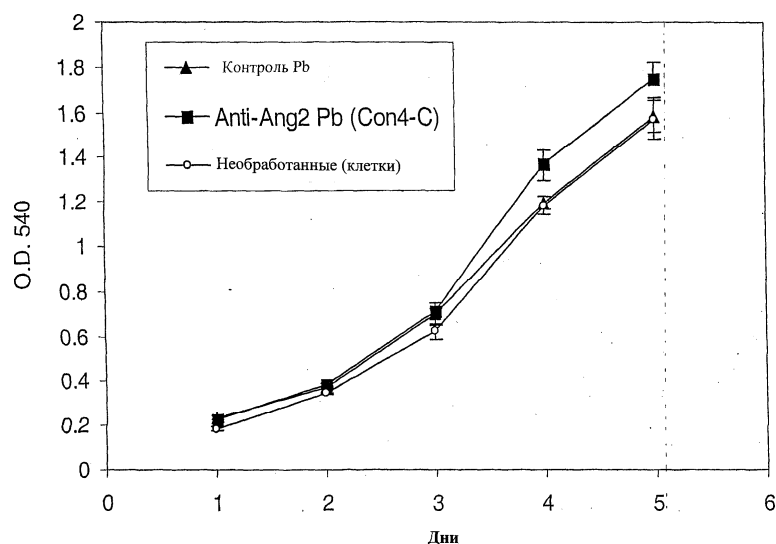
Фиг. 2

РК "пептида"у мышей (доза 50 мкг)



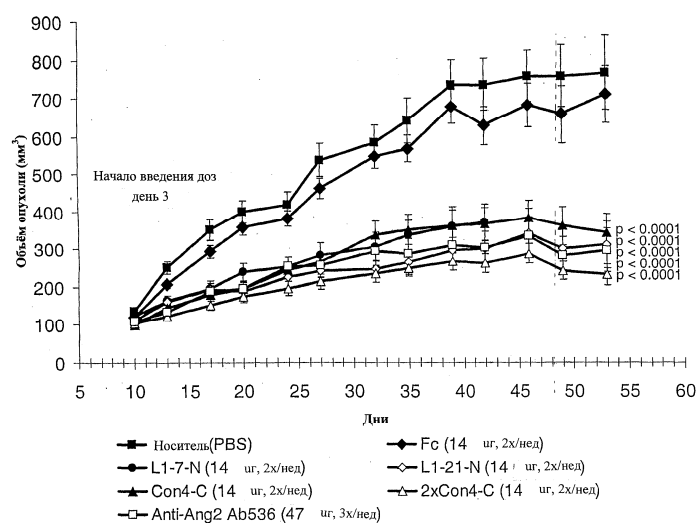
Фиг. 3

"Пептитела" против Ang2 ингибируют рост ксенотрансплантата опухоли A431



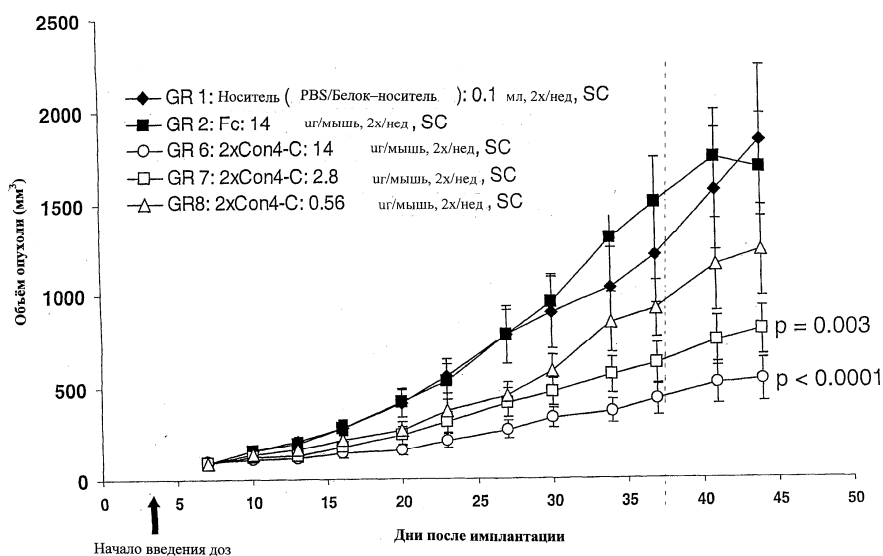
Фиг. 4

"Пептитело" против Ang2 в подпороговой дозе (Has) 1 мкг/мл не оказывает влияния на рост культивированных клеток A431



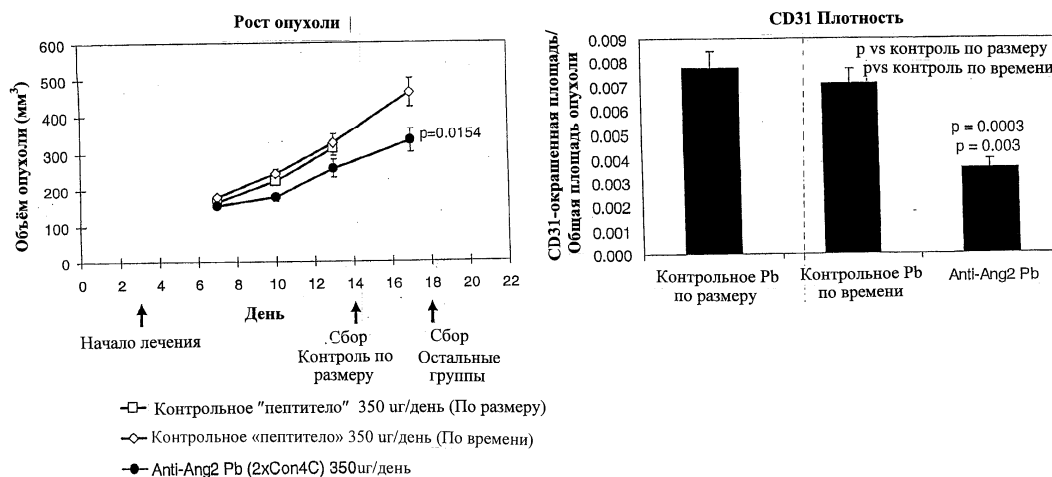
Фиг. 5

"Пептитела" против Ang2 ингибируют рост опухоли Colo205



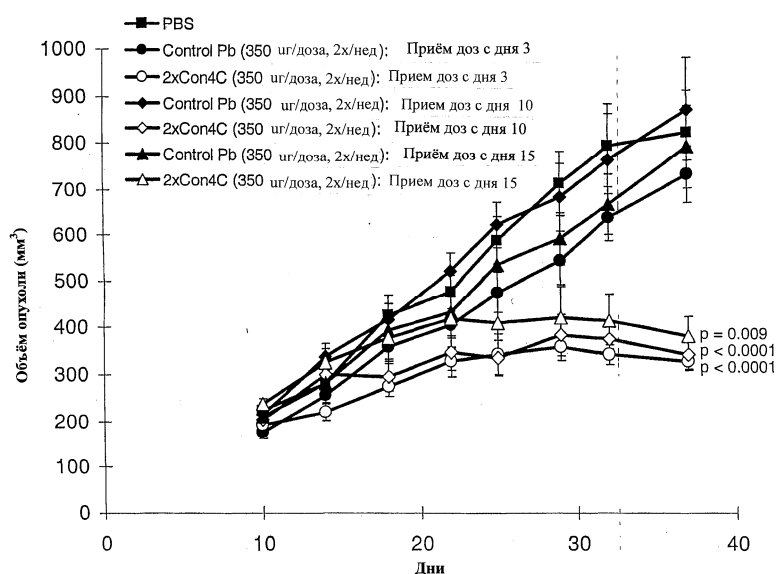
Фиг. 6

"Пептитела" против Ang2 ингибируют рост опухоли Colo205



Фиг. 7

Лечение "пептителом" против Ang2 снижает плотность CD31 окрашивания трансплантатов опухоли Colo205



Фиг. 8

"Пептитела" против Ang2 ингибируют рост опухоли Colo205 вне зависимости от времени начала введения доз

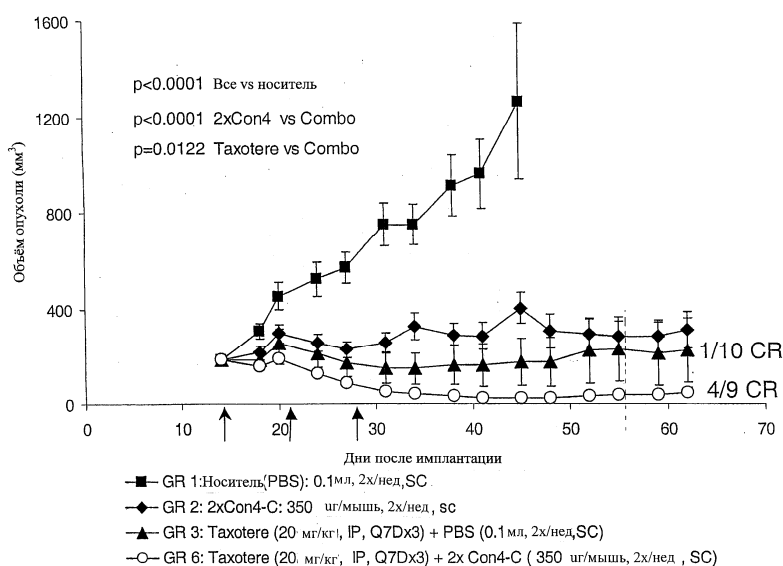
Исследование	Опухоль		Введение доз		
	Модель	Терапия	Схема приёма *	Длительность (недели)	% CR
082801	A431	Ab 536	46.7 μ г, 3х/ нед	10	60**
100201	A431	Ab 536	46.7 μ г, 3х/ нед	11	40**
100201	A431	2xCon4-C	200 μ г/день	11	30**
100201	A431	2xCon4-C	40 μ г/день	11	0
100201	A431	2xCon4-C	8 μ г/день	11	20
012902	Colo205	Ab 536	46.7 μ г, 3х/ нед	12	10
012902	Colo205	2xCon4-C	140 μ г/нед	12	0
031802	Colo205	2xCon4-C	350 μ г, 2х/ нед	10	20
111901	Colo205	Ab 536	46.7 μ г, 3х/ нед	21	20
042602	Colo205	2xCon4-C	14 μ г, 2х/ нед	11	21

*Во всех исследованиях введение доз начинают в день 3

**Препарат отменяют после достижения CR (полной ремиссии) и повторного роста опухоли не наблюдают. Средняя продолжительность наблюдения 15.3 недель (в интервале 6–27 недель).

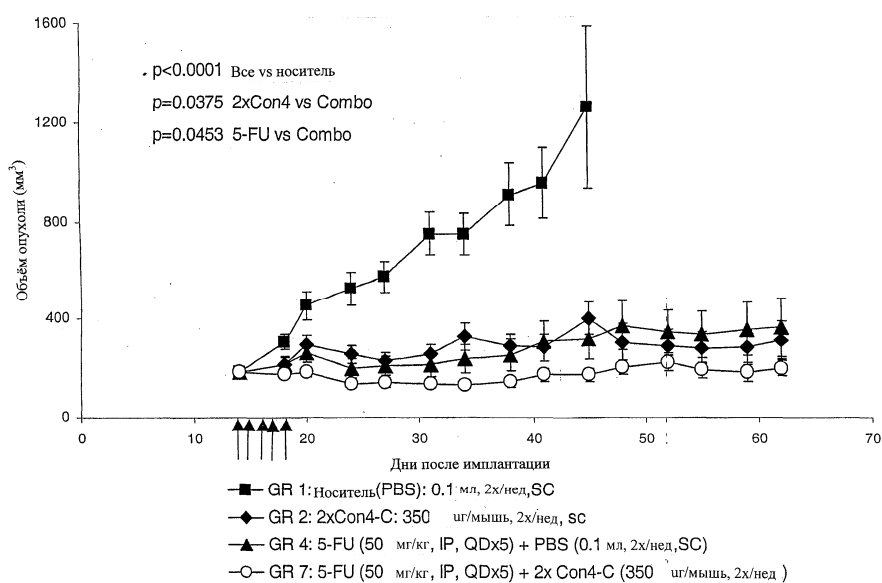
Фиг. 9

Скорость объективного ответа при длительных исследованиях введения доз



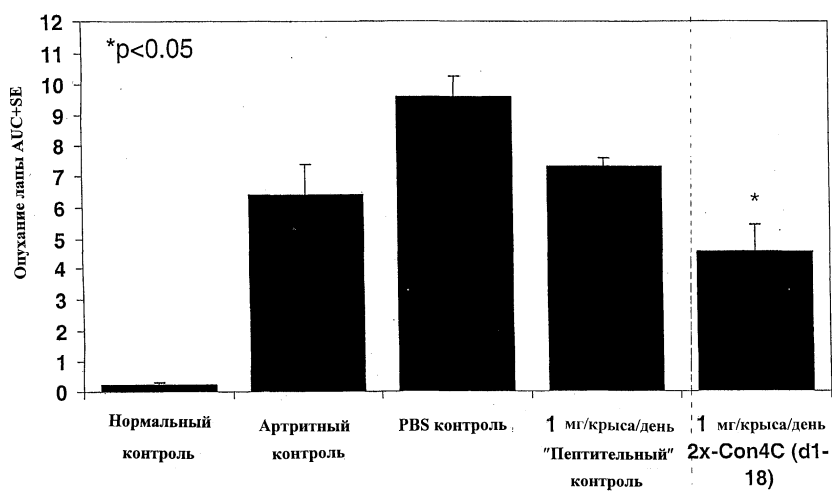
Фиг. 10a

Комбинация Pb с Таксотером на модели опухоли Colo205



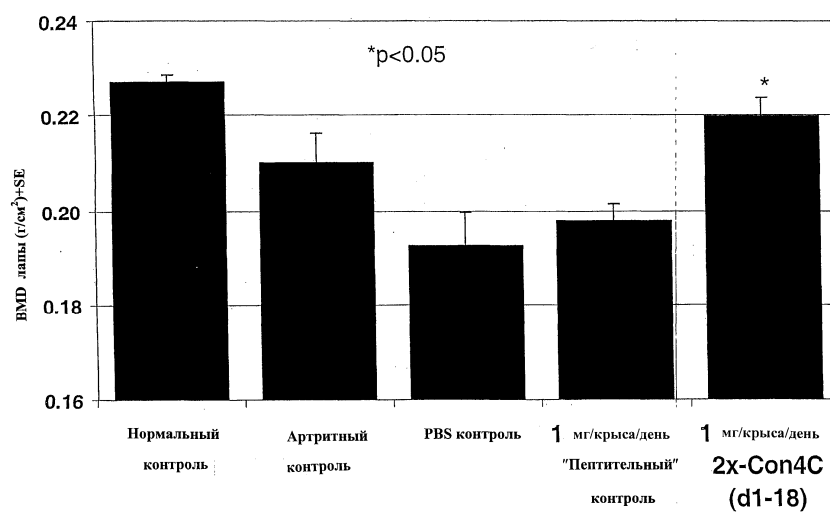
Фиг. 10b

Комбинация Pb с 5-FU на модели опухоли Colo205



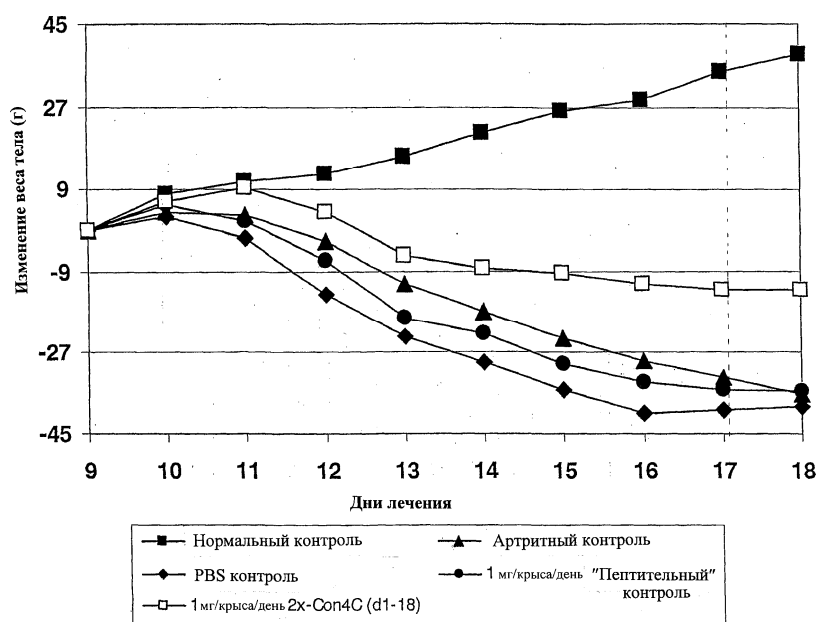
Фиг. 11a

"Пептитела" против Ang2 ингибируют опухание лапы у модели вызванного адьювантом артрита



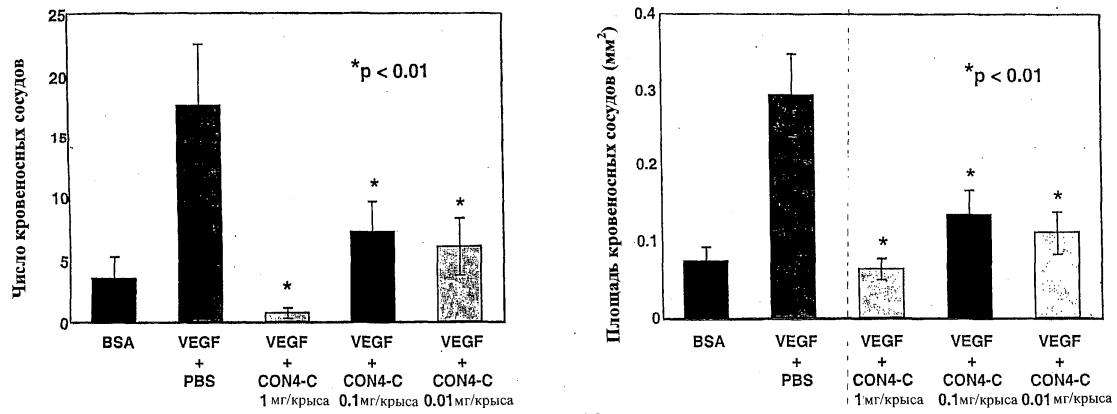
Фиг. 11b

"Пептитела" против Ang2 ингибируют снижение минеральной плотности костей у модели вызванного адьювантом артрита



Фиг. 11c

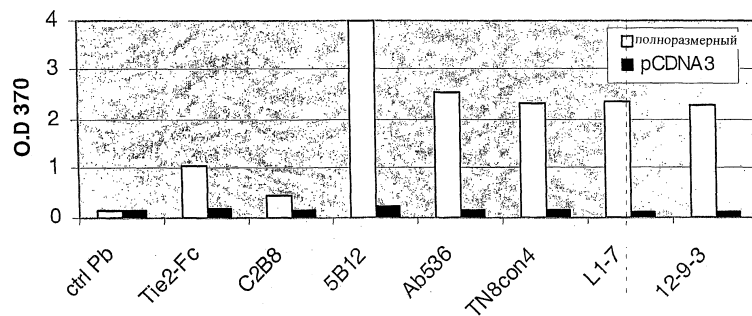
Влияние "пептител" против Ang2 на потерю веса тела у модели вызванного адьювантом артрита



Фиг. 12

"Пептитело" CON4-C ингибирует VEGF-индуцированный нормальный ангиогенез

Связывание с полноразмерным hAng2

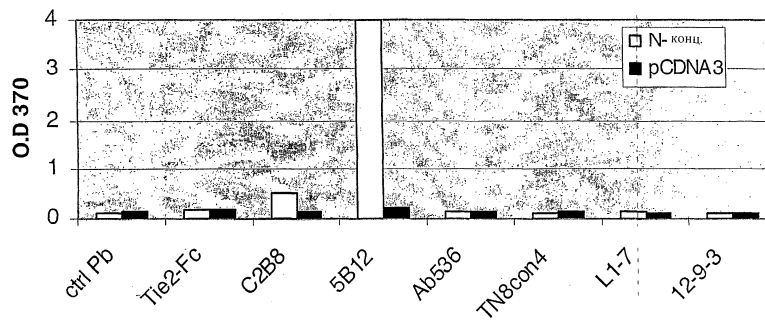


Фиг. 13a

Эпитопное картирование

Связывание с N-конц. hAng2

(aa 1-254)

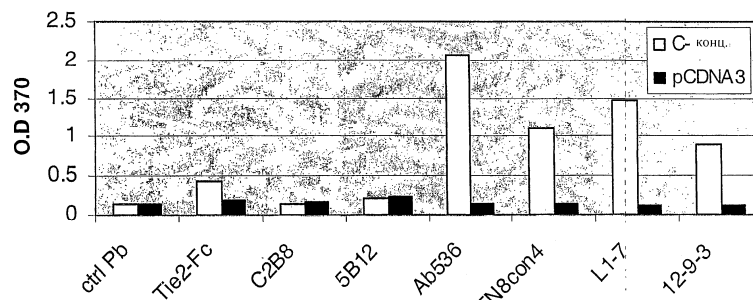


Фиг. 13b

Эпитопное картирование

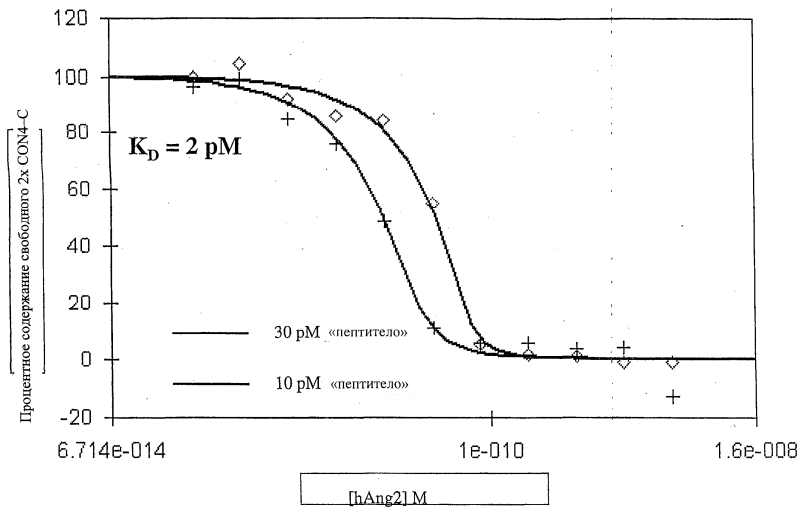
Связывание с C-конц. hAng2

(aa 255-495)



Фиг. 13c

Эпитопное картирование



Фиг. 14

Перечень последовательностей

<110> Амген Инк.

<120> Агенты, специфически связывающиеся с ангиопоэтином-2

<130> A-801B

<140> Ещё не присвоено

<141> 2002-10-11

<150> US 60/414,155

<151> 2002-09-27

<150> US 60/328,624

<151> 2001-10-11

<160> 359

<170> Версия Patent In 3.1

<210> 1

<211> 14

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептиды, связывающиеся с Ang-2

<400> 1

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

<210> 2

<211> 14

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептиды, связывающиеся с Ang-2

<400> 2

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

<210> 3

<211> 14

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид, связывающийся с Ang-2

<400> 3

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

<210> 4

<211> 14

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид, связывающийся с Ang-2

<400> 4

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

<210> 5

<211> 18

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид, связывающийся с Ang-2

<400> 5

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

Asn His

<210> 6

<211> 20

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид, связывающийся с Ang-2

<400> 6

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

Thr Phe Gln Gln
 20

<210> 7

<211> 14

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептиды, связывающиеся с Ang-2

<400> 7

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

<210> 8

<211> 67

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Олигонуклеотид

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

<210> 9
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

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

<210> 10
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Олигонуклеотид
 <400> 10
 cgtacagggtt tacgcaaga aatgg 25

<210> 11
 <211> 66
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Олигонуклеотид
 <400> 11
 ttgtttggat ccattactcg agtttttttg cggccgcttt ctgtgcacca ccacctccac 60
 ctttac 66

<210> 12
 <211> 32
 <212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитело", способное связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (32)..(32)

<223> Xaa = Fc

<400> 12

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

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

<210> 13

<211> 29

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитело", способное связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (29)..(29)

<223> Xaa = Fc

<400> 13

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

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

<210> 14

<211> 51

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитело", способное связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (51)..(51)

<223> Xaa = Fc

<400> 14

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

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

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

Gly Gly Xaa
50

<210> 15

<211> 60

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитело", способное связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (60)..(60)

<223> Xaa = Fc

<400> 15

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

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

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

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

<210> 16

<211> 56

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитело", способное связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (56)..(56)

<223> Xaa = Fc

<400> 16

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

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

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

Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
 50 55

<210> 17

<211> 26

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитело", способное связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (26)..(26)

<223> Хаа = Fc

<400> 17

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

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

<210> 18

<211> 45

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитело", способное связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (45)..(45)

<223> Хаа = Fc

<400> 18

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

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

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

<210> 19

<211> 62

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитело", способное связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (62)..(62)

<223> Xaa = Fc

<400> 19

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

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

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

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

<210> 20

<211> 31

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитело", способное связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 20

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

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

<210> 21

<211> 53

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитело", способное связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (2)..(2)

<223> Хаа = Fc

<400> 21

```

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

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

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

Phe  Gln  Gln  Leu  Glu
          50

```

<210> 22

<211> 59

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитело", способное связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (2)..(2)

<223> Хаа = Fc

<400> 22

```

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

```

008248

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

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

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

<210> 23

<211> 25

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитело", способное связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (2)..(2)

<223> Хаа = Fc

<400> 23

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

Pro Trp Thr Cys Glu His Met Leu Glu
20 25

<210> 24

<211> 47

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитело", способное связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (2)..(2)

<223> хаа = Fc

<400> 24

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

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

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

<210> 25

<211> 61

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитело", способное связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 25

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

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

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

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

<210> 26

<211> 75

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитело", способное связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (75)..(75)

<223> Xaa = Fc

<400> 26

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

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

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

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

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

<210> 27

<211> 72

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитело", способное связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Fc

<400> 27

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

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

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

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

Trp Thr Cys Glu His Met Leu Glu
 65 70

<210> 28

<211> 30

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитело", способное связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (30)..(30)

<223> Xaa = Fc

<400> 28

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

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

<210> 29

<211> 26

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитело", способное связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (26)..(26)

<223> Xaa = Fc

<400> 29

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

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

<210> 30

<211> 26

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитело", способное связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (26)..(26)

<223> Xaa = Fc

<400> 30

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

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

<210> 31

<211> 26

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитело", способное связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (26)..(26)

<223> Xaa = Fc

<400> 31

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

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

<210> 32

<211> 26

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитело", способное связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_ признаки

<222> (26)..(26)

<223> Xaa = Fc

<400> 32

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

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

<210> 33

<211> 784

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая "пептитела", способные связываться с Ang-2

<400> 33	
atgggtgcac agaaattcaa cccgctggac gaactggaag aaactctgta cgaacagttc	60
actttccagc agctcgaggg tggaggcggg ggggacaaaa ctcacacatg tccaccttgc	120
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gttttcctct tcccccaaa acccaaggac	180

```

accctcatga tctcccgac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtaggacgt gagccacgaa 240
gaccttgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 300
aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 360
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaaca agccctccca 420
gcccccatcg agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 480
accctgcccc catcccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 540
aaaggcttct atcccagca catgcccgtg gaggggaga gcaatgggca gccggagaac 600
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ctttcttctc ctacageaag -- 660
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaaactgt tctcatgctc cgtgatgcat 720
gaggctctgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaataatgg 780
atcc 784

```

<210> 34

<211> 768

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая "пептидаза", способные связываться с Ang-2

<400> 34

```

atgaaattca acccgctgga cgaactggaa gaaactctgt acgaacagtt cactttccag 60
cagctcgagg gtggaggcgg tggggacaaa actcacacat gtccaccttg cccagcacct 120
gaactcctgg ggggaccgtc agttttcttc tccccccaa aaccaaggga caccctcatg 180
atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 240
gtcaagttca actggtagct ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 300
gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 360
tggtgaaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agcccccatc 420
gagaaaacca tctccaaagc caaaggcag ccccgagaac cacagggtga caccctgccc 480
ccatcccgga atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 540
tatccagcgc acatgcccgt ggagtgagg agcaatgggc agccggagaa caactacaag 600
accagcctc ccgtgctgga ctccgacggc tcttcttctc tctacagcaa gctcaccgtg 660
gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 720
cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaataa 768

```

<210> 35

<211> 834
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая "пептитела", способные связываться с Ang-2

<400> 35
 atgaaattca acccgctgga cgaactggaa gaaactctgt acgaacagtt cactttccag 60
 cagggatctg gttctgtac tgggtgttcc ggctccaccg caagctcttg ttcaggcagt 120
 gcgactcatc tcgaggggtg aggcggtggg gacaaaactc acacatgtcc accttgccca 180
 gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtt ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 240
 ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 300
 cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 360
 ccgctggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtgttca gcgtcctcac cgtcctgcac 420
 caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccagcc 480
 cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa ggcagacccc gagaaccaca ggtgtacacc 540
 ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccagggtc gcctgacctg cctggtcaaa 600
 ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 660
 tacaagacca cgctcccggt gctggactcc gacggctcct tcttctcta cagcaagctc 720
 accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgtccgt gatgcatgag 780
 gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa ataa 834

<210> 36
 <211> 861
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая "пептитела", способные связываться с Ang-2

<400> 36
 atgggtgcac agaaattcaa cccgctggac gaactggaag aaactctgta cgaacagttc 60
 actttccagc aggggtggtg tgggtggtgg ggtggttaagt tcaaccact ggatgagctg 120
 gaagagactc tgtatgaaca gttcactttc cagcaactcg aggggtggagg cgggtggggac 180
 aaaactcaca catgtccacc ttgccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagttttc 240
 ctcttcccc caaaaccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 300
 gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 360

```

gtggagggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 420
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 480
aagggtctcca acaaagccct ccagccccc atcgagaaaa ccattctcaa agccaaaggg 540
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac 600
cagggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatcca gcgacatcg cgtggagtgg 660
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctccctgtct ggactccgac 720
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcagggtggc gcagggggaa 780
gtcttctcat gctccgtgat gcatgagget ctgcacaacc actacacgca gaagagctc 840
tcctgtcttc cgggtaataa a 861

```

<210> 37

<211> 849

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая "пептида", способные связываться с Ang-2

```

<400> 37
atgaaattca acccgctgga cgaactgga gaaactctgt acgaacagtt cactttccag 60
cagggtggtg gtggtggcgg tggttaagtt aaccactgg atgagctgga agagactctg 120
tatgaacagt tcactttcca gcaactcgag ggtggaggcg gtggggacaa aactcacaca 180
tgtccacctt gccagcacc tgaactctg gggggaccgt cagttttcct ctcccccca 240
aaacccaagg acaccctcat gatctcccg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac 300
gtgagccacg aagaccctga ggtcaagtt aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 360
aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 420
ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 480
aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaggggca gccccgagaa 540
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 600
acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 660
cagccgggag acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc 720
ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt ctctcatgc 780
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 840
ggtaataaa 849

```

<210> 38

<211> 759

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая "пептитела", способные связываться с Ang-2

<400> 38

```

atgggtgcac agcaggaaga atgcgaatgg gacccatgga cttgcgaaca catgctcgag    60
ggtaggaggcg gtggggacaa aattcacaca tgcttacctt gccctagacc tgaactcctg    120
gggggaccgt cagttttcct cttccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg    180
accctgagg tcacatgctg ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc    240
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag    300
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat    360
ggcaaggagt acaagtcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc    420
atctccaaag ccaaaggcga gccccgagaa ccacagggtg acaccctgcc cccatcccgg    480
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc    540
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaca gaccacgcct    600
cccgctctgg actccgacgg ctcttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc    660
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac    720
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaataaa    759

```

<210> 39

<211> 816

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая "пептитела", способные связываться с Ang-2

<400> 39

```

atgcaggaag aatgcgaatg ggacccatgg acttgccaac acatgggatc cggttctgct    60
actggtggtt ccggtccac cgaagctct ggttcaggca gtgcgactca tctcaggggt    120
ggaggcggtg gggacaaaac tcacacatgt ccacctgcc cagcactga actcctgggg    180
ggaccgtcag ttttctctt cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccggacc    240
cctgaggcca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag acctgaggt caagttcaac    300
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtac    360
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc    420

```

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 480
 tccaagcca aagggcagcc ccgagaacca cagggtgtaca ccctgcccc atcccgggat 540
 gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttggtca aaggcttcta tccagcgac 600
 atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 660
 gtgtggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 720
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgtcc gtgatgcatg aggcctctgca caaccactac 780
 acgcagaaga gccctctcct gtctccgggt aaataa 816

<210> 40

<211> 867

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая "пептидаза", способные связываться с Ang-2

<400> 40

atgggtgcac agcaggaaga atgcgaatgg gacctatgga cttgcgaaca catgggatcc 60
 ggttctgcta ctggtggtc cggctccacc gcaagctctg gttcaggcag tgcgactcat 120
 caggagaat gcgaatggga cccatggact tgcgaacaca tgctcagggg tggaggcggg 180
 ggggacaaaa ctacacatg tccacctgac ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 240
 gttttctctt tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac cctgaggtc 300
 acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagtcaa ctggtacgtg 360
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgaggg aggagcagta caacagcacg 420
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 480
 aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc 540
 aaagggcagc ccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catccggga tgagctgacc 600
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc aaaggcttct atccagcga catcgcctg 660
 gagtgggaga gcaatgggca gccgggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 720
 tccgacggct cttcttctct ctacagcaag ctacaccgtg acaagagcag gtggcagcag 780
 gggaaacgtt tctcatgtc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cagcagaag 840
 agcctctccc tgtctccggg taaataa 867

<210> 41

<211> 774

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая "пептитела", способные связываться с Ang-2

<400> 41
 atggacaaaa ctcacacatg tccaccttgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 60
 gttttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 120
 acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 180
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 240
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 300
 aagtgcagg tctccaaca agccctcca gccccatcg agaaaaccat ctccaagcc 360
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 420
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 480
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 540
 tccgagggct ccttcttct ctacagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 600
 gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtcttgc acaaccata cagcagaag 660
 agcctctccc tgtctccggg taaaggtgga ggtgggtggg cacagaaatt caaccgctg 720
 gacgagctgg aagagactct gtacgaacag ttacttttc aacagctcga gtaa 774

<210> 42

<211> 840

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая "пептитела", способные связываться с Ang-2

<400> 42
 atggacaaaa ctcacacatg tccaccttgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 60
 gttttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 120
 acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 180
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 240
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 300
 aagtgcagg tctccaaca agccctcca gccccatcg agaaaaccat ctccaagcc 360
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 420
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 480
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 540

tccgacggct ctttcttct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 600
 gggaaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtcttgc acaaccacta cacgcagaag 660
 agcctctccc tgtctccggg taaagggtga ggtgggtggtg cacagggatc cgtttctgct 720
 actgggtggtt ccggctccac cgcaagctct ggttcaggca gtgcgactca taaattcaac 780
 ccgctggacg aactggaaga aactctgtac gaacagttca ctttcagca actcgagtaa 840

<210> 43

<211> 858

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая "пептида", способные связываться с Ang-2

<400> 43
 atggacaaaa ctcacacatg tccaccttgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 60
 gttttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac cctgaggtc 120
 acatgcgttg tggtagacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 180
 gacggcgttg aggtgcataa tgccaagaca aagccgctgg aggagcagta caacagcacg 240
 taccgtgttg tcagcgtcct caccgtctcg caccaggact ggtcgaatgg caaggagtac 300
 aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaagcc 360
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catccgggga tgagctgacc 420
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 480
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 540
 tccgacggct ctttcttct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 600
 gggaaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtcttgc acaaccacta cacgcagaag 660
 agcctctccc tgtctccggg taaagggtga ggtgggtggtg cacagaaatt caaccgctg 720
 gacgaactgg aagaaactct gtacgaacag ttactttcc agcagggtgg tgggtgggtg 780
 ggcggtggtg agttcaacc actggatgag ctggaagaga ctctgtatga acagttcact 840
 ttccagcaac tcgagtaa 858

<210> 44

<211> 756

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая "пептитела", способные связываться с Ang-2

<400> 44

```

atggacaaaa ctacacatg tccacctg cagcacctg aactcctggg gggaccgtca    60
gttttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc    120
acatgcgtgg tggtagcgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg    180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg    240
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac    300
aagtgcagg tctccaaca agccttcca gctccatcg agaaaaccat ctccaagcc    360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgccc catcccgga tgagctgacc    420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg    480
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac    540
tccgacggct cttcttctct ctacagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag    600
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cagcagaag    660
agcctctccc tgttccggg taaagggtga ggtggtggtg cacagcagga agaatgcgaa    720
tgggacccat ggacttgcga acacatgctc gagtaa    756

```

<210> 45

<211> 822

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая "пептитела", способные связываться с Ang-2

<400> 45

```

atggacaaaa ctacacatg tccacctg cagcacctg aactcctggg gggaccgtca    60
gttttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc    120
acatgcgtgg tggtagcgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg    180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg    240
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac    300
aagtgcagg tctccaaca agccttcca gctccatcg agaaaaccat ctccaagcc    360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgccc catcccgga tgagctgacc    420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg    480
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac    540
tccgacggct cttcttctct ctacagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag    600
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cagcagaag    660

```

```

agcctctccc tgtctccggg taaaggtgga ggtggtggtg cacagggatc cggttctgct 720
actggtggtt ccggctccac cgcaagctct ggttcaggca gtgcgactca tcaggaagaa 780
tgcgaaatggg acccatggac ttgcgaacac atgctcgagt aa 822

```

<210> 46

<211> 864

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая "пептителя", способные связываться с Ang-2

```

<400> 46
atggacaataa ctcacacatg tccaccttgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 60
gttttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctccgggac ccctgaggtc 120
acatgctgtg tggtggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtactgt 180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgctgg aggagcagta caacagcacg 240
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 300
aagtgcagg tctccaataa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaagcc 360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgccc catcccgga tgagctgacc 420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc aaaggcttct atccagcga catgcccgtg 480
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 540
tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 600
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cagcagaag 660
agcctctccc tgtctccggg taaaggtgga ggtggtggtg cacagcagga agaatgcgaa 720
tgggaccat ggacttgca acacatggga tccggttctg ctactggtgg ttccggctcc 780
accgcaagct ctggttcagg cagcgcgact catcaggaag aatgcgaatg ggaccatgg 840
acttgcaaac acatgctcga gtaa 864

```

<210> 47

<211> 906

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая "пептителя", способные связываться с Ang-2

<400> 47
 atgggtgcac aggaagaatg cgaatgggac ccatggactt gcgaacacat ggggtgtggt 60
 ggtgtgtggt gtggtaaatt caaccgctg gacgaactgg aagaaactct gtacgaacag 120
 ttacttttcc agcagggatc cgtttctgct actggtggtt ccggctccac cgcaagctct 180
 ggttcaggca gtgcgactca tctcaggggt ggaggcgtg gggacaaaac tcacacatgt 240
 ccaccttgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag ttttcctctt cccccaaaa 300
 cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc cctgaggtca catgctgtgt ggtggacgtg 360
 agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 420
 gccaaagaca agccgcggga ggagcagtag aacagcacgt accgtgtgtt cagcgtcctc 480
 accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 540
 gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaagcca aagggcagcc ccgagaacca 600
 cagggtgaca ccctgcccc atcccgggt gagctgacca agaaccaggt cagcttgacc 660
 tgctgtgtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 720
 ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc 780
 tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgtctc 840
 gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 900
 aaataa 906

<210> 48

<211> 897

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая "пептилеа", способные связываться с Ang-2

<400> 48
 atggacaaaa ctcacacatg tccacctgac ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 60
 gttttctctt ccccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac ccctgaggtc 120
 acatgctgtg tgggtggact gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 180
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg agggagcagta caacagcacg 240
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtag 300
 aagtgcgaag tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaacat ctccaagacc 360
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgccc catccggga tgagctgacc 420
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggc aaaggcttct atcccagcga catcgcctg 480
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 540
 tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 600

```

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

```

<210> 49

<211> 771

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая "пептитела", способные связываться с Ang-2

```

<400> 49
atgggtgcac agttcgacta ctgcgaaggt gttgaagacc cgttcacttt cgggtgcgac 60
aaccacctcg aggggtgagg cgggtgggac aaaactcaca catgtccacc ttgcccagca 120
cctgaactcc tggggggacc gtcagttttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 180
atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 240
gagggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataagtccaa gacaaagccg 300
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 360
gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aagggtctca acaaagccct ccagcccc 420
atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 480
cccccatccc gggatgagct gaccaagaac cagggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 540
ttctatccca gcgacatgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 600
aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 660
gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 720
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaata a 771

```

<210> 50

<211> 759

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая "пептитела", способные связываться с Ang-2

<400> 50
 atgggtgcac agcagtacgg ttgcgacggt tttctgtacg gttgcatgat caacctcgag 60
 ggtggaggcg gtggggacaa aactcacaca tgtccacctt gcccgagcacc tgaactcctg 120
 gggggaccgt cagttttcct cttcccccca aaaccaagg acacctcat gatctcccgg 180
 accctgagg tcacatgctg ggtggtggac gtgagccacg aagacctga ggtcaagttc 240
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 300
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 360
 ggcaaggagt acaagtgaac ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 420
 atctccaaag ccaaaggga gccccgagaa ccacagggtg acacctgcc cccatcccgg 480
 gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 540
 gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaca gaccagcct 600
 cccgtgtgg actccgacgg ctcttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 660
 aggtggcagc aggggaacgt ctctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 720
 tacacgcaga agagcctctc cctgtctcgg ggtaataa 759

<210> 51

<211> 759

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая "пептидаза", способные связываться с Ang-2

<400> 51
 atgggtgcac agaaacgccc atgcaagaa atgtggggtg gttgcaacta cgacctcgag 60
 ggtggaggcg gtggggacaa aactcacaca tgtccacctt gcccgagcacc tgaactcctg 120
 gggggaccgt cagttttcct cttcccccca aaaccaagg acacctcat gatctcccgg 180
 accctgagg tcacatgctg ggtggtggac gtgagccacg aagacctga ggtcaagttc 240
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 300
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 360
 ggcaaggagt acaagtgaac ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 420
 atctccaaag ccaaaggga gccccgagaa ccacagggtg acacctgcc cccatcccgg 480
 gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 540
 gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaca gaccagcct 600
 cccgtgtgg actccgacgg ctcttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 660
 aggtggcagc aggggaacgt ctctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 720
 tacacgcaga agagcctctc cctgtctcgg ggtaataa 759

<210> 52
 <211> 759
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая "пептитела", способные связываться с Ang-2

<400> 52
 atgggtgcac agcaccagat ctgcaaatgg gacccgtgga cctgcaaaaca ctggctcgag 60
 ggtggaggcg gtggggacaa aactcacaca tgtccacctt gccagcacc tgaactcctg 120
 gggggaccgt cagttttcct cttccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg 180
 acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 240
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 300
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 360
 ggcaaggagt acaagtgc aaagtccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 420
 atctccaaag ccaagggca gccccgagaa ccacagggtg acaccctgcc cccatcccgg 480
 gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 540
 gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaca gaccacgcct 600
 cccgtgctgg actccgacgg ctctctcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 660
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 720
 tacacgcaga agagcctctc cctgtctcgg ggtaaataa 759

<210> 53
 <211> 759
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая "пептитела", способные связываться с Ang-2

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

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat	360
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccatt cgagaaaacc	420
atctccaaag ccaaggga gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg	480
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc	540
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaca gaccacgcct	600
cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc ctctacagca agtcaccgt ggacaagagc	660
aggtggcagc aggggaacct ctctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac	720
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaataa	759

<210> 54

<211> 25

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Олигонуклеотид

<400> 54

cggcgaaact atcggatatca agctg 25

<210> 55

<211> 26

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Олигонуклеотид

<400> 55

catgtaccgt aacctgagt ttcgtc 26

<210> 56

<211> 14

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусные мотивы, образованные при использовании библиотеки TN8-IX

<220>
 <221> Смеш_признаки
 <222> (7, 12 и)..(14)
 <223> Хаа относится к любой природной аминокислоте

<400> 56
 Lys Arg Pro Cys Glu Glu хаа Trp Gly Gly Cys хаа Tyr хаа
 1 5 10

<210> 57
 <211> 14
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Консенсусные мотивы, образованные при использовании библиотеки TN8-IX
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (7, 12 и)..(14)
 <223> Хаа относится к любой природной аминокислоте

<400> 57
 Lys Arg Pro Cys Glu Glu хаа Phe Gly Gly Cys хаа Tyr хаа
 1 5 10

<210> 58
 <211> 14
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Консенсусные мотивы, образованные при использовании библиотеки TN8-IX
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (1, 2, 3, 5 и)..(13)
 <223> Хаа относится к любой природной аминокислоте

<400> 58

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

<210> 59

<211> 18

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусный мотив, образованный при использовании библиотеки TN12-I

<220>

<221> Смеш. признаки

<222> (3, 8, 10-14 и ...)(18)

<223> Xaa относится к любой природной аминокислоте

<400> 59

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

Arg Xaa

<210> 60

<211> 227

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Fc человеческого IgG1

<400> 60

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

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

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

008248

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Gln Val
115 120 125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220
Pro Gly Lys
225

<210> 61

<211> 14

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусные мотивы, образованные при использовании библиотеки TN8-IX

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (1-3, 5, 7, 12, 13 и)..(14)

<223> Хаа относится к любой природной аминокислоте

<400> 61

Хаа Хаа Хаа Cys Хаа Asp Хаа Tyr Trp Tyr Cys Хаа Хаа Хаа
1 5 10

<210> 62

<211> 14

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусные мотивы, образованные при использовании библиотеки TN8-IX

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (1-3, 5, 7, 12, 13 и)..(14)

<223> Хаа относится к любой природной аминокислоте

<400> 62

Хаа Хаа Хаа Cys Хаа Asp Хаа Tyr Thr Tyr Cys Хаа Хаа Хаа
1 5 10

<210> 63

<211> 14

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусные мотивы, образованные при использовании библиотеки TN8-IX

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (1-3, 5, 7, 12, 13 и)..(14)

<223> Хаа относится к любой природной аминокислоте

<400> 63

Хаа Хаа Хаа Cys Хаа Asp Хаа Phe Trp Tyr Cys Хаа Хаа Хаа
1 5 10

<210> 64

<211> 14

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусные мотивы, образованные при использовании библиотеки TN8-IX

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (1-3, 5, 7, 12, 13 и)..(14)

<223> Хаа относится к любой природной аминокислоте

<400> 64

Хаа Хаа Хаа Cys Хаа Asp Хаа Phe Thr Tyr Cys Хаа Хаа Хаа
1 5 10

<210> 65

<211> 5

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2

<400> 65

Trp Asp Pro Trp Thr
1 5

<210> 66

<211> 6

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2

<400> 66

Trp Asp Pro Trp Thr Cys
1 5

<210> 67

<211> 7

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (2)..(2)

<223> Хаа обозначает кислый или нейтральный полярный аминокислотный остаток

<400> 67

Cys Хаа Trp Asp Pro Trp Thr
1 5

<210> 68

<211> 8

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (2)..(2)

<223> Хаа обозначает кислый или нейтральный полярный аминокислотный остаток

<400> 68

Cys Хаа Trp Asp Pro Trp Thr Cys
1 5

<210> 69

<211> 14

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (1, 2 и)..(3)

<223> Хаа, каждый независимо, обозначает аминокислотный остаток

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (5)..(5)

<223> Хаа обозначает аминокислотный остаток

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (12)..(12)

<223> Хаа отсутствует или обозначает аминокислотный остаток

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (13)..(13)

<223> Хаа отсутствует или обозначает нейтральный гидрофобный, нейтральный полярный или основной аминокислотный остаток

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (14)..(14)

<223> Хаа обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток

<400> 69

Хаа Хаа Хаа Cys Хаа Trp Asp Pro Trp Thr Cys Хаа Хаа Хаа

1 5 10

<210> 70
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (1 и `)...(15)
 <223> Хаа отсутствует или обозначает аминокислотный остаток

<220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2 и `)...(16)
 <223> Хаа отсутствует или обозначает нейтральный гидрофобный, нейтральный полярный или основной аминокислотный остаток

<220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (3-6, 18, 19 и `)...(20)
 <223> Хаа, каждый независимо, отсутствуют или обозначают аминокислотные остатки

<220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (8)...(8)
 <223> Хаа обозначает аминокислотный остаток

<220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (17)...(17)
 <223> Хаа отсутствует или обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток

<400> 70
 Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Cys Хаа Trp Asp Pro Trp Thr Cys Хаа Хаа
 1 5 10 15

Хаа Хаа Хаа Хаа
 20

<210> 71
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)...(2)
 <223> Хаа обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток

<220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (4)...(4)
 <223> Хаа обозначает A, D или E.

<220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (6)...(6)
 <223> Хаа обозначает кислый аминокислотный остаток

<220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (7)...(7)
 <223> Хаа обозначает аминокислотный остаток

<220>

<221> смеш_признаки
 <222> (8) .. (8)
 <223> Хаа обозначает нейтральный гидрофобный, нейтральный полярный или основной аминокислотный остаток.

<400> 71
 Pro Хаа Asp Хаа Leu Хаа Хаа Хаа Leu Tug
 1 5 10

<210> 72
 <211> 22
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (1, 4 и) .. (20)
 <223> Хаа отсутствует или обозначает аминокислотный остаток.

<220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2, 15, 16 и) .. (21)
 <223> Хаа отсутствует или обозначает нейтральный полярный, кислый или основной аминокислотный остаток.

<220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (3, 17 и) .. (18)
 <223> Хаа отсутствует или обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток.

<220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (6) .. (6)
 <223> Хаа обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток.

<220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (8) .. (8)
 <223> Хаа обозначает A, D или E.

<220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (10) .. (10)
 <223> Хаа обозначает кислый аминокислотный остаток.

<220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (11) .. (11)
 <223> Хаа обозначает аминокислотный остаток.

<220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (12) .. (12)
 <223> Хаа обозначает нейтральный гидрофобный, нейтральный полярный или основной аминокислотный остаток.

<220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (19 и) .. (22)
 <223> Хаа отсутствует или обозначает нейтральный гидрофобный, нейтральный полярный или основной аминокислотный остаток.

<400> 72
 Хаа Хаа Хаа Хаа Pro Хаа Asp Хаа Leu Хаа Хаа Хаа Leu Tug Хаа Хаа
 1 5 10 15
 Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа
 20

<210> 73

<211> 8
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (3)..(3)
 <223> Хаа обозначает нейтральный полярный аминокислотный остаток.

<220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (4)..(4)
 <223> Хаа обозначает кислый аминокислотный остаток.

<220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа обозначает нейтральный полярный или кислый аминокислотный остаток.

<220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (6 и)..(7)
 <223> Хаа обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток.

<400> 73
 Arg Pro хаа хаа хаа хаа хаа Glu
 1 5

<210> 74
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (1, 2, 4, 13, 14, 19 и)..(20)
 <223> Хаа обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток.

<220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (3, 9 и)..(17)
 <223> Хаа обозначает нейтральный полярный или кислый аминокислотный остаток.

<220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (7, 15 и)..(16)
 <223> Хаа обозначает нейтральный полярный аминокислотный остаток.

<220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (8)..(8)
 <223> Хаа обозначает кислый аминокислотный остаток.

<220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (10 и)..(11)
 <223> Хаа обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток.

<220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (18)..(18)
 <223> Хаа обозначает нейтральный гидрофобный или основной аминокислотный остаток.

<400> 74

Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa
20

<210> 75
<211> 13
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
<220>
<221> смещ_признаки
<222> (2) .. (2)
<223> Xaa обозначает кислый аминокислотный остаток;

<220>
<221> смещ_признаки
<222> (4) .. (4)
<223> Xaa обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток.

<220>
<221> смещ_признаки
<222> (5) .. (5)
<223> Xaa обозначает E, D или Q.

<220>
<221> смещ_признаки
<222> (10) .. (10)
<223> Xaa обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток.

<220>
<221> смещ_признаки
<222> (13) .. (13)
<223> Xaa обозначает кислый остаток.

<400> 75
Cys Xaa Gly Xaa Xaa Asp Pro Phe Thr Xaa Gly Cys Xaa
1 5 10

<210> 76
<211> 20
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
<400> 76

Pro Ile Arg Gln Glu Glu Cys Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1 5 10 15

Met Trp Glu Val
20

<210> 77
<211> 20
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
<400> 77

Thr Asn Ile Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His
1 5 10 15

Met Pro Gly Lys
20

<210> 78
<211> 20
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 78
 Trp Tyr Glu Gln Asp Ala Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15
 Met Ala Glu Val
 20
 <210> 79
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 79
 Asn Arg Leu Gln Glu Val Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15
 Met Glu Asn Val
 20
 <210> 80
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 80
 Ala Ala Thr Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15
 Met Pro Arg Ser
 20
 <210> 81
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 81
 Leu Arg His Gln Glu Gly Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15
 Met Phe Asp Trp
 20
 <210> 82
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 82
 Val Pro Arg Gln Lys Asp Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15
 Met Tyr Val Gly
 20
 <210> 83
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 83
 Ser Ile Ser His Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15
 Met Gln Val Gly
 20
 <210> 84

<211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 84
 Trp Ala Ala Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15
 Met Gly Arg Met
 20

 <210> 85
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 85
 Thr Trp Pro Gln Asp Lys Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15
 Met Gly Ser Thr
 20

 <210> 86
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 86
 Gly His Ser Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15
 Met Gly Thr Ser
 20

 <210> 87
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 87
 Gln His Trp Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His
 1 5 10 15
 Met Pro Ser Lys
 20

 <210> 88
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 88
 Asn Val Arg Gln Glu Lys Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15
 Met Pro Val Arg
 20

 <210> 89
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 89
 Lys Ser Gly Gln Val Glu Cys Asn Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His

1 5 10 15

Met Pro Arg Asn
20

<210> 90
<211> 20
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
<400> 90
Val Lys Thr Gln Glu His Cys Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1 5 10 15

Met Arg Glu Trp
20

<210> 91
<211> 20
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
<400> 91
Ala Trp Gly Gln Glu Gly Cys Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1 5 10 15

Met Leu Pro Met
20

<210> 92
<211> 20
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
<400> 92
Pro Val Asn Gln Glu Asp Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1 5 10 15

Met Pro Pro Met
20

<210> 93
<211> 20
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
<400> 93
Arg Ala Pro Gln Glu Asp Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His
1 5 10 15

Met Asp Ile Lys
20

<210> 94
<211> 20
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
<400> 94
His Gly Gln Asn Met Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
1 5 10 15

Met Phe Arg Tyr
20

<210> 95
<211> 20
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 95
 Pro Arg Leu Gln Glu Glu Cys Val Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15
 Met Pro Leu Arg
 20
 <210> 96
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 96
 Arg Thr Thr Gln Glu Lys Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15
 Met Glu Ser Gln
 20
 <210> 97
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 97
 Gln Thr Ser Gln Glu Asp Cys Val Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His
 1 5 10 15
 Met Val Ser Ser
 20
 <210> 98
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 98
 Gln Val Ile Gly Arg Pro Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15
 Leu Glu Gly Leu
 20
 <210> 99
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 99
 Trp Ala Gln Gln Glu Glu Cys Ala Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His
 1 5 10 15
 Met Val Gly Leu
 20
 <210> 100
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 100
 Leu Pro Gly Gln Glu Asp Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15
 Met Val Arg Ser
 20
 <210> 101

<211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 101
 Pro Met Asn Gln Val Glu Cys Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15
 Met Pro Arg Ser
 20

<210> 102
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 102
 Phe Gly Trp Ser His Gly Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15
 Met Gly Ser Thr
 20

<210> 103
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 103
 Lys Ser Thr Gln Asp Asp Cys Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15
 Met Val Gly Pro
 20

<210> 104
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 104
 Gly Pro Arg Ile Ser Thr Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His
 1 5 10 15
 Met Asp Gln Leu
 20

<210> 105
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 105
 Ser Thr Ile Gly Asp Met Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His
 1 5 10 15
 Met Gln Val Asp
 20

<210> 106
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 106
 Val Leu Gly Gly Gln Gly Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu

1 5 10 15

Leu Gln Gly Trp
20

<210> 107
<211> 20
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
<400> 107
val Leu Gly Gly Gln Gly Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His
1 5 10 15

Leu Glu Asp Gly
20

<210> 108
<211> 20
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
<400> 108
Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His
1 5 10 15

Met Gln Gly Gly
20

<210> 109
<211> 20
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
<400> 109
Thr Lys Gly Lys Ser Val Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His
1 5 10 15

Met Gln Ser Gly
20

<210> 110
<211> 20
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
<400> 110
Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His
1 5 10 15

Met Gln Gly Gly
20

<210> 111
<211> 20
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
<400> 111
Trp Val Asn Glu Val Val Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asn His
1 5 10 15

Trp Asp Thr Pro
20

<210> 112
<211> 20
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2

<400> 112

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

Met Arg Leu Gln
 20

<210> 113

<211> 20

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2

<400> 113

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

Leu Val Glu Val
 20

<210> 114

<211> 20

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2

<400> 114

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

Ile Val Tyr Arg
 20

<210> 115

<211> 20

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2

<400> 115

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

Met Gln Gly Gly
 20

<210> 116

<211> 20

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2

<400> 116

Thr Ser Gln Arg Val Gly Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln His
 1 5 10 15

Leu Thr Tyr Thr
 20

<210> 117

<211> 20

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2

<400> 117

Gln Trp Ser Trp Pro Pro Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln Thr
 1 5 10 15

Val Trp Pro Ser
 20

<210> 118

<211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 118
 Gly Thr Ser Pro Ser Phe Cys Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His
 1 5 10 15
 Met Val Gln Gly
 20

<210> 119
 <211> 22
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 119
 Gln Asn Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Ala Thr Leu Tyr Glu His
 1 5 10 15
 Phe Ile Phe His Tyr Thr
 20

<210> 120
 <211> 22
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 120
 Leu Asn Phe Thr Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15
 Trp Thr Leu Gln Gln Ser
 20

<210> 121
 <211> 22
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 121
 Thr Lys Phe Asn Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15
 Trp Thr Leu Gln His Gln
 20

<210> 122
 <211> 22
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 122
 Val Lys Phe Lys Pro Leu Asp Ala Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu His
 1 5 10 15
 Trp Met Phe Gln Gln Ala
 20

<210> 123
 <211> 22
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 123
 Val Lys Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Ile Leu Tyr Glu Gln

1 5 10 15

Gln Thr Phe Gln Glu Arg
20

<210> 124
<211> 22
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
<400> 124
Thr Asn Phe Met Pro Met Asp Asp Leu Glu Gln Arg Leu Tyr Glu Gln
1 5 10 15

Phe Ile Leu Gln Gln Gly
20

<210> 125
<211> 22
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
<400> 125
Ser Lys Phe Lys Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln His Ala
20

<210> 126
<211> 22
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
<400> 126
Gln Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
1 5 10 15

Phe Met Leu Gln Gln Ala
20

<210> 127
<211> 22
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
<400> 127
Gln Asn Phe Lys Pro Met Asp Glu Leu Glu Asp Thr Leu Tyr Lys Gln
1 5 10 15

Phe Leu Phe Gln His Ser
20

<210> 128
<211> 22
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
<400> 128
Tyr Lys Phe Thr Pro Leu Asp Asp Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln His Val
20

<210> 129
<211> 22
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2

<400> 129

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

Trp Met Phe His Gln Arg
 20

<210> 130

<211> 22

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2

<400> 130

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

Phe Met Leu Gln His Gln
 20

<210> 131

<211> 22

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2

<400> 131

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

Phe Met Leu Gln Gln Gly
 20

<210> 132

<211> 22

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2

<400> 132

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

Trp Thr Leu Gln Gln Arg
 20

<210> 133

<211> 22

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2

<400> 133

Val Lys Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Trp Leu Tyr His Gln
 1 5 10 15

Phe Thr Leu His His Gln
 20

<210> 134

<211> 22

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2

<400> 134

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

Phe Met Phe Gln Gln Ser
 20

<210> 135

<211> 22
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 135
 Gln Thr Phe Gln Pro Leu Asp Asp Leu Glu Glu Tyr Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15
 Trp Ile Arg Arg Tyr His
 20

<210> 136
 <211> 22
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 136
 Glu Asp Tyr Met Pro Leu Asp Ala Leu Asp Ala Gln Leu Tyr Glu Gln
 1 5 10 15
 Phe Ile Leu Leu His Gly
 20

<210> 137
 <211> 22
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 137
 His Thr Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Tyr Gln
 1 5 10 15
 Trp Leu Tyr Asp Gln Leu
 20

<210> 138
 <211> 22
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 138
 Tyr Lys Phe Asn Pro Met Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Glu
 1 5 10 15
 Phe Leu Phe Gln His Ala
 20

<210> 139
 <211> 22
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 139
 Thr Asn Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Ala Thr Leu Tyr Glu His
 1 5 10 15
 Trp Ile Leu Gln His Ser
 20

<210> 140
 <211> 22
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 140
 Gln Lys Phe Lys Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr Leu Tyr Glu Gln

1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln Gln Arg
20

<210> 141
<211> 22
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
<400> 141
Thr Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln Gln Arg
20

<210> 142
<211> 22
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
<400> 142
Thr Asn Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Gln Thr Leu Tyr Glu Gln
1 5 10 15

Trp Thr Leu Gln Gln Arg
20

<210> 143
<211> 20
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
<400> 143
Ala Gly Gly Met Arg Pro Tyr Asp Gly Met Leu Gly Trp Pro Asn Tyr
1 5 10 15

Asp Val Gln Ala
20

<210> 144
<211> 20
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
<400> 144
Gln Thr Trp Asp Asp Pro Cys Met His Ile Leu Gly Pro Val Thr Trp
1 5 10 15

Arg Arg Cys Ile
20

<210> 145
<211> 20
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
<400> 145
Ala Pro Gly Gln Arg Pro Tyr Asp Gly Met Leu Gly Trp Pro Thr Tyr
1 5 10 15

Gln Arg Ile Val
20

<210> 146
<211> 20
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2

<400> 146

Ser Gly Gln Leu Arg Pro Cys Glu Glu Ile Phe Gly Cys Gly Thr Gln
 1 5 10 15

Asn Leu Ala Leu
 20

<210> 147

<211> 20

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2

<400> 147

Phe Gly Asp Lys Arg Pro Leu Glu Cys Met Phe Gly Gly Pro Ile Gln
 1 5 10 15

Leu Cys Pro Arg
 20

<210> 148

<211> 20

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2

<400> 148

Gly Gln Asp Leu Arg Pro Cys Glu Asp Met Phe Gly Cys Gly Thr Lys
 1 5 10 15

Asp Trp Tyr Gly
 20

<210> 149

<211> 20

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2

<400> 149

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

Asp Lys Gln Thr
 20

<210> 150

<211> 20

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2

<400> 150

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

Asp Asn Gln Ser
 20

<210> 151

<211> 20

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид, способный связываться с Ang-2

<400> 151

Leu Gln Glu Trp Cys Glu Gly Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
 1 5 10 15

Glu Lys Gln Arg
 20

<210> 152

<211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 152
 Ala Gln Asp Tyr Cys Gln Gly Met Gln Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
 1 5 10 15
 Glu Met Gln Lys
 20

<210> 153
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 153
 Leu Leu Asp Tyr Cys Gln Gly Val Gln Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
 1 5 10 15
 Glu Asn Leu Asp
 20

<210> 154
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 154
 His Gln Gln Tyr Cys Gln Gly Met Gln Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
 1 5 10 15
 Glu Tyr Gln Gly
 20

<210> 155
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 155
 Met Leu Asp Tyr Cys Gln Gly Met Asp Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
 1 5 10 15
 Asp Lys Gln Met
 20

<210> 156
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 156
 Leu Gln Asp Tyr Cys Gln Gly Val Gln Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys
 1 5 10 15
 Glu Asn Gln Arg
 20

<210> 157
 <211> 20
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, способный связываться с Ang-2
 <400> 157
 Leu Gln Asp Tyr Cys Gln Gly Val Gln Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys

1	5	10	15
Glu Lys Glu Arg			
	20		
<210>	158		
<211>	20		
<212>	Белок		
<213>	Искусственная последовательность		
<220>			
<223>	Полипептид, способный связываться с Ang-2		
<220>			
<221>	смеш_признаки		
<222>	(1) .. (1)		
<223>	Хаа отсутствует или обозначает нейтральный гидрофобный, нейтральный полярный или основной аминокислотный остаток.		
<220>			
<221>	смеш_признаки		
<222>	(2, 4, 14) .. (19)		
<223>	Хаа обозначает нейтральный гидрофобный или нейтральный полярный аминокислотный остаток.		
<220>			
<221>	смеш_признаки		
<222>	(3, 6) .. (17)		
<223>	Хаа обозначает кислый аминокислотный остаток.		
<220>			
<221>	смеш_признаки		
<222>	(8) .. (8)		
<223>	Хаа обозначает нейтральный гидрофобный аминокислотный остаток.		
<220>			
<221>	смеш_признаки		
<222>	(9) .. (9)		
<223>	Хаа обозначает E, D или Q.		
<220>			
<221>	смеш_признаки		
<222>	(18) .. (18)		
<223>	Хаа обозначает нейтральный гидрофобный, нейтральный полярный или основной аминокислотный остаток.		
<220>			
<221>	смеш_признаки		
<222>	(20) .. (20)		
<223>	Хаа отсутствует или обозначает аминокислотный остаток.		
<400>	158		
хаа хаа хаа хаа Cys хаа Gly хаа хаа Asp Pro Phe Thr хаа Gly Cys	5 10 15		
1			
хаа хаа хаа хаа	20		
<210>	159		
<211>	60		
<212>	ДНК		
<213>	Искусственная последовательность		
<220>			
<223>	ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.		
<400>	159		
ccgacccgtc aggaagaatg cgactgggac ccgtggacct gcgaacacat gtgggaagtt	60		
<210>	160		
<211>	60		
<212>	ДНК		
<213>	Искусственная последовательность		
<220>			
<223>	ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.		
<400>	160		

accaacatcc aggaagaatg cgaatgggac ccgtggacct gcgaccacat gccgggtaaa 60
 <210> 161
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 161
 tggtagaac aggacgcttg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat ggctgaagtt 60
 <210> 162
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 162
 aaccgtctgc aggaagtttg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat ggaaaacgtt 60
 <210> 163
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 163
 gctgtacccc aggaagaatg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat gccgcgttcc 60
 <210> 164
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 164
 ctgcgtcacc aggaaggttg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat gttcgactgg 60
 <210> 165
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 165
 gttccgcgtc agaaagactg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat gtacgttggt 60
 <210> 166
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 166
 tgggctgctc aggaagaatg cgaatgggat ccgtggacct gcgaacacat gggtcgtatg 60
 <210> 167
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 167
 acttgccgc aggaacaatg cgaatgggat ccgtggacct gcgaacacat gggttctact 60
 <210> 168
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 168
 ggtcactccc aggaagaatg cggttgggac csgtggacct gcgaacacat gggtagctcc 60
 <210> 169
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 169
 cagcactggc aggaagaatg cgaatgggac csgtggacct gcgaaccacat gccgtccaaa 60
 <210> 170
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 170
 aacgttcgtc aggaaaaatg cgaatgggac csgtggacct gcgaacacat gccggttcgt 60
 <210> 171
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 171
 aaatccggtc aggttgaatg caactgggac csgtggacct gcgaacacat gccgcgtaac 60
 <210> 172
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 172
 gttaaaacc aggaacactg cgaatgggac csgtggacct gcgaacacat gcgtgaatgg 60
 <210> 173
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 173
 gcttggggtc aggaagggtg cgaatgggac csgtggacct gcgaacacat gctgccgatg 60
 <210> 174
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 174
 ccggttaacc aggaagactg cgaatgggac csgtggacct gcgaacacat gccgccgatg 60
 <210> 175
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 175
 cgtgctccgc aggaagactg cgaatgggac csgtggacct gcgctcacat ggacatcaaa 60

<210> 176
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 176
 cacggcagac acatgggaatg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat gttecgctac -- -- 60

<210> 177
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 177
 ccgcgtctgc aggaagaatg cgtttgggac ccgtggacct gcgaacacat gccgctgcgt 60

<210> 178
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 178
 cgtaccaccc aggaaaaatg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat ggaatccacg 60

<210> 179
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 179
 cagacctccc aggaagactg cgtttgggac ccgtggacct gcgaccacat ggtttcctcc 60

<210> 180
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 180
 caggttatcg gtcgtccgtg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacct ggaaggtctg 60

<210> 181
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 181
 tgggctcagc aggaagaatg cgcttgggac ccgtggacct gcgaccacat ggttggtctg 60

<210> 182
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 182
 ctgcccgggtc aggaagactg cgaatgggac ccgtggacct gcgaacacat ggttcgttcc 60

<210> 183
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 183
 ccgatgaacc aggttgaatg cgaactgggac ccgtggacct gcgaacacat gccgcgttcc 60

 <210> 184
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 184
 ttcggttggt ctcacggttg cgaatgggat ccgtggactt gcgaacacat gggttctacc 60

 <210> 185
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 185
 aatccacc ccaggacgactg cgaactgggac ccgtggacct gcgaacacat ggttggtccg 60

 <210> 186
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 186
 ggtccgcgta tctccacctg ccagtgggac ccgtggacct gcgaacacat ggaccagctg 60

 <210> 187
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 187
 tccaccatcg gtgacatgtg cgaatgggac ccgtggacct gcgctcacat gcaggttgac 60

 <210> 188
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 188
 gttctgggtg gtcagggttg cgaatgggac ccgtggacct gccgtctgct gcagggttgg 60

 <210> 189
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 189
 gttctgggtg gtcagggttg ccagtgggac ccgtggacct gctccacctt ggaagacggt 60

 <210> 190
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 190
 accaccatcg gttccatgtg cgaatgggac ccgtggacct gcgctcacat gcagggttgg 60

 <210> 191

<211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 191
 accaaaggta aatccgtttg ccaagtgggac ccgtggacct gctcccacat gcagtccggt 60

<210> 192
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 192
 accaccatcg gttccatgtg ccaagtgggac ccgtggacct gcgctcacat gcagggtggt 60

<210> 193
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 193
 tgggttaacg aagttgtttg cgaatgggac ccgtggacct gcaaccactg ggacaccccg 60

<210> 194
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 194
 gttgttcagg ttggtatgtg ccaagtgggac ccgtggacct gcaaacacat gcgtctgcag 60

<210> 195
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 195
 gctgttggtt cccagacctg cgaatgggac ccgtggacct gcgctcacct ggttgaagtt 60

<210> 196
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 196
 cagggtatga aaatgttctg cgaatgggac ccgtggacct gcgctcacat cgtttaccgt 60

<210> 197
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 197
 accaccatcg gttccatgtg ccaagtgggac ccgtggacct gcaaacacat gcagggtggt 60

<210> 198
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 198
 acctccacagc gtgttggttg cgaatgggac ccgtggacct gccagcacct gacctacacc 60

<210> 199
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 199
 cagtggtcct ggccgccgtg cgaatgggac ccgtggacct gccagaccgt ttggccgtcc 60

<210> 200
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 200
 ggtacctccc cgtccttctg ccagtgggac ccgtggacct gctccacat ggttcagggt 60

<210> 201
 <211> 42
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 201
 caggaagaat gcgaatggga cccatggact tgcgaacasa tg 42

<210> 202
 <211> 66
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 202
 cagaactaca aaccgctgga cgaactggac gctaccctgt acgaacactt catcttcac 60
 tacacc

<210> 203
 <211> 66
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 203
 ctgaactca ccccgctgga cgaactggaa sagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag 60
 cagtcc 66

<210> 204
 <211> 66
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 204
 accaaattca acccgctgga cgaactggaa sagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag 60
 caccag 66

<210> 205
 <211> 66
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 205

gttaaattca aaccgctgga cgctctggaa cagaccctgt acgaacactg gatgttccag 60
caggct 66

<210> 206
<211> 66
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
<400> 206
gttaaataca aaccgctgga cgaactggac gaaatcctgt acgaacagca gaccttccag 60
gaacgt 66

<210> 207
<211> 66
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
<400> 207
accaattca tgccgatgga cgacctggaa cagcgtctgt acgaacagtt catctgcag 60
caggggt 66

<210> 208
<211> 66
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
<400> 208
tccaaattca aaccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtg gacctgcag 60
cacgct 66

<210> 209
<211> 66
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
<400> 209
cagaattcc agccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtt catgctgcag 60
cagggct 66

<210> 210
<211> 66
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
<400> 210
cagaattca aaccgatgga cgaattggaa gacaccctgt acaaacagtt cctgttccag 60
cactcc 66

<210> 211
<211> 66
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
<400> 211
tacaattca ccccgctgga cgacctggaa cagaccctgt acgaacagtg gacctgcag 60
cacgtt 66

<210> 212
<211> 65
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 212
 aggaatacga accgctggac gaactggacg aaaccctgta caaccagtg atgtccacc 60
 agcgt 65

<210> 213
 <211> 66
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 213
 tccaacttca tgccgctgga cgaactggaa cagaccctgt acgaacagtt catgctgcag 60
 caccag 66

<210> 214
 <211> 66
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 214
 cagaataacc agccgctgga cgaactggac aaaaccctgt acgatcagtt catgctgcag 60
 caggggt 66

<210> 215
 <211> 66
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 215
 cagaattcc agccgctgga cgaactggaa gaaaccctgt acaaacagtg gaccctgcag 60
 cagcgt 66

<210> 216
 <211> 66
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 216
 gttaaatca aaccgctgga cgaactggac gaatggctgt accaceagtt caccctgcac -- 60
 caccag 66

<210> 217
 <211> 67
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 217
 cagaattca tgccgctgga cgaactggac gaatacctgt acgaacagtt catgttccag 60
 cagtccc 67

<210> 218
 <211> 66
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 218
 cagacctcc agccgctgga cgaactggaa gaatacctgt acgaacagtg gatccgtcgt 60
 taccac 66

<210> 219
 <211> 66
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 219
 gaagactaca tgccgctgga cgctctggac gctcagctgt acgaacagtt catcctgctg 60
 cacggt 66

<210> 220
 <211> 66
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 220
 cacaccttcc agccgctgga cgaactggaa gaaaccctgt actaccagtg gctgtacgac 60
 cagctg 66

<210> 221
 <211> 66
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 221
 tacaattca acccgatgga cgaactggaa sagaccctgt acgaagaatt cctgttccag 60
 cagct 66

<210> 222
 <211> 66
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 222
 accaactaca aaccgctgga cgaactggac gctaccctgt acgaacactg gatcctgcag 60
 cactcc 66

<210> 223
 <211> 66
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 223
 sagaaattca aaccgctgga cgaactggaa sagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag 60
 cagcgt 66

<210> 224
 <211> 66
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 224
 accaaattcc agccgctgga cgaactggac sagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag 60
 cagcgt 66

<210> 225
 <211> 66
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 225
 accaacttcc agccgctgga cgaactggac sagaccctgt acgaacagtg gaccctgcag 60
 cagcgt 66

<210> 226
 <211> 60

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.

<400> 226
 aaattcaacc cgctggacga gctggaagag actctgtacg aacagtttac ttttcaacag 60

<210> - 227

<211> 60

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.

<400> 227
 gctggtggtg tgcgtccgta cgaaggatg ctgggttggc cgaactacga cgttcaggct 60

<210> 228

<211> 60

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.

<400> 228
 cagacttggg acgatccgtg catgcacatt ctgggtccgg ttacttggcg tcgttgcacg 60

<210> 229

<211> 60

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.

<400> 229
 gctccgggtc agcgtccgta cgaaggatg ctgggttggc cgaactacca gcgtatcggt 60

<210> 230

<211> 60

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.

<400> 230
 ttcgggtcagc tgcgtccgtg cgaagaaatc ttcgggttgcg gtaccsaga cctgggtctg -- 60

<210> 231

<211> 60

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.

<400> 231
 ttcgggtgaca aacgtccgct ggaatgcatg ttcgggtggtc cgatccagct gtgcccgcgt 60

<210> 232

<211> 60

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.

<400> 232
 ggtcaggacc tgcgtccgtg cgaagacatg ttcgggttgcg gtaccaaga ctgggtacggt 60

<210> 233

<211> 60

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.

<400> 233
 ggtttcgaat actgcgacgg tatggaagac csgttcacct tcggttgсga сааасаgacc 60

 <210> 234
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 234
 ааасгggaat actgcgacgg tatggaagac csgttcaccc agggttgсga саассagтсс 60

 <210> 235
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 235
 сгсagggaat ggtgcgaagg tgttgaagac csgttcacct tcggttgсga аааасagсgt 60

 <210> 236
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 236
 gctcaggact actgcgaagg tatggaagac csgttcacct tcggttgсga аатсgаgааа 60

 <210> 237
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 237
 сгсггgact actgcgaagg tgttcaggac csgttcacct tcggttgсga ааассгggac 60

 <210> 238
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 238
 сассagggaat actgcgaagg tatggaagac csgttcacct tcggttgсga атассagggt 60

 <210> 239
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 239
 атгсгggact actgcgaagg tatggacgac csgttcacct tcggttgсga сааасagatg 60

 <210> 240
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.
 <400> 240
 сгсaggact actgcgaagg tgttgaagac csgttcacct tcggttgсga ааассagсgt 60

 <210> 241
 <211> 60
 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.

<400> 241
ctgcaggact actgcgaagg tgttgaagac ccgttcacct tcggttgcca aaaacagcgt 60

<210> 242

<211> 54

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.

<400> 242
ttcgactact gcgaaggtgt tgaagaccgc ttacttttcg gctgtgataa ccac 54

<210> 243

<211> 250

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая пептид, способный связываться с Ang-2.

<400> 243
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

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

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

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

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

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Cys Thr Ala Gly Tyr His Trp
225 230 235 240

Asn Ser Asp Cys Glu Cys Cys Arg Arg Asn
245 250

<210> 244

<211> 29

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Олигонуклеотид

<400> 244
caaacgaatg gatcctcatt aaagccaga 29

<210> 245

<211> 42

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Олигонуклеотид
 <400> 245
 ggtggtgagg ccgcactcga gactgttgaa agttgttttag ca 42

 <210> 246
 <211> 29
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Олигонуклеотид
 <400> 246
 caaacgaatg gatcctcatt aaagccaga 29

 <210> 247
 <211> 43
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Олигонуклеотид
 <400> 247
 aacacaaaag tgcacagggt ggaggtggtg gtgcggccgc act 43

 <210> 248
 <211> 91
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Олигонуклеотид
 <400> 248
 Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn
 1 5 10 15
 Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn
 20 25 30
 Lys Asn Asn Lys Ser Ala Arg Thr Gly Gly Gly Ala Thr Cys Cys Gly
 35 40 45
 Thr Gly Gly Ala Ser Cys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn
 50 55 60
 Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Cys Ala Thr Thr Cys
 65 70 75 80
 Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala
 85 90

 <210> 249
 <211> 91
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Олигонуклеотид
 <400> 249
 Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn
 1 5 10 15
 Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Ala Ala Lys Cys Gly Lys Cys Cys
 20 25 30
 Lys Asn Asn Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys Ala Thr Lys Thr Thr Lys
 35 40 45
 Gly Gly Lys Gly Gly Lys Asn Asn Lys Ala Cys Lys Thr Ala Lys Cys
 50 55 60
 Ala Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Cys Ala Thr Thr Cys
 65 70 75 80
 Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala
 85 90

 <210> 250
 <211> 95
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Олигонуклеотид
 <400> 250
 Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn
 1 5 10 15
 Asn Lys Ala Ala Lys Thr Thr Lys Ala Ala Lys Cys Cys Lys Cys Thr
 20 25 30
 Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys Cys Thr Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys
 35 40 45
 Ala Cys Lys Cys Thr Lys Thr Ala Lys Gly Ala Lys Cys Ala Lys Thr
 50 55 60
 Thr Lys Ala Cys Lys Thr Thr Lys Cys Ala Lys Cys Ala Lys Asn Asn
 65 70 75 80
 Lys Cys Ala Thr Thr Cys Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr
 85 90 95

<210> 251
 <211> 91
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Олигонуклеотид
 <400> 251
 Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn
 1 5 10 15
 Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Cys Ala Lys Gly Ala Lys Gly Ala
 20 25 30
 Lys Thr Gly Cys Gly Ala Lys Thr Gly Lys Gly Ala Lys Cys Cys Lys
 35 40 45
 Thr Gly Lys Ala Cys Lys Thr Gly Cys Gly Ala Lys Cys Ala Lys Ala
 50 55 60
 Thr Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Asn Asn Lys Cys Ala Thr Thr Cys
 65 70 75 80
 Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala
 85 90

<210> 252
 <211> 89
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Олигонуклеотид
 <400> 252
 Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn
 1 5 10 15
 Asn Lys Thr Thr Lys Gly Ala Lys Thr Ala Lys Asn Asn Lys Gly Ala
 20 25 30
 Lys Gly Gly Lys Gly Thr Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys Cys Cys Lys
 35 40 45
 Thr Thr Lys Ala Cys Lys Thr Thr Lys Gly Gly Lys Asn Asn Lys Gly
 50 55 60
 Ala Lys Ala Ala Lys Cys Ala Lys Asn Asn Lys Cys Ala Thr Thr Cys
 65 70 75 80
 Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr
 85

<210> 253
 <211> 95
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Олигонуклеотид
 <400> 253
 Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Asn
 1 5 10 15
 Asn Lys Ala Ala Lys Thr Thr Lys Ala Ala Lys Cys Cys Lys Cys Thr
 20 25 30
 Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys Cys Thr Lys Gly Ala Lys Gly Ala Lys

```

35      40      45
Ala Cys Lys Cys Thr Lys Thr Ala Lys Gly Ala Lys Cys Ala Lys Thr
50      55      60

Thr Lys Ala Cys Lys Thr Thr Lys Cys Ala Lys Cys Ala Lys Asn Asn
65      70      75      80

Lys Cys Ala Thr Thr Cys Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr
85      90      95

<210> 254
<211> 15
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Олигонуклеотид
<400> 254
cacagtgcac aggggt 15

<210> 255
<211> 16
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Олигонуклеотид
<400> 255
tgatctcgag agaatg 16

<210> 256
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Олигонуклеотид
<400> 256
gttagctcac tcattaggca c 21

<210> 257
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Олигонуклеотид
<400> 257
gtaccgtaac actgagtttc g ----- 21

<210> 258
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Олигонуклеотид
<400> 258
ttacacttta tgcttcg 18

<210> 259
<211> 31
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
<220>
<221> смеш_признаки
<222> (2)..(2)
<223> хаа = Fc

<400> 259
met xaa gly gly gly gly gly ala gln pro ile arg gln glu glu cys
1      5      10      15

Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Trp Glu Val Leu Glu

```

20 25 30

<210> 260
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

<400> 260
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Asn Ile Gln Glu Glu Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His Met Pro Gly Lys Leu Glu
 20 25 30

<210> 261
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

<400> 261
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Tyr Glu Gln Asp Ala Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Ala Glu Val Leu Glu
 20 25 30

<210> 262
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

<400> 262
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Asn Arg Leu Gln Glu Val Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Glu Asn Val Leu Glu
 20 25 30

<210> 263
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

<400> 263
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Ala Thr Gln Glu Glu Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Arg Ser Leu Glu

20 25 30

<210> 264
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа = Fc

<400> 264
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Arg His Gln Glu Gly Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Phe Asp Trp Leu Glu
 20 25 30

<210> 265
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа = Fc

<400> 265
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Val Pro Arg Gln Lys Asp Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Tyr Val Gly Leu Glu
 20 25 30

<210> 266
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа = Fc

<400> 266
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ser Ile Ser His Glu Glu Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gln Val Gly Leu Glu
 20 25 30

<210> 267
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа = Fc

<400> 267
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Ala Ala Gln Glu Glu Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Arg Met Leu Glu

20 25 30

<210> 268
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 268
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Trp Pro Gln Asp Lys Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Ser Thr Leu Glu
 20 25 30

<210> 269
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 269
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly His Ser Gln Glu Glu Cys
 1 5 10 15
 Gly Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Thr Ser Leu Glu
 20 25 30

<210> 270
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 270
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln His Trp Gln Glu Glu Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His Met Pro Ser Lys Leu Glu
 20 25 30

<210> 271
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 271
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Asn Val Arg Gln Glu Lys Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Val Arg Leu Glu

```

20          25          30

<210> 272
<211> 31
<212> Блок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
<220>
<221> смеш_признаки
<222> (2)..(2)
<223> хаа = Fc

<400> 272
Met хaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Ser Gly Gln Val Glu Cys
1          5          10          15

Asn Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Arg Asn Leu Glu
20          25          30

<210> 273
<211> 31
<212> Блок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
<220>
<221> смеш_признаки
<222> (2)..(2)
<223> хаа = Fc

<400> 273
Met хaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Lys Thr Gln Glu His Cys
1          5          10          15

Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Arg Glu Trp Leu Glu
20          25          30

<210> 274
<211> 31
<212> Блок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
<220>
<221> смеш_признаки
<222> (2)..(2)
<223> хаа = Fc

<400> 274
Met хaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Trp Gly Gln Glu Gly Cys
1          5          10          15

Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Leu Pro Met Leu Glu
20          25          30

<210> 275
<211> 31
<212> Блок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
<220>
<221> смеш_признаки
<222> (2)..(2)
<223> хаа = Fc

<400> 275
Met хaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Pro Val Asn Gln Glu Asp Cys
1          5          10          15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Pro Met Leu Glu

```


20 25 30

<210> 276
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 276
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Arg Ala Pro Gln Glu Asp Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Met Asp Ile Lys Leu Glu
 20 25 30

<210> 277
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 277
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln His Gly Gln Asn Met Glu Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Phe Arg Tyr Leu Glu
 20 25 30

<210> 278
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 278
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Pro Arg Leu Gln Glu Glu Cys
 1 5 10 15
 Val Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Leu Arg Leu Glu
 20 25 30

<210> 279
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 279
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Arg Thr Thr Gln Glu Lys Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Glu Ser Gln Leu Glu

20 25 30

<210> 280
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа = Fc

<400> 280
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Thr Ser Gln Glu Asp Cys
 1 5 10 15
 Val Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His Met Val Ser Ser Leu Glu
 20 25 30

<210> 281
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа = F

<400> 281
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Val Ile Gly Arg Pro Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Leu Glu Gly Leu Leu Glu

20 25 30

<210> 282
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа = Fc

<400> 282
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Ala Gln Gln Glu Glu Cys
 1 5 10 15
 Ala Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asp His Met Val Gly Leu Leu Glu
 20 25 30

<210> 283
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа = Fc

<400> 283
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Pro Gly Gln Glu Asp Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Val Arg Ser Leu Glu

20 25 30

<210> 284
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа = Fc

<400> 284
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Pro Met Asn Gln Val Glu Cys
 1 5 10 15
 Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Pro Arg Ser Leu Glu
 20 25 30

<210> 285
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа = Fc

<400> 285
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Phe Gly Trp Ser His Glu Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gly Ser Thr Leu Glu
 20 25 30

<210> 286
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа = Fc

<400> 286
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Ser Thr Gln Asp Asp Cys
 1 5 10 15
 Asp Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Val Gly Pro Leu Glu
 20 25 30

<210> 287
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа = Fc

<400> 287
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Pro Arg Ile Ser Thr Cys
 1 5 10 15
 Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Asp Gln Leu Leu Glu

20 25 30

<210> 288
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 288
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ser Thr Ile Gly Asp Met Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Met Gln Val Asp Leu Glu
 20 25 30

<210> 289
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 289
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Leu Gly Gly Gln Gly Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu
 20 25 30

<210> 290
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 290
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Leu Gly Gly Gln Gly Cys
 1 5 10 15
 Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His Leu Glu Asp Gly Leu Glu
 20 25 30

<210> 291
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 291
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Met Gln Gly Gly Leu Glu

20 25 30

<210> 292
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 292
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Lys Gly Lys Ser Val Cys
 1 5 10 15
 Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His Met Gln Ser Gly Leu Glu
 20 25 30

<210> 293
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 293
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys
 1 5 10 15
 Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Met Gln Gly Gly Leu Glu

20 25 30

<210> 294
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 294
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Val Asn Glu Val Val Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asn His Trp Asp Thr Pro Leu Glu
 20 25 30

<210> 295
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 295
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Val Gln Val Gly Met Cys
 1 5 10 15
 Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Lys His Met Arg Leu Gln Leu Glu

20 25 30

<210> 296
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 296
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Val Gly Ser Gln Thr Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Leu Val Glu Val Leu Glu
 20 25 30

<210> 297
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 297
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Gly Met Lys Met Phe Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala His Ile Val Tyr Arg Leu Glu

20 25 30

<210> 298
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 298
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Thr Ile Gly Ser Met Cys
 1 5 10 15
 Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met Gln Gly Gly Leu Glu
 20 25 30

<210> 299
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 299
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Ser Gln Arg Val Gly Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln His Leu Thr Tyr Thr Leu Glu

20 25 30

<210> 300
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 300
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Trp Ser Trp Pro Pro Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln Thr Val Trp Pro Ser Leu Glu
 20 25 30

<210> 301
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 301
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Thr Ser Pro Ser Phe Cys
 1 5 10 15
 Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser His Met Val Gln Gly Leu Glu
 20 25 30

<210> 302
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 302
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Gln Gly Leu His Gln Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Lys Val Leu Trp Pro Ser Leu Glu
 20 25 30

<210> 303
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 303
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Val Trp Arg Ser Gln Val Cys
 1 5 10 15
 Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Asn Leu Gly Gly Asp Trp Leu Glu
 20 25 30

20 25 30

<210> 304
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 304
 Met xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Asp Lys Ile Leu Glu Glu Cys
 1 5 10 15
 Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln Phe Phe Tyr Gly Ala Leu Glu
 20 25 30

<210> 305
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 305
 Met xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Thr Phe Ala Arg Gln Cys
 1 5 10 15
 Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ala Leu Gly Gly Asn Trp Leu Glu

20 25 30

<210> 306
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 306
 Met xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Pro Ala Gln Glu Glu Cys
 1 5 10 15
 Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu Pro Leu Pro Leu Met Leu Glu
 20 25 30

<210> 307
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 307
 Met xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Arg Pro Glu Asp Met Cys Ser
 1 5 10 15
 Gln Trp Asp Pro Trp Thr Trp His Leu Gln Gly Tyr Cys Leu Glu


```

20          25          30

<210> 308
<211> 31
<212> Блок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
<220>
<221> смеш_признаки
<222> (2)..(2)
<223> хаа = Fc

<400> 308
Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Trp Gln Leu Ala Val Cys
1          5          10          15

Gln Trp Asp Pro Gln Thr Cys Asp His Met Gly Ala Leu Leu Glu
20          25          30

<210> 309
<211> 31
<212> Блок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
<220>
<221> смеш_признаки
<222> (2)..(2)
<223> хаа = Fc

<400> 309
Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Gln Leu Val Ser Leu Cys
1          5          10          15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Asp Gly Trp Leu Glu
20          25          30

<210> 310
<211> 31
<212> Блок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
<220>
<221> смеш_признаки
<222> (2)..(2)
<223> хаа = Fc

<400> 310
Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Met Gly Gly Ala Gly Arg Cys
1          5          10          15

Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Gln Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu
20          25          30

<210> 311
<211> 31
<212> Блок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
<220>
<221> смеш_признаки
<222> (2)..(2)
<223> хаа = Fc

<400> 311
Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Met Phe Leu Pro Asn Glu Cys
1          5          10          15

Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Ser Asn Leu Pro Glu Ala Leu Glu
20          25          30

```

20 25 30

<210> 312
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 312
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Phe Gly Trp Ser His Gly Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu
 20 25 30

<210> 313
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 313
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Trp Pro Gln Thr Glu Gly Cys
 1 5 10 15
 Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu His Gly Trp Leu Glu
 20 25 30

<210> 314
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 314
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Pro Asp Thr Arg Gln Gly Cys
 1 5 10 15
 Gln Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Tyr Gly Met Trp Leu Glu
 20 25 30

<210> 315
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 315
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Trp Pro Gln Asp Lys Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu

20 25 30

<210> 316
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа = Fc

<400> 316
 Met xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Asp Lys Ile Leu Glu Glu Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu
 20 25 30

<210> 317
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа = Fc

<400> 317
 Met xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Ala Thr Gln Glu Glu Cys
 1 5 10 15
 Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Arg Leu Leu Gln Gly Trp Leu Glu
 20 25 30

<210> 318
 <211> 34
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (34)..(34)
 <223> Хаа = Fc

<400> 318
 Met Gly Ala Gln Thr Asn Phe Met Pro Met Asp Asp Leu Glu Gln Arg
 1 5 10 15
 Leu Tyr Glu Gln Phe Ile Leu Gln Gln Gly Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30
 Gly xaa

<210> 319
 <211> 34
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (34)..(34)
 <223> Хаа = Fc

<400> 319
 Met Gly Ala Gln Thr Asn Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Ala Thr

1 5 10 15
 Leu Tyr Glu His Trp Ile Leu Gln His Ser Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30
 Gly Xaa
 <210> 320
 <211> 34
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(34)
 <223> Xaa = Fc
 <400> 320
 Met Gly Ala Gln Gln Lys Tyr Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Lys Thr
 1 5 10 15
 Leu Tyr Asp Gln Phe Met Leu Gln Gln Gly Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30
 Gly Xaa
 <210> 321
 <211> 34
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (34)..(34)
 <223> Xaa = Fc
 <400> 321
 Met Gly Ala Gln Leu Asn Phe Thr Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr
 1 5 10 15
 Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln Gln Ser Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30
 Gly Xaa
 <210> 322
 <211> 34
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (34)..(34)
 <223> Xaa = Fc
 <400> 322
 Met Gly Ala Gln Gln Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr
 1 5 10 15
 Leu Tyr Glu Gln Phe Met Leu Gln Gln Ala Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30
 Gly Xaa
 <210> 323
 <211> 34
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 323

Met Gly Ala Gln Gln Glu Tyr Glu Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Thr
1 5 10 15

Leu Tyr Asn Gln Trp Met Phe His Gln Arg Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Xaa

<210> 324

<211> 34

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 324

Met Gly Ala Gln Val Lys Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Ile
1 5 10 15

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

Gly Xaa

<210> 325

<211> 34

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 325

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

Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln Gln Arg Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Xaa

<210> 326

<211> 34

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 326

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

Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln Gln Arg Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Хаа

<210> 327
 <211> 34
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (34)..(34)
 <223> Хаа = Fc

<220>
 <221> ' смеш_признаки
 <222> (34)..(34)
 <223> хаа = Fc

<400> 327
 Met Gly Ala Gln Gln Asn Phe Lys Pro Met Asp Glu Leu Glu Asp Thr
 1 5 10 15
 Leu Tyr Lys Gln Phe Leu Phe Gln His Ser Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly хаа

<210> 328
 <211> 34
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (34)..(34)
 <223> Хаа = Fc

<400> 328
 Met Gly Ala Gln Val Lys Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Glu Trp
 1 5 10 15
 Leu Tyr His Gln Phe Thr Leu His His Gln Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Хаа

<210> 329
 <211> 34
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (34)..(34)
 <223> Хаа = Fc

<400> 329
 Met Gly Ala Gln Tyr Lys Phe Thr Pro Leu Asp Asp Leu Glu Gln Thr
 1 5 10 15
 Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln His Val Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Хаа

<210> 330
 <211> 34
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (34)..(34)
 <223> хаа = Fc

 <400> 330
 Met Gly Ala Gln Gln Asn Tyr Lys Pro Leu Asp Glu Leu Asp Ala Thr
 1 5 10 15
 Leu Tyr Glu His Phe Ile Phe His Tyr Thr Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30
 Gly Хаа

 <210> 331
 <211> 34
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (34)..(34)
 <223> хаа = Fc

 <400> 331
 Met Gly Ala Gln Val Lys Phe Lys Pro Leu Asp Ala Leu Glu Gln Thr
 1 5 10 15
 Leu Tyr Glu His Trp Met Phe Gln Gln Ala Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30
 Gly Хаа

 <210> 332
 <211> 34
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (34)..(34)
 <223> хаа = Fc

 <400> 332
 Met Gly Ala Gln Glu Asp Tyr Met Pro Leu Asp Ala Leu Asp Ala Gln
 1 5 10 15
 Leu Tyr Glu Gln Phe Ile Leu Leu His Gly Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30
 Gly Хаа

 <210> 333
 <211> 34
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (34)..(34)
 <223> хаа = Fc

 <400> 333
 Met Gly Ala Gln Tyr Lys Phe Asn Pro Met Asp Glu Leu Glu Gln Thr
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu₂₀ Glu Phe Leu Phe Gln₂₅ His Ala Leu Glu Gly₃₀ Gly Gly Gly

Gly Хаа

<210> 334

<211> 34

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (34)..(34)

<223> Хаа = Fc

<400> 334

Met Gly Ala Gln₅ Ser Asn Phe Met Pro Leu Asp Glu₁₀ Leu Glu₁₅ Gln Thr

Leu Tyr Glu₂₀ Gln Phe Met Leu Gln₂₅ His Gln Leu Glu Gly₃₀ Gly Gly Gly

Gly Хаа

<210> 335

<211> 34

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (34)..(34)

<223> Хаа = Fc

<400> 335

Met Gly Ala Gln₅ Lys Phe Gln Pro Leu Asp Glu₁₀ Leu Glu₁₅ Glu Thr

Leu Tyr Lys Gln₂₀ Trp Thr Leu Gln₂₅ Gln Arg Leu Glu Gly₃₀ Gly Gly Gly

Gly Хаа

<210> 336

<211> 34

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (34)..(34)

<223> Хаа = Fc

<400> 336

Met Gly Ala Gln₅ Lys Phe Met Pro Leu Asp Glu₁₀ Leu Asp₁₅ Glu Ile

Leu Tyr Glu₂₀ Gln Phe Met Phe Gln₂₅ Ser Leu Glu Gly₃₀ Gly Gly Gly

Gly Хаа

<210> 337

<211> 34

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 337

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

Gly Xaa

<210> 338

<211> 34

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 338

Met Gly Ala Gln His Thr Phe Gln Pro Leu Asp Glu Leu Glu Glu Thr
1 5 10 15Leu Tyr Tyr Gln Trp Leu Tyr Asp Gln Leu Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Xaa

<210> 339

<211> 34

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 339

Met Gly Ala Gln Gln Lys Phe Lys Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr
1 5 10 15Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln Gln Arg Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Xaa

<210> 340

<211> 34

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2

<220>

<221> смеш_признаки

<222> (34)..(34)

<223> Xaa = Fc

<400> 340

Met Gly Ala Gln Gln Thr Phe Gln Pro Leu Asp Asp Leu Glu Glu Tyr
1 5 10 15Leu Tyr Glu Gln Trp Ile Arg Arg Tyr His Leu Glu Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Xaa

<210> 341
 <211> 34
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (34)..(34)
 <223> хаа = Fc

<400> 341
 Met Gly Ala Gln Ser Lys Phe Lys Pro Leu Asp Glu Leu Glu Gln Thr
 1 5 10 15
 Leu Tyr Glu Gln Trp Thr Leu Gln His Ala Leu Glu Gly Gly Gly Gly
 20 25 30
 Gly хаа

<210> 342
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 342
 Met хаа Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ser Gly Gln Leu Arg Pro Cys
 1 5 10 15
 Glu Glu Ile Phe Gly Cys Gly Thr Gln Asn Leu Ala Leu Leu Glu
 20 25 30

<210> 343
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 343
 Met хаа Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Gly Gly Met Arg Pro Tyr
 1 5 10 15
 Asp Gly Met Leu Gly Trp Pro Asn Tyr Asp Val Gln Ala Leu Glu
 20 25 30

<210> 344
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 344
 Met хаа Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Gln Asp Leu Arg Pro Cys

1 5 10 15

Glu Asp Met Phe Gly Cys Gly Thr Lys Asp Trp Tyr Gly Leu Glu
20 25 30

<210> 345
<211> 31
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
<220>
<221> смеш_признаки
<222> (2)..(2)
<223> хаа = Fc

<400> 345

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Pro Gly Gln Arg Pro Tyr
1 5 10 15

Asp Gly Met Leu Gly Trp Pro Thr Tyr Gln Arg Ile Val Leu Glu
20 25 30

<210> 346
<211> 31
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
<220>
<221> смеш_признаки
<222> (2)..(2)
<223> хаа = Fc

<400> 346

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gln Thr Trp Asp Asp Pro Cys

1 5 10 15

Met His Ile Leu Gly Pro Val Thr Trp Arg Arg Cys Ile Leu Glu
20 25 30

<210> 347
<211> 31
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
<220>
<221> смеш_признаки
<222> (2)..(2)
<223> хаа = Fc

<400> 347

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

Glu Cys Met Phe Gly Gly Pro Ile Gln Leu Cys Pro Arg Leu Glu
20 25 30

<210> 348
<211> 25
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
<220>
<221> смеш_признаки
<222> (2)..(2)
<223> хаа = Fc

<400> 348

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Arg Pro Cys Glu Glu Ile

1 5 10 15

Phe Gly Gly Cys Thr Tyr Gln Leu Glu
20 25

<210> 349
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа = Fc

<400> 349
 Met хaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Gln Glu Trp Cys Glu Gly
1 5 10 15
 Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Lys Gln Arg Leu Glu
20 25 30

<210> 350
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа = Fc

<400> 350
 Met хaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Met Leu Asp Tyr Cys Glu Gly
1 5 10 15
 Met Asp Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Asp Lys Gln Met Leu Glu
20 25 30

<210> 351
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа = Fc

<400> 351
 Met хaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln His Gln Glu Tyr Cys Glu Gly
1 5 10 15
 Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Tyr Gln Gly Leu Glu
20 25 30

<210> 352
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа = Fc

<400> 352
 Met хaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Gln Asp Tyr Cys Glu Gly

1 5 10 15

Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Asn Gln Arg Leu Glu
20 25 30

<210> 353
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 353
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Leu Asp Tyr Cys Glu Gly
1 5 10 15

Val Gln Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Asn Leu Asp Leu Glu
20 25 30

<210> 354
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 354
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Gly Phe Glu Tyr Cys Asp Gly

1 5 10 15

Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Asp Lys Gln Thr Leu Glu
20 25 30

<210> 355
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 355
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Ala Gln Asp Tyr Cys Glu Gly
1 5 10 15

Met Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Met Gln Lys Leu Glu
20 25 30

<210> 356
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> хаа = Fc

<400> 356
 Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Leu Gln Asp Tyr Cys Glu Gly

1 5 10 15

Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Glu Lys Gln Arg Leu Glu
20 25 30

<210> 357
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

<400> 357

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Ala Gln Lys Leu Glu Tyr Cys Asp Gly
1 5 10 15

Met Glu Asp Pro Phe Thr Gln Gly Cys Asp Asn Gln Ser Leu Glu
20 25 30

<210> 358
 <211> 29
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> "Пептитела", способные связываться с Ang-2
 <220>
 <221> смеш_признаки
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Fc

<400> 358

Met Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gln Phe Asp Tyr Cys Glu Gly Val

1 5 10 15

Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Cys Asp Asn His Leu Glu
20 25

<210> 359
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид, связывающийся с Ang-2
 <400> 359

Cys Gly Gly Gly Gly Ala Gln Thr Asn Phe Met Pro Met Asp Asp
1 5 10 15

Leu Glu Gln Arg Leu Tyr Glu Gln Phe Ile Leu Gln Gln Gly Leu Glu
20 25 30



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2/6