



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 322643

(13) B1

(51) Int Cl.

C07K 14/47 (2006.01)

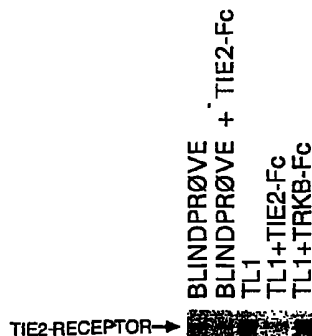
C12N 15/12 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19971557	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1995.10.06 PCT/US95/12935
(22)	Inng.dag	1997.04.04	(85)	Videreføringsdag	1997.04.04
(24)	Løpedag	1995.10.06	(30)	Prioritet	1994.10.07, US, 319932 1994.10.27, US, 330261 1994.12.02, US, 348492 1994.12.09, US, 353503 1995.01.17, US, 373579 1995.04.06, US, 418595
(41)	Alm.tilgj	1997.06.06			
(45)	Meddelt	2006.11.13			
(83)	Biol.mat. dep	ATCC nr. 75910, ATCC nr. VR2484, ATCC nr. 75928, ATCC nr. 75963			
(73)	Innehaver	Regeneron Pharmaceuticals Inc , 777 Old Saw Mill River Road, NY10591 TARRYTOWN, US			
(72)	Oppfinner	Peter C. Maison-Pierre, Croton, NY, US Samuel Davis, New York, NY, US Czeslaw Radziejewski, North White Plains, NY, US Joanne Bruno, Bloomington, NJ, US Mitchell Goldfarb, River Edge, NJ, US Thomas H. Aldrich, Ossining, NY, US Pamela F. Jones, Fairfield, CT, US George D Yancopoulos, 1519 Baptist Church Road, NY10598 YORKTOWN HEIGHTS, US			
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS , Postboks 7007 Majorstua, 0306 OSLO, NO			
(54)	Benevnelse	Isolert nukleinsyremolekyl som koder for TIE-2-ligand, TIE-2-ligand, fremgangsmåte ved fremstilling og anvendelse derav, samt antistoff mot TIE-2-liganden.			
(56)	Anførte publikasjoner	Ingen			
(57)	Sammendrag	Foreliggende oppfinnelse frembringer et isolert nukleinsyremolekyl som koder for en human TIE-2-ligand. I tillegg frembringer oppfinnelsen et receptorlegeme som spesifikt binder en human TIE-2-ligand. Oppfinnelsen frembringer også et antistoff som spesifikt binder en human TIE-2-ligand. Oppfinnelsen frembringer ytterligere en antagonist mot human TIE-2. Oppfinnelsen frembringer også terapeutiske blandinger samt en fremgangsmåte ved blokkering av blodkarvekst, en fremgangsmåte ved fremming av neovaskularisering, en fremgangsmåte ved fremming av veksten eller differensieringen av en celle som uttrykker TIE-2-receptor, en fremgangsmåte ved blokkering av veksten eller differensieringen av en celle som uttrykker TIE-2-receptor, og en fremgangsmåte ved svekking eller forebygging av svulstvekst hos et menneske.			



Foreliggende oppfinnelse vedrører nye ligander, benevnt TIE-2-ligander som angitt i krav 11, som binder TIE-2-receptor, samt fremgangsmåter ved fremstilling og anvendelse av TIE-2-ligandene som angitt i henholdsvis krav 17 og krav 5 27. Oppfinnelsen vedrører dessuten nukleinsyresekvenser som koder for TIE-2-ligander som angitt i krav 1 og 3. TIE-2-ligander samt nukleinsyrer som koder for dem, kan være nyttige ved diagnostisering og behandling av bestemte sykdommer som er forbundet med endotelceller og forbundne TIE-receptorer, så som neoplastiske sykdommer omfattende tumorangiogenese, sårleging, tromboemboliske sykdommer, aterosklerose og inflammatoriske sykdommer. Generelt kan biologisk aktive TIE-2-ligander anvendes for å fremme veksten, overlevelsen og/eller differensieringen av celler som uttrykker 10 TIE-2-receptor. En biologisk aktiv TIE-2-ligand kan anvendes ved *in vitro*-vedlikehold av TIE-2-receptor-uttrykkende celler i kultur. Celler og vev som uttrykker TIE-2-receptor, omfatter f.eks. hjerte- og vaskulære endotelceller, linseepitler og hjerteepikarder. Alternativt kan slike ligander 15 anvendes for å støtte celler som er utviklet for å uttrykke TIE-2-receptor. Videre kan TIE-2-ligander og deres kognate receptorer anvendes i assay-systemer for å identifisere agonister eller antagonist av TIE-2-receptor.

25

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

Den cellulære oppførsel som er ansvarlig for utvikling, vedlikehold og reparasjon av differensierte celler og vev, reguleres for en stor del av intercellulære signaler som 30 formidles via vekstfaktorer og lignende ligander og deres receptorer. Receptorene er plassert på overflaten av mottakelige celler, og de binder peptider eller polypeptider som er kjent som vekstfaktorer, samt andre hormonlignende ligander. Resultatene av denne vekselvirkning er raske 35 biokjemiske forandringer i de mottakelige celler, samt en rask og en langvarig omjustering av den cellulære gen-

ekspresjon. Flere receptorer forbundet med forskjellige celleoverflater kan binde spesifikke vekstfaktorer.

Tyrosinkinasefosforylering av tyrosin på proteiner er en av
5 nøkkelmåtene ved hvilke signaler omsettes gjennom plasma-
membranen. Det er pr. i dag kjent flere proteintyrosinki-
nasegener som koder for transmembrane receptorer for poly-
peptide vekstfaktorer og hormoner, så som epidermal vekst-
faktor (EGF), insulin, insulinlignende vekstfaktor-I
10 (IGF-I), blodplatederiverte vekstfaktorer (PDGF-A og -B)
samt fibroblastvekstfaktorer (FGF). Heldin et al., Cell
Regulation, 1:555-566 (1990); Ullrich et al., Cell, 61:243-
254 (1990). I hvert tilfelle utøver disse vekstfaktorer sin
virkning ved å binde seg til det ekstracellulære parti av
15 sine kognate receptorer, hvilket fører til aktivering av
den indre tyrosinkinase som foreligger i cytoplasmapartiet
av receptoren. Vekstfaktorreceptorer av endotelceller er
spesielt interessante på grunn av den mulige implikasjon av
vekstfaktorer i flere viktige fysiologiske og patologiske
20 prosesser, så som vaskulogenese, angiogenese, aterosklerose
og inflammatoriske sykdommer. Folkman et al., Science,
235:442-447 (1987). Dessuten er receptorene for flere hema-
topoetiske vekstfaktorer tyrosinkinase; disse omfatter
c-fms, som er den kolonistimulerende faktor 1-receptor
25 (Sherr et al., Cell, 41:665-676 (1985)) og c-kit, en primi-
tiv hematopoetisk vekstfaktor-receptor som beskrives av
Huang et al., Cell, 63:225-233 (1990).

Receptor-tyrosinkinase klassifiseres i evolusjonære un-
30 derklasser basert på den karakteristiske struktur av deres
ytte partier. Ullrich et al., Cell, 61:243-254 (1990).
Disse underklasser omfatter EGF-receptorlignende kinase
(underklasse I) og insulinreceptorlignende kinase (under-
klasse II), hver av hvilke inneholder gjentatte homologe
35 cysteinrike sekvenser i sine ekstracellulære partier. Et
enkelt cysteinrikt parti er også å finne i de ekstracellu-
lære partier av eph-lignende kinase. Hirai et al., Science,

238:1717-1720 (1987); Lindberg et al., Mol. Cell. Biol.,
10:6316-6324 (1990); Lhotak et al., Mol. Cell. Biol.
11:2496-2502 (1991). PDGF-receptorer samt c-fms- og c-kit-
receptortyrosinkinase kan grupperes i underklassen III,
5 mens FGF-receptorer danner underklasse IV. Typisk for ele-
mentene av disse to underklasser er ekstracellulære foldede
enheter som stabiliseres ved intrakjededisulfidbindinger.
Disse såkalte immunoglobulin (Ig)-lignende foldinger, fin-
nes i de proteiner av immunoglobulin-superfamilien som
10 inneholder mangfoldige andre celleoverflatereceptorer med
enten cellebundne eller oppløselige ligander. Williams et
al., Ann. Rev. Immunol. 6:381-405 (1988).

Receptortyrosinkinasene varierer i sin spesifisitet og
15 affinitet. Generelt er receptortyrosinkinasene glykopro-
teiner som består av (1) et ekstracellulært parti med evnen
til å binde den/de spesifikke vekstfaktor(er); (2) et
transmembrant parti som vanligvis er et alfa-helisk parti av
proteinet; (3) et membrantilstøtende parti hvor receptoren
20 kan reguleres ved f.eks. proteinfosorylering; (4) et tyro-
sinkinaseparti, som er den enzymatiske komponent av recep-
toren, og (5) en karboksylende hale, som i mange receptorer
er implisert i gjenkjenningen og bindingen av substratene
for tyrosinkinase.

25 Det er blitt beskrevet at fremgangsmåter så som alternativ
exon-spaltning og alternativt valg av genpromotor eller po-
lyadenylasjonsstilling, kan fremkalle flere forskjellige
polypeptider fra samme gen. Disse polypeptider kan valg-
30 fritt inneholde de forskjellige partier som ble oppført
ovenfor. Som en konsekvens kan enkelte ekstracellulære par-
tier uttrykkes som separate, utsondrede proteiner, og enk-
elte former av receptoren kan mangle tyrosinkinasepartiet
og kun inneholde det ekstracellulære parti som er innstuk-
ket i plasmamembranen via det transmembrane parti og en
35 kort karboksylende hale.

Et gen som koder for endotelcelle-transmembran tyrosinkinase, opprinnelig benevnt RT-PCR og beskrevet som et ukjent tyrosinkinase-homologt cDNA-fragment fra humane leukemiceller, ble beskrevet av Partanen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:8913-8917 (1990). Dette gen og proteinet som kodes derav, benevnes "tie", hvilket er en forkortelse for "tyrosinkinase med Ig- og EGF-homologi-partier". Partanen et al., Mol. Cell. Biol. 12: 1698-1707 (1992).

Det er rapportert at *tie*-mRNA foreligger i alle humane føtale vev og muse-embryovev. Ved nærmere undersøkelse er *tie*-meddelermaterialet blitt lokalisert til hjerte- og vaskulære endotelceller. *tie*-mRNA er blitt lokalisert i endoteler av blodkar og endokardium i 9,5 til 18,5 dager gamle museembryoer. En forsterket ekspresjon av *tie* ble påvist under neovaskulariseringen forbundet med utviklingen av eggstokkfollikler og granulasjonsvev i hudsår. Korhonen et al., Blood 80:2548-2555 (1992). Således er det blitt foreslått at *tie* spiller en rolle ved angiogenese, som er viktig for behandlinger som er i utvikling mot faste svulster og flere andre angiogeneseavhengige sykdommer, så som diabetisk retinopati, psoriasis, aterosklerose og artritt.

To strukturelt beslektede rotte-TIE-reseptorproteiner har blitt rapportert å kodes av forskjellige gener med beslektede ekspresjonsprofiler. Ett gen, som benevnes *tie-1*, er rottehomologen av humant *tie*. Maisonpierre et al., Oncogene 8:1631-1637 (1993). Det andre gen, *tie-2*, kan være rottehomologen av murint *tek*-gen som, liksom *tie*, rapporteres å uttrykkes i rotten utelukkende i endotelceller og deres antatte forløpere. Dumont et al., Oncogene 8:1293-1301 (1993). Begge gener syntes å uttrykkes i stor grad i endotelceller i embryonisk og postnatale vev. Signifikante nivåer av *tie-2*-transkripsjoner forelå også i andre embryonale cellepopulasjoner, omfattende linseepitel, hjerteepi-

kard og områder av mesenkym. Maisonnier et al., Oncogene 8:1631-1637 (1993).

Den overveiende ekspresjon av TIE-receptor i vaskulære endoteler, tyder på at TIE spiller en rolle ved utviklingen og vedlikeholdet av det vaskulære system. Dette kan omfatte roller i endotelcellebestemmelsen, proliferasjonen, differensieringen og cellemigreringen og mønsterdannelsen til vaskulære elementer. Det rapporteres at analyser av muse-embryoer med TIE-2-mangel viste at TIE-2 er viktig for angiogenesen, spesielt for dannelsen av et vaskulært nettverk i endotelceller. Sato, T.N. et al., Nature 376:70-74 (1994). I et modent vaskulært system kan TIE innvirke på endotelcellers overlevelse, vedlikehold og respons til patogene innflytelser.

SAMMENFATNING AV OPPFINNELSEN

Foreliggende oppfinnelse frembringer en sammensetning som angitt i krav 25 og som omfatter en TIE-2-ligand som er vesentlig fri for andre proteiner. Oppfinnelsen frembringer også et isolert nukleinsyremolekyl som koder for en TIE-2-ligand som angitt i krav 1. Den isolerte nukleinsyre kan være DNA, cDNA eller RNA. Oppfinnelsen frembringer også en vektor som omfatter et isolert nukleinsyremolekyl som koder for en TIE-2-ligand. Oppfinnelsen frembringer dessuten et verts-vektorsystem for fremstilling i en egnet vertscelle av et polypeptid med den biologiske aktivitet av en TIE-2-ligand. Den egnede vertscelle kan være en bakteriell celle, en gjærscelle, en insektscelle eller en pattedyrscelle. Oppfinnelsen frembringer også en fremgangsmåte ved fremstilling av et polypeptid med den biologiske aktivitet av en TIE-2-ligand, som omfatter å dyrke celler av verts-vektorsystemet under betingelser som tillater fremstilling av polypeptidet og å isolere det således fremstilte polypeptid.

Oppfinnelsen beskrevet heri av et isolert nukleinsyre-
molekyl som koder for en TIE-2-ligand, frembringer ytterli-
gere utviklingen av liganden, som terapeutisk middel for
behandling av pasienter som lider av forstyrrelser omfat-
5 tende celler, vev eller organer som uttrykker TIE-receptor.
Foreliggende oppfinnelse frembringer også et antistoff som
spesifikt binder et slikt terapeutisk molekyl. Antistoffet
kan være monoklonalt eller polyklonalt. Et slikt monoklo-
nalt eller polyklonalt antistoff kan også brukes for å måle
10 mengden terapeutisk molekyl i en prøve som er tatt fra en
pasient, med den hensikt å overvåke terapiens fremskritt.

Foreliggende oppfinnelse frembringer også et antistoff som
spesifikt binder en TIE-2-ligand. Antistoffet kan være
15 monoklonalt eller polyklonalt. Således frembringer oppfin-
nelsen ytterligere terapeutiske sammensetninger omfattende
et antistoff som spesifikt binder en TIE-2-ligand, i et
farmasøytisk akseptabelt bæremiddel.

20 Oppfinnelsen frembringer ytterligere terapeutiske sammen-
setninger som omfatter en TIE-2-ligand i et farmasøytisk
akseptabelt bæremiddel. I én utførelse kan sammensetningen
anvendes for å fremme sårleging. I en annen utførelse kan
sammensetningen anvendes ved behandling av iskemi.

25 En TIE-2-ligand kan alternativt konjugeres med et cytotok-
sisk middel samt en terapeutisk sammensetning fremstilt
derav.

30 KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

FIGURENE 1A og 1B: TIE-2-receptorlegeme (TIE-2-RB) hemmer
utviklingen av blodkar i embryonal kylling-chorioallan-
toinmembran (CAM). Et enkelt stykke resorberbart gelatin-
skum ("Gelfoam") som var bløtet med 6 µg RB, ble innført
35 direkte under CAM i 1 dag gamle kyllingembryoer. Etter 3
dagers inkubasjon ble de 4 dager gamle embryoer og deres

omliggende CAM, fjernet og undersøkt. FIGUR 1A: embryoer behandlet med EHK-1-RB (rEHK-1 ekto/h IgG1 Fc) var levedyktige og oppviste normalt utviklede blodkar i sin omliggende CAM. FIGUR 1B: alle embryoer som var behandlet med TIE-2-RB (r TIE-2 ekto/h IgG1 Fc) var døde, av liten størrelse og nesten fullstendig uten omliggende blodkar.

FIGUR 2: Vektor pJFE14.

10 FIGUR 3: Restriksjonskart over λ gt10.

FIGUR 4: Nukleinsyresekvens og utledet aminosyresekvens (kode med enkelt bokstav) for human TIE-2-ligand fra klonen λ gt10, som koder for htie-2-ligand 1.

15

FIGUR 5: Nukleinsyresekvens og utledet aminosyresekvens (kode med enkelt bokstav) for human TIE-2-ligand fra T98G-klon.

20 FIGUR 6: Nukleinsyresekvens og utledet aminosyresekvens (kode med enkelt bokstav) for human TIE-2-ligand fra klonen pBluescript KS som koder for human TIE-2-ligand 2.

FIGUR 7: "Western blot" som viser aktiveringen av TIE-2-receptor ved TIE-2-ligand 1 (bane L1), men ikke ved TIE-2-ligand 2 (bane L2) eller kontrollen (blindprøve).

FIGUR 8: "Western blot" som viser at tidligere behandling av HAEC-celler med et overskudd TIE-2-ligand 2 (bane 2) antagoniserer den senere evne av fortynnet TIE-2-ligand 1 til å aktivere TIE-2-receptor (TIE2-R), sammenlignet med en tidligere behandling av HAEC-celler med BLINDPRØVE-medium (bane 1).

35 FIGUR 9: Histogramm-avbildning av bindingen til rotte-TIE2-IgG-immobilisert overflate ved TIE2-ligand i C2C12-ras, Rat2-ras, SHEP og T98G konsentrert (10x) kondisjonert

medium. Rotte-TIE2- (rTIE2) spesifikk binding demonstreres ved den signifikante reduksjon i bindingsaktiviteten i nærvær av 25 µg/ml oppløselig rotte-TIE2-RB sammenlignet med en mindre reduksjon i nærvær av oppløselig trkB-RB.

5

FIGUR 10: Binding av rekombinant human TIE-2-ligand 1 (hTL1) og human TIE-2-ligand 2 (hTL2) i cos-celle-supernatanter, til en human TIE-2-RB-immobilisert overflate. Human TIE-2-spesifikk binding ble bestemt ved å inkubere prøvene med 25 µg/ml enten oppløselig human TIE2-RB eller trkB-RB; en signifikant reduksjon av bindingsaktiviteten observeres kun for de prøver som ble inkubert med human TIE2-RB.

10

15

FIGUR 11: "Western blot" som viser at TIE-2-receptorlegemet (benevnt TIE-2-RB eller her TIE2-Fc) blokkerer aktiveringen av TIE-2-receptorer ved TIE-2-ligand 1 (TL1) i HUVEC-celler, mens et ubeslektet receptorlegeme (TRKB-Fc) ikke blokkerer denne aktivering.

20

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Det skal beskrives i større detalj nedenfor at oppfinnerne ved ekspresjonskloning har isolert en ny ligand som binder TIE-2-receptor. Foreliggende oppfinnelse omfatter en TIE-2-ligand samt dennes aminosyresekvens, Et eller flere aminosyreresiduer innen sekvensen kan eventuelt substitueres med en annen aminosyre eller med andre aminosyrer med lignende polaritet som er funksjonelt likeverdig, hvilket fører til en stum endring. Substituenten for en aminosyre innen sekvensen kan utvelges fra andre elementer av den gruppe som aminosyren hører til. Gruppen ikke-polare (hydrofobe) aminosyrer omfatter f.eks. alanin, leucin, isoleucin, valin, prolin, fenylalanin, tryptofan og metionin. De polart nøytrale aminosyrer omfatter glycin, serin, treonin, cystein, tyrosin, asparagin og glutamin. De positivt ladede (basiske) aminosyrer omfatter arginin, lysin og histidin. De

25

30

35

negativt ladede (sure) aminosyrer omfatter aspartaginsyre og glutaminsyre.

Foreliggende oppfinnelse omfatter også nukleotidsekvensen som koder for proteinet som heri benevnes TIE-2-ligand 1, samt celler som er genteknisk utviklet for å fremstille proteinet, f.eks. ved transfeksjon, transduksjon, infeksjon, elektroporering eller mikroinjeksjon av nukleinsyre som koder for TIE-2-ligand 1, som beskrives heri, i en egnet ekspresjonsvektor.

Foreliggende oppfinnelse omfatter også nukleotidsekvensen som koder for proteinet som heri benevnes TIE-2-ligand 2, samt celler som er genteknisk utviklet for å fremstille proteinet, f.eks. ved transfeksjon, transduksjon, infeksjon, elektroporering eller mikroinjeksjon av nukleinsyre som koder for TIE-2-ligand 2, som beskrives heri, i en egnet ekspresjonsvektor.

En fagmann vil også innse at foreliggende oppfinnelse omfatter DNA- og RNA-sekvenser som hybridiserer til en utledet TIE-2-ligand-kodende sekvens, under moderat stringente betingelser, som beskrives f.eks. av Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. utgave, Bind 1, s. 101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Således omfatter et nukleinsyremolekyl som kommer i betraktning ifølge foreliggende oppfinnelse, et molekyl som har en sekvens som er utledet fra aminosyresekvensen av en TIE-2-ligand som er fremstilt så som beskrives heri, samt et molekyl med en nukleinsyresekvens som hybridiserer til en slik nukleinsyresekvens, og også en nukleinsyresekvens som er degenerert fra de ovennevnte sekvenser som et resultat av den genetiske kode, men som koder for en ligand som binder TIE-2-receptor.

35

Hvilken som helst fremgangsmåte ved innføring av DNA-fragmenter i en vektor som er kjent for fagmannen, kan

anvendes for å konstruere ekspresjonsvektorer som koder for en TIE-2-ligand under anvendelse av egnede transkripsjons/-translasjons-kontrollsignaler og de proteinkodende sekvenser. Disse fremgangsmåter kan omfatte *in vitro*-rekombinant DNA og syntetiske teknikker og *in vivo*-rekombinasjoner (genetisk rekombinasjon). Ekspresjon av en nukleinsyresekvens som koder for en TIE-2-ligand eller et peptidfragment derav, kan reguleres ved hjelp av en andre nukleinsyresekvens, således at proteinet eller peptidet uttrykkes i en vert som er transformert med det rekombinante DNA-molekyl. F.eks. kan ekspresjonen av en TIE-2-ligand som beskrives heri, kontrolleres ved hjelp av et promotor/forsterkningselement som er kjent innen faget. Promotorer som kan anvendes for å regulere ekspresjonen av liganden omfatter, men er ikke begrenset til, den lange terminale gjentakende del som beskrives av Squinto et al. (Cell 65:1-20 (1991)); SV40-tidlig promotorparti (Bernoist og Chambon, Nature 290:304-310), CMV-promotor, M-MuLV-5'-terminal gjentakelse, promotoren som foreligger i 3'-lang terminal gjentakende del av Rous sarkomavirus (Yamamoto et al., Cell 22:787-797 (1980)), herpes-tymidin kinase-promotor (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:144-1445 (1981)), adenoviruspromotoren, de regulatoriske sekvenser av metallothioneinogenet (Brinster et al., Nature 296:39-42 (1982)); prokaryotiske ekspresjonsvektorer, så som β -laktamasepromotor (Villa-Kamaroff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3727-3731 (1978)) eller *tac*-promotor (DeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25 (1983)), jfr. også "Useful proteins from recombinant bacteria" i Scientific American, 242:74-94 (1980); promotorelementer fra gjær eller annen sopp, så som Gal 4-promotor, ADH-promotor (alkoholdehydrogenasepromotor), PGK-promotor (fosfoglycerolkinasepromotor), alkalisk fosfatasepromotor samt de følgende animalske transkripsjonskontrollpartier som oppviser vevsspesifitet og har blitt anvendt i transgene dyr: elastase I-genkontrollparti, som er aktivt i acinære pankreasceller (Swift et al., Cell 38:639-646 (1984); Ornitz

et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409 (1986); MacDonald, Hepatology 7:425-515 (1987); insulingenkontrollparti, som er aktivt i pankreatiske betaceller (Hanahan, Nature 315:115-122 (1985)), immunoglobulingen-

5 kontrollparti, som er aktivt i lymfeceller (Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658; Adames et al., 1985, Nature 318:533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444), muse-brystsvulstviruskontrollparti, som er aktivt i testikkelceller, brystceller, lymfeceller og

10 mastceller (Leder et al., 1986, Cell 45:485-495), albumingenkontrollparti, som er aktivt i leveren (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-276), alfa-fetoproteingenkontrollparti, som er aktivt i leveren (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987,

15 Science 235:53-58); alfa-1-antitrypsingenkontrollparti, som er aktivt i leveren (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-171), betaglobulingenkontrollparti, som er aktivt i myeloide celler (Mogram et al., 1985, Nature 315:338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94); det basiske gen-

20 kontrollområde for myelin, som er aktivt i oligodendrocytter i hjernen (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712); myosin-lett kjede-2-genkontrollparti, som er aktivt i skjelettmuskler (Shani, 1985, Nature 314:283-286) og gonadotropinfrigivningshormongenkontrollparti, som er aktivt i hypothalamus (Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378). Det

25 kan også fremstilles antisensforbindelser som har evnen til å spesifikt hybridisere med en sekvens av RNA som koder for en TIE-2-ligand, for å modulere dennes ekspresjon (Ecker, US-patent nr. 5.166.195, utstedt 24. november 1992).

30

Ekspresjonsvektorer som har evnen til å replikeres i en bakteriell eller eukaryotisk vert, omfattende en nukleinsyre som koder for en TIE-2-ligand som beskrevet heri kan også anvendes for å transfisere en vert og dermed styre

35 ekspresjonen av slike nukleinsyrer for å fremstille TIE-2-liganden, som deretter kan isoleres i en biologisk aktiv form. Anvendt heri omfatter en biologisk aktiv form en form

med evnen til å bindes til TIE-2-receptoren og å utløse en biologisk respons, så som en differensiert funksjon, eller å påvirke fenotypen av cellen som uttrykker receptoren. Slike biologisk aktive former kan f.eks. inducere fosfor-
5 lering av tyrosinkinasepartiet av TIE-2-receptor.

Ekspresjonsvektorer som inneholder geninnføyelsene, kan identifiseres ved fire generelle fremgangsmåter: (a) DNA-DNA-hybridisering, (b) nærvær eller fravær av "markør"-
10 genfunksjoner, (c) ekspresjon av innføyde sekvenser og (d) PCR-påvisning. I den første fremgangsmåte kan nærværet av et fremmed gen som er innføyd i en ekspresjonsvektor, påvises ved DNA-DNA-hybridisering under anvendelse av genprober som omfatter sekvenser som er homologe med et
15 innføyd TIE-2-ligand-kodende gen. I den andre fremgangsmåte kan det rekombinante vektor-/vertssystem identifiseres og utvelges på grunnlag av nærværet eller fraværet av bestemte "markør"-genfunksjoner (f.eks. tymidin kinaseaktivitet, resistens mot antibiotika, transformasjonsfenotype, dannel-
20 se av okklusjonslegemer i baculovirus osv.) som forårsakes av innføyelsen av fremmede gener i vektoren. Når f.eks. en nukleinsyre som koder for en TIE-2-ligand, innføyas innen markørgensekvensen av vektoren, kan rekombinanter som inneholder innføyelsen, identifiseres ved at de mangler
25 markørgenfunksjonen. I den tredje fremgangsmåte kan rekombinante ekspresjonsvektorer identifiseres ved å teste for det fremmede genprodukt som uttrykkes av rekombinanten. Slike assayer kan f.eks. baseres på de fysiske eller funksjonelle egenskaper av et TIE-2-ligand-genprodukt, f.eks.
30 ved å binde liganden til TIE-2-receptoren eller et parti derav, som kan påheftes med f.eks. et påvisbart antistoff eller et parti derav, eller ved bindingen til antistoffer som fremstilles mot TIE-2-ligandproteinet eller et parti derav. Celler ifølge foreliggende oppfinnelse kan uttrykke
35 TIE-2-ligander som beskrevet heri, forbigående eller fortrinnsvis konstitutivt og permanent. I den fjerde fremgangsmåte kan DNA-nukleotidprimere fremstilles tilsvarende

en *tie-2*-spesifikk DNA-sekvens. Disse primere kan så anvendes ved PCR av et *tie-2*-genfragment. (PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, utg. av Michael A. Innis et al., Academic Press (1990)).

5

Den rekombinante ligand kan renses ved hvilken som helst teknikk som tillater en påfølgende dannelse av et stabilt og biologisk aktivt protein. F.eks., og uten å skulle begrense, kan liganden isoleres fra celler enten i form av
10 oppløselige proteiner, eller som inklusjonslegemer, fra hvilke de kan ekstraheres kvantitativt ved 8M guanidin-
hydroklorid og dialyse. For å ytterligere rense liganden kan man anvende konvensjonell ionebytterkromatografi, hydrofob vekselvirkningskromatografi, reversfasekromato-
15 grafi eller gelfiltrering.

I ytterligere eksempler på utførelser av oppfinnelsen kan et rekombinant TIE-2-ligandkodende gen anvendes for å inaktivere eller "slå ut" det endogene gen ved homolog
20 rekombinasjon, og dermed skape en celle, et vev eller et dyr som mangler TIE-2-ligand. F.eks., og uten å skulle begrense, kan det rekombinante TIE-2-ligandkodende gen konstrueres slik at det inneholder en innføyelsesmutasjon, f.eks. et *neo*-gen, som vil inaktivere det native TIE-2-
25 ligandkodende gen. En slik konstruksjon under kontrollen av en egnet promotor, kan innføres i en celle, så som en embryonal stamcelle, ved en teknikk så som transfeksjon, transduksjon eller injeksjon. Celler som inneholder denne konstruksjon, kan deretter utvelges ifølge G418-resisten-
30 sen. Celler som mangler et intakt TIE-2-ligandkodende gen, kan deretter identifiseres, f.eks. ved "southern blot", PCR-påvisning, "northern blot" eller ekspresjonsassay. Celler som mangler et intakt TIE-2-ligandkodende gen, kan deretter smeltes sammen med tidlige embryoceller for å
35 generere transgene dyr som mangler en slik ligand. Et slikt dyr kan anvendes for å definere spesifikke *in vivo*-prosesser som normalt avhenger av liganden.

Foreliggende oppfinnelse frembringer også antistoffer som angitt i krav 18 mot TIE-2-ligandene som beskrives heri, som er nyttige ved påvisning av ligandene i f.eks. diagnostiske applikasjoner. Ved fremstilling av monoklonale antistoffer rettet mot TIE-2-liganden kan hvilken som helst teknikk som muliggjør fremstilling av antistoffmolekyler i kontinuerlige cellelinjer i kultur, anvendes. F.eks. hybridomateknikken som opprinnelig ble utviklet av Kohler og Milstein (1975, *Nature* 256:495-497), samt triomateknikken, human B-celle-hybridomateknikken (Kozbor et al., 1983, *Immunology Today* 4:72) samt EBV-hybridomateknikken for å fremstille humane monoklonale antistoffer (Cole et al., 1985, i "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, Inc., s. 77-96) og lignende kan anvendes for å danne celler som fremstiller de aktuelle antistoffer.

De monoklonale antistoffer kan være humane monoklonale antistoffer eller kimeriske human-muse- (eller andre arter) monoklonale antistoffer. Humane monoklonale antistoffer kan fremstilles ved hvilken som helst av de tallrike teknikker som er kjent innen faget (f.eks. Teng et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:7308-7312; Kozbor et al., 1983, *Immunology Today* 4:72-79; Olsson et al., 1982, *Meth. Enzymol.* 92:3-16). Kimeriske antistoffmolekyler kan fremstilles som inneholder et muse-antigenbindende parti med humane konstante partier (Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851; Takeda et al., 1985, *Nature* 314:452).

Forskjellige teknikker som er kjent innen faget, kan anvendes ved fremstilling av polyklonale antistoffer mot epitoper av TIE-2-ligandene som beskrives heri. For fremstilling av antistoffer kan forskjellige vertsdyr immuniseres ved injeksjon av en TIE-2-ligand eller et fragment eller derivat derav, omfattende men ikke begrenset til, kanin, mus og rotter. Forskjellige adjuvaner kan anvendes for å øke den immunologiske respons, avhengig av vertens art, og

omfattende men ikke begrenset til, Freunds (fullstendig og ufullstendig), mineralgeler, så som aluminiumhydroksid, overflateaktive substanser, så som lysolecitin, "pluronic" polyoler, polyanioner, peptider, oljeemulsjoner, nøkkel-
5 hullige-hemocyaniner, dinitrofenol og potensielt nyttige humane adjuvanter, så som BCG (*Bacillus Calmette Guerin*) og *Cornyebacterium parvum*.

En molekylær klon av et antistoff mot en utvalgt TIE-2-ligandepitop kan fremstilles ved kjente fremgangsmåter. Rekombinant DNA-metodologi (jfr. f.eks. Maniatis et al., 1982, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) kan anvendes for å konstruere nukleinsyresekvenser som koder for et
15 monoklonalt antistoffmolekyl eller antigenbindingspartiet derav.

Foreliggende oppfinnelse frembringer antistoffmolekyler samt fragmenter av slike antistoffmolekyler. Antistoff-
20 fragmenter som inneholder idiotypen av molekylet, kan genereres ved kjente fremgangsmåter. F.eks. omfatter slike fragmenter, men er ikke begrenset til: $F(ab')_2$ -fragmentet, som kan fremstilles ved pepsinspaltning av antistoffmolekylet; Fab'-fragmenter, som kan fremstilles ved å redusere
25 disulfidbroene av $F(ab')_2$ -fragmentet, og Fab-fragmenter, som kan fremstilles ved å behandle antistoffmolekylet med papain og et reduksjonsmiddel. Antistoffmolekyler kan renses ved kjente teknikker, f.eks. immunoabsorpsjon eller immunoaffinitetskromatografi, kromatografiske metoder, så
30 som HPLC (høyytelses væskekromatografi) eller en kombinasjon derav.

Videre kan det anvendes et immunoassay for å måle mengden TIE-2-ligand i en biologisk prøve ved å

35

- a) bringe den biologiske prøve i kontakt med minst ett antistoff som spesifikt binder TIE-2-liganden, således

- at antistoffet danner et kompleks med alle TIE-2-ligander som eventuelt foreligger i prøven; og
- b) måle mengden av komplekset og dermed måle mengden TIE-2-ligand i den biologiske prøve.

5

Et assay for å måle mengden TIE-2-receptor i en biologisk prøve omfatter trinnene å

- a) bringe den biologiske prøve i kontakt med minst én ligand ifølge oppfinnelsen, således at liganden danner et kompleks med TIE-2-receptoren og
- b) måle mengden av komplekset og dermed måle mengden TIE-2-receptor i den biologiske prøve.

- Foreliggende oppfinnelse frembringer også anvendelsen av en TIE-2-ligand for å støtte overlevelsen og/eller veksten og/eller differensieringen av TIE-2-receptoruttrykkende celler. Således kan liganden anvendes som et supplement for å f.eks. støtte endotelceller i kultur. Videre gjør oppdagelsen av kandidater for en kognat ligand for TIE-2-receptor, det mulig å anvende assaysystemer som er nyttige ved identifikasjon av agonister eller antagonist av TIE-2-receptor. Slike assaysystemer vil være nyttige ved identifisering av molekyler som har evnen til å fremme eller hemme angiogenese. I én utførelse kan f.eks. antagonist av TIE-2-receptor identifiseres som testmolekyler med evnen til å forstyrre vekselvirkningen mellom TIE-2-receptor og en biologisk aktiv TIE-2-ligand. Slike antagonist identifiseres ved sin evne til å 1) blokkere bindingen av en biologisk aktiv TIE-2-ligand til receptoren, målt f.eks. under anvendelse av "BIAcore" biofølerteknologi ("BIAcore"; Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ); eller 2) blokkere evnen av en biologisk aktiv TIE-2-ligand til å utløse en biologisk respons. Slike biologiske responser omfatter, men er ikke begrenset til, fosforylering av TIE-2-receptor eller nedstrøms komponenter av TIE-2-signaloverføringsbanen,

eller overlevelse, vekst eller differensiering av TIE-2-receptorbærende celler.

I én utførelse kan celler som er utviklet for å uttrykke
5 TIE-2-receptor, for sin vekst være avhengig av tilsetningen
av TIE-2-ligand. Slike celler gir nyttige assaysystemer for
identifikasjon av ytterligere agonister av TIE-2-recep-
toren, eller antagonist med evnen til å forstyrre aktivi-
teten av TIE-2-ligander på slike celler. Alternativt kan
10 autokrine celler, utviklet med evnen til å ko-uttrykke både
TIE-2-liganden og -receptoren, gi nyttige systemer for å
teste potensielle agonister eller antagonist.

Således kan TIE-2-receptor føres inn i celler som vanligvis
15 ikke uttrykker denne receptor, hvorved disse celler kan
oppvise grunnleggende og lett gjenkjennelige responser til
en ligand som binder denne receptor. Typen respons som ut-
løses, er avhengig av den anvendte celle, og ikke av den
spesifikke receptor som innføres i cellen. Egnede cellelin-
20 jer kan velges for å gi en respons som er av størst nytte
ved testing for, samt oppdagelse av, molekyler som kan inn-
virke på receptor-tyrosinkinaser. Molekylene kan være hvil-
ken som helst type molekyl, omfattende, men ikke begrenset
til, peptid- og ikke-peptidmolekyler, som vil virke i sys-
25 temer som skal beskrives senere under henvisning til spesi-
elle receptorer.

Et av de nyttigere systemer som skal utnyttes, omfatter
innføringen av TIE-2-receptor i en fibroblast-cellelinje
30 (f.eks. NIH3T3-celler), og dermed kan en receptor som ikke
vanligvis medierer proliferative responser, etter innføring
i fibroblaster, allikevel testes ved forskjellige godt inn-
arbeidede fremgangsmåter ved kvantifisering av virkningen
av fibroblastvekstfaktorer (f.eks. tymidininnlemmelse eller
35 andre typer proliferasjonsassayer; jfr. van Zoelen, 1990,
"The Use of Biological Assays for Detection of Polypeptide
Growth Factors" i Progress Factor Research, Bind 2, s. 131-

152; Zhan og M. Goldfarb, 1986, Mol. Cell. Biol., Bind 6, s. 3541-3544). Disse assayer har den ytterligere fordel at hvilket som helst preparat kan testes både på den cellelinje som har den tilføyde receptor, og på parentalcellelinjen som mangler receptor idet kun spesifikke virkninger på cellelinjen med receptor ville anses være mediert ved den innførte receptor. Slike celler kan ytterligere modifiseres for å uttrykke TIE-2-liganden, og dermed skapes et autokrint system som er nyttig ved testing for molekyler som virker som antagonister/agonister av denne vekselvirkning. Således frembringer foreliggende oppfinnelse vertsceller som omfatter nukleinsyren som koder for TIE-2-liganden og nukleinsyrer som koder for TIE-2-receptor.

15 TIE-2-receptor/TIE-2-ligand-vekselvirkningen gir også et nyttig system ved identifisering av små molekylers virkning som agonister eller antagonister av TIE-2-receptor. F.eks. kan fragmenter, mutanter eller derivater av en TIE-2-ligand identifiseres som binder TIE-2-receptor, men ikke induserer noen biologisk aktivitet. Alternativt gjør karakteriseringen av en TIE-2-ligand det mulig å bestemme de aktive partier av molekylet. Videre gjør identifikasjonen av en ligand det mulig å bestemme røntgenkrystallstrukturen av receptor/ligandkomplekset, og dermed blir det mulig å bestemme bindingsposisjonen på receptoren. Kjennskap til bindingsposisjonen vil gi nyttig informasjon om en rasjonell utvikling av nye agonister og antagonister.

Den spesifikke binding av et testmolekyl til TIE-2-receptor kan måles på et antall måter. F.eks. kan den faktiske binding av testmolekyler til celler som uttrykker *tie-2*, påvises eller måles ved å påvise eller måle (i) testmolekylet som bindes til overflaten av intakte celler; (ii) testmolekylet som tverrbindes til TIE-2-protein i cellysater; eller (iii) testmolekylet som bindes til TIE-2 *in vitro*. Den spesifikke vekselvirkning mellom testmolekylet

og TIE-2 kan bedømmes ved å anvende reagenser som viser de ensartede egenskaper av denne vekselvirkning.

- Som et bestemt og ikke begrensende eksempel, kan materia-
lene ifølge oppfinnelsen anvendes som følger. Man tenker
seg et tilfelle hvor mengden TIE-2-ligand i en prøve skal
måles. Forskjellige fortynninger av prøven (testmolekylet),
parallelt med en negativ kontroll (NC) som ikke inneholder
TIE-2-ligandaktivitet, og en positiv kontroll (PC) som
inneholder en kjent mengde TIE-2-ligand, kan utsettes for
celler som uttrykker *tie-2* i nærvær av en påvisbart merket
TIE-2-ligand (i dette eksempel en radiojodbehandlet li-
gand). Mengden TIE-2-ligand i testprøven kan bedømmes ved å
bestemme mengden ^{125}I -merket TIE-2-ligand som bindes til
kontrollprøvene og i hver av fortynningene, og å deretter
sammenligne prøveverdiene med en standardkurve. Jo mer
TIE-2-ligand i prøven, desto mindre ^{125}I -ligand vil bindes
til TIE-2.
- Mengden ^{125}I -ligand som er bundet kan bestemmes ved å måle
mengden radioaktivitet pr. celle, eller ved å tverrforbinde
TIE-2-liganden til celleoverflateproteiner under anvendelse
av DSS, som beskrevet av Meakin og Shooter, 1991, Neuron
6:153-163, og å påvise mengden merket protein i celleeks-
trakter under anvendelse av f.eks. SDS-polyakrylamidgel-
elektroforese, som kan påvise et merket protein av en
størrelse som tilsvarer TIE-2-ligand/TIE-2-receptor. Vek-
selvirkningen mellom det spesifikke testmolekyl og TIE-2,
kan ytterligere testes ved å tilsette til assayene diverse
fortynninger av en umerket kontroll-ligand som ikke binder
TIE-2-receptor og derfor ikke bør ha noen vesentlig inn-
virkning på konkurransen mellom merket TIE-2-ligand og
testmolekylet om TIE-2-binding. Alternativt forventes det
at et molekyl som er kjent for å ha evnen til å forstyrre
TIE-2-ligand/TIE-2-binding, så som, men ikke begrenset til,
anti-TIE-2-antistoff eller TIE-2-receptorlegeme som be-

skrevet heri, forstyrrer konkurransen mellom ^{125}I -TIE-2-ligand og testmolekylet om TIE-2-receptorbinding.

Påvisbart merket TIE-2-ligand omfatter, men er ikke begrenset til, TIE-2-ligand som er bundet kovalent eller nonkovalent til en radioaktiv substans, en fluorescerende substans, en substans med enzymatisk aktivitet, en substans som kan tjene som substrat for et enzym (enzymer og substrater som er forbundet med kolorimetrisk påvisbare reaksjoner, foretrekkes) eller en substans som kan påvises med et antistoffmolekyl, som fortrinnsvis er et påvisbart merket antistoffmolekyl.

Alternativt kan den spesifikke binding av et testmolekyl til TIE-2 måles ved å bedømme de sekundære biologiske virkninger på TIE-2-ligand/TIE-2-receptor-binding, omfattende, men ikke begrenset til, cellevekst og/eller differensiering eller umiddelbar tidlig genekspresjon eller fosforylering av TIE-2. F.eks. kan et testmolekyls evne til å indusere differensiering testes i celler som mangler *tie-2*, og i sammenlignbare celler som uttrykker *tie-2*; differensiering i *tie-2*-uttrykkende celler men ikke i sammenlignbare celler som mangler *tie-2*, vil tyde på en spesifikk vekselvirkning mellom testmolekylet og TIE-2. En lignende analyse kan utføres ved å påvise induksjon av umiddelbart tidlig gen (f.eks. *fos* og *jun*) i *tie-2*-minus- og *tie-2*-plus-celler, eller ved å påvise fosforylering av TIE-2 under anvendelse av et standard fosforyleringsassay som er kjent innen faget. En slik analyse kan være nyttig ved identifisering av agonister eller antagonister som ikke bindes kompetitivt til TIE-2.

På lignende måte kan materialer ifølge foreliggende oppfinnelse anvendes ved identifikasjon av et molekyl som har den biologiske aktivitet av en TIE-2-ligand, omfattende å (i) behandle en celle som uttrykker *tie-2*, med et testmolekyl og å (ii) påvise den spesifikke binding av testmolekylet

til TIE-2-receptor, hvor den spesifikke binding til TIE-2 korrelerer positivt med TIE-2-lignende aktivitet. Den spesifikke binding kan påvises enten ved å teste for direkte binding, eller for de sekundære biologiske virkninger av bindingen, som beskrevet ovenfor. En slik fremgangsmåte kan 5 være spesielt nyttig ved identifikasjon av nye medlemmer av TIE-ligandfamilien, eller innen den farmasøytiske industri ved testing av et stort antall peptid- og ikke-peptidmolekyler (f.eks. peptidomimetika) for TIE-forbundet biologisk aktivitet. I en foretrukket og bestemt, ikke begrensende utførelse av oppfinnelsen kan man fremstille et stort gitter av kulturbrønner som i alternerende rekker inneholder PR12-celler (eller fibroblaster, jfr. nedenfor) som enten er *tie-2*-minus eller er modifisert for å bli *tie-2*-plus. Et antall testmolekyler kan deretter tilsettes, således at hver spalte av gitteret, eller et parti derav, 15 inneholder et forskjellig testmolekyl. Hver brønn kan deretter bedømmes for nærvær eller fravær av vekst og/eller differensiering. Et ekstremt stort antall testmolekyler kan testes for en slik aktivitet på denne måte. 20

I ytterligere utførelsesformer kan materialene ifølge oppfinnelsen anvendes ved påvisning eller måling av TIE-lignende aktivitet eller ved identifisering av et molekyl som har en slik aktivitet, omfattende å (i) utsette et testmolekyl for et TIE-2-receptorprotein *in vitro* under betingelser som tillater dannelsen av bindinger og å (ii) påvise bindingen av testmolekylet til TIE-2-proteinet, hvor bindingen av testmolekylet til TIE-2 korrelerer med TIE-lignende aktivitet. Ifølge slike fremgangsmåter kan TIE-2 valgfritt være vesentlig rent, eller kan være festet til en fast bærer (så som en affinitetskolonne eller et ELISA-assay), eller kan være innlemmet i en kunstig membran. Bindingen av testmolekylet til TIE-2 kan bedømmes ved hvilken 30 som helst fremgangsmåte som er kjent innen faget. I foretrukne utførelser kan bindingen av testmolekylet påvises eller måles ved å bedømme dets evne til å konkurrere med

påvisbart merkede kjente TIE-2-ligander om TIE-2-receptorbinding.

Materialene ifølge foreliggende oppfinnelse kan også anvendes ved påvisning av et testmolekyls evne til å virke som antagonist mot TIE-lignende aktivitet, omfattende å påvise molekylets evne til å hemme en virkning av TIE-ligandbindingen til TIE-2 på en celle som uttrykker *tie-2*. En slik antagonist kan valgfritt forstyrre TIE-2-ligand/TIE-2-receptor-bindingen. Virkninger av TIE-2-ligandbindingen til TIE-2-receptoren er fortrinnsvis biologiske eller biokjemiske virkninger, omfattende, men ikke begrenset til, celleoverlevelse eller proliferasjon, celletransformasjon, umiddelbart tidlig geninduksjon eller TIE-2-fosforylering.

Materialer ifølge oppfinnelsen kan også anvendes ved identifisering av antistoffer eller andre molekyler med evnen til å nøytralisere liganden eller blokkere bindingen til receptoren. Som et ikke begrensende eksempel kan dette utføres via et assay som konseptuelt ligner et ELISA-assay. F.eks. kan TIE-receptorlegemet bindes til en fast støtte, så som en flerbrønnsplate av plast. Som kontroll kan en kjent mengde TIE-ligand som er blitt Myc-merket, deretter tilføres brønnen, og merket TIE-ligand som binder receptorlegemet, kan deretter identifiseres ved hjelp av et reporterantistoff rettet mot Myc-merket. Dette assaysystem kan deretter anvendes for å teste prøver for molekyler med evnen til å i) bindes til den merkede ligand eller ii) bindes til receptorlegemet og dermed blokkere den merkede ligands binding til receptorlegemet. F.eks. kan en testprøve som inneholder et aktuelt formodet molekyl sammen med en kjent mengde merket ligand innføres i brønnen, og man kan måle mengden merket ligand som bindes til receptorlegemet. Ved å sammenligne mengden bundet merket ligand i testprøven med mengden i kontrollen, kan man identifisere prøver som inneholder molekyler med evnen til å blokkere ligandens binding til receptoren. De således identifiserte aktuelle

molekyler kan isoleres under anvendelse av fremgangsmåter som er velkjent innen faget.

Når det er funnet et molekyl som blokkerer ligandbindingen, vil en fagmann forstå nødvendigheten for å utføre ytterligere tester for å bestemme om det blokkerende molekyl bindes til receptoren eller til liganden, samt assayer for å bestemme om det blokkerende molekyl kan nøytralisere ligandens biologiske aktivitet. F.eks. under anvendelse av et bindingsassay som utnytter "BIAcore" biofølerteknologi (eller lignende), hvor enten TIE-receptorlegemet eller TIE-liganden er kovalent forbundet med en fast støtte (f.eks. karboksymetyldekstran på en gullflate), kan en fagmann bestemme om det blokkerende molekyl bindes spesifikt til liganden eller til receptorlegemet. For å bestemme om det blokkerende molekyl kan nøytraliseres ligandens biologiske aktivitet, vil en fagmann kunne utføre et fosforyleringsassay (jfr. Eksempel 5) eller alternativt et funksjonelt bioassay, så som et overlevelsesassay, ved å anvende primære kulturer av f.eks. endotelceller. Alternativt kan et blokkerende molekyl som bindes til receptorlegemet, være en agonist, og en fagmann vil vite hvordan dette skal bestemmes ved å utføre en egnet assay for å identifisere ytterligere agonister av TIE-2-receptor.

Fordi TIE-2-receptor er blitt identifisert i forbindelse med endotelceller og, som vist heri, blokkering av liganden synes å forebygge vaskularisering, har det blitt demonstrert at TIE-2-liganden vil være nyttig ved induksjon av vaskularisering i forbindelse med sykdommer eller lidelser hvor slik vaskularisering er fordelaktig. Slike sykdommer eller lidelser omfatter sårleging, iskemi og diabetes. På den andre side vil antagonist av TIE-2-receptor, så som receptorlegemer som skal beskrives nedenfor i Eksempelene 2 og 3, og TIE-2-ligand 2 som skal beskrives i Eksempel 9, være nyttige ved forebyggelse eller svekking av vaskulari-

sering, hvorved f.eks. svulstvekst kan forebygges eller svekkes.

5 Fordi TIE-2-receptorbærende celler synes å være oppregulert under vaskularisering, kan TIE-2-ligandlegemer også være nyttige ved forebyggelse eller svekking av f.eks. svulstvekst. TIE-2-ligandlegemer kan være nyttige ved levering av toksiner til receptorbærende celler. Alternativt kan andre molekyler, så som vekstfaktorer, cytokiner eller nærings-

10 stoffer, leveres til en TIE-2-receptorbærende celle via TIE-2-ligandlegemer. TIE-2-ligandlegemer kan også anvendes som diagnostisk reagensmiddel for TIE-2-receptor, for å påvise receptoren *in vivo* eller *in vitro*. Når TIE-2-receptoren forbindes med en sykdomstilstand, kan TIE-2-ligand-

15 legemer være nyttige ved påvisning av sykdommen, f.eks. ved vevfarging eller avbildning av hele kroppen.

Foreliggende oppfinnelse frembringer også farmasøytiske sammensetninger som omfatter TIE-2-ligander eller -ligand-

20 legemer som beskrives heri, peptidfragmenter derav eller derivater, i et farmakologisk akseptabelt bæremiddel. TIE-2-ligandproteinene, peptidfragmentene eller derivatene kan administreres systemisk eller lokalt. Hvilken som helst

25 egnet administrasjonsrute som er kjent innen faget kan anvendes, omfattende, men ikke begrenset til, intravenøst, intratekalt, intraarterielt, intranasalt, oralt, subkutant, intraperitonealt eller ved lokal injeksjon eller kirurgisk implantasjon. Det frembringes også formuleringer med vedvarende frigivning.

30

Foreliggende oppfinnelse frembringer videre et isolert og renset nukleinsyremolekyl som omfatter en nukleinsyresekvens som koder for en human TIE-2-ligand, hvor nukleinsyresekvensen utvelges fra gruppen som består av:

35

- (a) nukleinsyresekvensen som omfatter det kodende parti av human TIE-2-ligand som vist på Figur 4 eller Figur 5,

- (b) en nukleinsyresekvens som hybridiseres under moderat stringente betingelser til nukleinsyresekvensen ifølge (a), og som koder for en TIE-2-ligand som binder TIE-2-receptoren, og
 - 5 (c) en nukleinsyresekvens som på grunnlag av sin genetiske kode er degenerert fra en nukleinsyresekvens ifølge (a) eller (b), og som koder for en TIE-2-ligand som binder TIE-2-receptor.
- 10 I en ytterligere utførelse frembringer oppfinnelsen et isolert nukleinsyremolekyl som koder for en TIE-2-ligand, hvor nukleinsyresekvensen er:
- (a) nukleinsyresekvensen som omfatter det kodende parti av
 - 15 human TIE-2-ligand som vist på Figur 6,
 - (b) en nukleinsyresekvens som hybridiseres under moderat stringente betingelser til nukleinsyresekvensen ifølge (a), og som koder for en TIE-2-ligand som binder TIE-2-receptoren, eller
 - 20 (c) en nukleinsyresekvens som, hvis det ikke var for at den genetiske kode er degenerert, ville hybridisere til en nukleinsyresekvens ifølge (a) eller (b), og som koder for en TIE-2-ligand som binder TIE-2-receptor.
- 25 Foreliggende oppfinnelse frembringer videre en isolert og rensset human TIE-2-ligand som kodes av et isolert nukleinsyremolekyl ifølge oppfinnelsen. Oppfinnelsen frembringer også en vektor som omfatter et isolert nukleinsyremolekyl omfattende en nukleinsyresekvens som koder for en human
- 30 TIE-2-ligand. I én utførelse benevnes vektoren pBluescript KS som koder for human TIE-2-ligand 2.

Oppfinnelsen frembringer dessuten en ekspresjonsvektor som omfatter et DNA-molekyl som koder for en human TIE-2-li-

35 gand, hvor DNA-molekylet er operativt forbundet med en ekspresjonskontrollsekvens. Oppfinnelsen frembringer også et vert-vektor-system for fremstilling av et polypeptid med

den biologiske aktivitet av en human TIE-2-ligand, som omfatter ekspresjonsvektoren ifølge oppfinnelsen i en egnet vertscelle. I én utførelse kan den egnede vertscelle være en bakteriell celle, gjærcele, insektcelle eller pattedyr-
5 celle. Oppfinnelsen frembringer ytterligere en fremgangsmåte ved fremstilling av et polypeptid med aktiviteten av en biologisk aktiv TIE-2-ligand, som omfatter voksende celler av vert-vektor-systemet ifølge oppfinnelsen, under betingelser som tillater fremstilling av polypeptidet og isole-
10 ring av det således fremstilte polypeptid.

Oppfinnelsen som beskrives heri av et isolert nukleinsyremolekyl som koder for en TIE-2-ligand, frembringer ytterligere utviklingen av liganden, et fragment eller et derivat
15 derav, eller et annet molekyl som er en receptoragonist eller -antagonist, som et terapeutisk middel ved behandling av pasienter som lider av forstyrrelser forbundet med celler, vev eller organer som uttrykker TIE-receptor. Som et ikke begrensende eksempel frembringer foreliggende
20 oppfinnelse et ligandlegeme som spesifikt binder TIE-2-receptor eller TIE-2. I en alternativ utførelse frembringer foreliggende oppfinnelse et ligandlegeme som omfatter en TIE-2-ligand som er smeltet sammen med et immunoglobulin-konstant parti. I én utførelse omfatter ligandlegemet
25 TIE-2-ligand 1 eller TIE-2-ligand 2 og Fc-partiet av humant IgG1. Ligandlegemet kan anvendes ved behandling av et menneskes eller et dyr, eller ved diagnostisering.

Foreliggende oppfinnelse frembringer også et antistoff som
30 spesifikt bindes til et slikt terapeutisk molekyl. Antistoffet kan være monoklonalt eller polyklonalt. Et slikt monoklonalt eller polyklonalt antistoff kan anvendes for å måle mengden terapeutisk molekyl i en prøve som er tatt fra en pasient, for å overvåke terapiens fremskritt.

35

Oppfinnelsen frembringer ytterligere en terapeutisk sammensetning som omfatter en human TIE-2-ligand eller et ligand-

legeme, og et cytotoxisk middel som er konjugert dermed. I én utførelse kan det cytotoxiske middel være et radioisotop eller et toksin.

- 5 Oppfinnelsen frembringer også et antistoff som spesifikt binder en human TIE-2-ligand. Antistoffet kan være monoklonalt eller polyklonalt.

Isolering av en human TIE-2-ligand kan bli oppnådd ved å:

10

- a) koble minst ett TIE-2-bindende substrat til en fast matriks;
- b) inkubere substratet fra a) med et cellelysate, således at substratet danner et kompleks med en eventuelt foreliggende human TIE-2-ligand i cellelysate;
- 15 c) vaske den faste matriks og
- d) eluere den humane TIE-2-ligand fra det sammenkoblede substrat.

- 20 Substratet kan være hvilken som helst substans som spesifikt binder human TIE-2-ligand. I én utførelse utvelges substratet fra gruppen som består av anti-TIE-2-ligand-antistoff, TIE-2-receptor og TIE-2-receptorlegeme. Oppfinnelsen frembringer videre et receptorlegeme som spesifikt
- 25 binder human TIE-2-ligand samt en terapeutisk sammensetning som omfatter receptorlegemet i et farmasøytisk akseptabelt bæremiddel til blokkering av blodkarvekst i et menneske.

- Oppfinnelsen frembringer også en terapeutisk sammensetning
- 30 omfattende human TIE-2-ligand eller -ligandlegeme i et farmasøytisk akseptabelt bæremiddel samt en fremgangsmåte ved fremming av neovaskularisering hos en pasient.

- I tillegg frembringer foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte ved identifikasjon av en celle som uttrykker
- 35 TIE-2-receptor, omfattende å bringe en celle i berøring med en påvisbart merket TIE-2-ligand eller et TIE-2-ligand-

legeme, under betingelser som tillater binding av den påvisbart merkede ligand til TIE-2-receptoren og å bestemme om den påvisbart merkede ligand er bundet til TIE-2-receptor, hvorved cellen identifiseres som en som uttrykker

5 TIE-2-receptor. Foreliggende oppfinnelse frembringer også en terapeutisk sammensetning som omfatter en TIE-2-ligand eller et TIE-2-ligandlegeme, og et cytotoxisk middel som er konjugert dermed. Det cytotoxiske middel kan være en radioisotop eller et toksin.

10

Oppfinnelsen frembringer også en fremgangsmåte ved påvisning av ekspresjon av TIE-2-ligand i en celle, omfattende å isolere mRNA fra cellen, bringe det erholdte mRNA i berøring med et merket nukleinsyremolekyl som koder for en

15 TIE-2-ligand, under hybridiseringsbetingelser, å bestemme om det foreligger mRNA som er hybridisert med det merkede molekyl, og dermed å påvise ekspresjon av TIE-2-liganden i cellen.

20 Oppfinnelsen frembringer ytterligere en fremgangsmåte ved påvisning av TIE-2-ligand-ekspresjon i vevseksjoner, omfattende å bringe vevseksjonene i berøring med et merket nukleinsyremolekyl som koder for en TIE-2-ligand, under hybridiseringsbetingelser, å bestemme om det foreligger

25 mRNA som er hybridisert med det merkede molekyl, og dermed å påvise ekspresjonen av TIE-2-liganden i vevseksjonene.

EKSEMPEL 1 IDENTIFIKASJON AV ABAE-CELLELINJEN SOM
REPORTERCELLER FOR TIE-2-RECEPTOR

30

Voksne BAE-celler er registrert i European Cell Culture Repository med ECACC-nr. 92010601 (jfr. PNAS 75:2621 (1978)). "Northern" (RNA-) analyse viste moderate mengder tie-2-transkripsjoner i ABAE-cellelinjen (voksen bovin arteriell endotelcellelinje), hvilket stemmer overens med

35 *in situ*-hybridiseringsresultater som viste nesten utelukkende lokalisering av tie-2-RNA i vaskulære endotelceller.

- Vi undersøkte derfor ABAE-cellelysater for nærværet av TIE-2-protein, samt utstrekningen av dette TIE-2-proteins tyrosin-fosforylering under normale vs. serumfattige vekstbetingelser. ABAE-cellelysater ble isolert og underkastet immunofelning, etterfulgt av "western blot"-analyse av immunofelte proteiner med TIE-2-spesifikt og fosfotyrosin-spesifikt antiserum. Utelatelse eller inklusjonen av TIE-2-peptider som spesifikke blokkerende molekyler under TIE-2-immunofelningen gjorde det mulig med en utvetydig identifikasjon av TIE-2 som et moderat påvisbart protein med ca. 150 kDa, hvis normale fosfotyrosinnivåer nedsettes til nesten upåvisbare nivåer ved tidligere serumberøvelse av cellene.
- Kulturen av ABAE-cellene og isolasjonen av cellelysatene ble utført som følger. ABAE-celler med lavt antall passasjer ble plassert som monosjikt i en tetthet på 2×10^6 celler/150 mm i petriskåler av plast (Falcon), og de ble kultivert i Dulbeccos modifiserte Eagles medium (DMEM) som inneholdt 10% bovint kalveserum (10% BCS), 2 mM L-glutamin (Q) og 1% hver av penicillin og streptomycin (P-S) i en atmosfære av 5% CO₂. Før isolasjonen av cellelysatene ble cellene berøvet for serum i 24 timer i DMEM/Q/P-S, etterfulgt av bortsuging av mediet og skylling av platene med iskaldt fosfatbufret saltvann (PBS) som var supplementert med natriumortovanadat, natriumfluorid og natriumbenzamidin. Cellene ble oppløst i en liten mengde av denne rensebuffer som var supplementert med 1% NP40-vaskemiddel og proteasehemmerne PMSF og aprotinin. Uoppløselig masse ble fjernet fra cellelysatene ved sentrifugering ved 14000 g i 10 minutter ved 4°C, og supernatantene ble underkastet immunfelning med antisera som var spesifikke for TIE-2-receptor, med eller uten nærværet av blokkerende peptider som ble tilsatt i en konsentrasjon på ca. 20 µg/ml lysat. Immunofelte proteiner ble oppløst ved PAGE (7,5% Laemmli-gel) og deretter elektrooverført til PVDF-membran og inkubert med enten forskjellige TIE-2- eller fosfotyrosin-

spesifikke antisera. TIE-2-proteinet ble anskueliggjort ved inkubasjon av membranen med HRP-bundet sekundært antiserum etterfulgt av behandling med ECL-reagens (Amersham).

5 EKSEMPEL 2 KLONING OG EKSPRESJON AV TIE-2-RECEPTOR-
 LEGEME FOR AFFINITETSBASERT STUDIE AV TIE-2-
 LIGAND-VEKSELVIRKNINGER

En ekspresjonskonstruksjon ble skapt som ville gi et utsondret protein bestående av hele det ekstracellulære parti av rotte-TIE-2-receptor bundet til humant immunoglobulin gamma-1-konstant parti (IgG1 Fc). Dette fusjonsprotein benevnes TIE-2-"receptorlegeme" (RB), og vil normalt forventes å foreligge som en dimer i oppløsning basert på dannelsen av disulfidbindinger mellom enkelte IgG1-Fc-haler. Fc-partiet av TIE-2-RB ble fremstilt som følger. Et DNA-fragment som kodet for Fc-partiet av humant IgG1 som strekker seg fra hengselpartiet til karboksyende av proteinet, ble amplifisert fra humant placenta-cDNA ved PCR med oligonukleotider som tilsvarte den publiserte sekvens av humant IgG1; det erholdte DNA-fragment ble klonet i en plasmidvektor. Egnede DNA-restriksjonsfragmenter fra et plasmid som kodet for den fullstendige TIE-2-receptor og fra humant IgG1-Fc-plasmid, ble ligert på enten side av et kort PCR-derivert fragment som var utviklet for å smelte sammen, innen rammen, de TIE-2- og humant IgG1-Fc-proteinkodende sekvenser. Det erholdte TIE-2-ektoparti-Fc-fusjonsprotein erstattet således nøyaktig IgG1-Fc i stedet for partiet som strekker seg over TIE-2-transmembrant og cytoplasmatisk parti. En alternativ fremgangsmåte ved fremstilling av receptorlegemer beskrives av Goodwin et al., Cell 73:447-456 (1993).

35 TIE-2-RB-mengder i milligramstørrelsesorden ble erholdt ved
å klonе TIE-2-RB-DNA-fragmentet inn i pVL1393-baculovirus-
vektor og påfølgende infeksjon av *Spodoptera frugiperda* SF-
21AE-insektcellelinjen. Alternativt kan cellelinjen SF-9

(ATCC-tilgangsnummer CRL-1711) eller cellelinjen BTI-TN-5b1-4 anvendes. DNA som koder for TIE-2-RB, ble klonet som et Eco-RI-NotI-fragment i baculovirusoverføringsplasmidet pVL1393. Plasmid-DNA som var renset ved cesiumklorid-tetthetsgradiententrifugering, ble rekombinert i viralt DNA ved å blande 3 µg plasmid-DNA med 0,5 µg Baculo-Gold-DNA (Pharminigen) etterfulgt av tilførsel til liposomer under anvendelse av 30 µg Lipofectin (GIBCO-BRL). DNA-liposomblandinger ble tilsatt til SF-21AE-celler (2×10^6 celler/60 mm plate) i TMN-FH-medium (modifisert Graces insektcellemedium (GIBCO-BRL)) i 5 timer ved 27°C, etterfulgt av inkubasjon ved 27°C i 5 dager i TMN-FH-medium supplementert med 5% føtalt kalveserum. Vevkulturmediet ble isolert for plakkrensing av rekombinante virus, hvilket ble utført på samme måte som ble beskrevet tidligere (D.R. O'Reilly, L.K. Miller og V.A. Luckow, Baculovirus Expression Vectors - A Laboratory Manual, 1992, New York: W.H. Freeman), unntatt at agarosesupernatanten inneholdt 125 µg/ml X-gal (5-brom-4-klor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid; GIBCO-BRL). Etter 5 dagers inkubasjon ved 27°C ble ikke-rekombinante plakk bedømt ved positiv kromogen reaksjon til X-gal-substratet, og deres plassering ble markert. Rekombinante plakk ble deretter anskueliggjort ved tilsetning av en andre supernatant inneholdende 100 µg/ml MTT (3-[4,5-dimetyltiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazoliumbromid; Sigma). Formentlige rekombinante virusplakk ble plukket ut ved pluggbortsuging og renset ved flere omganger plakkisolasjon for å sikre homogeniteten. Virusstammer ble generert ved seriell lavt antalls passering av plakkrenset virus. Stammer med lavt antall passasjer av en virusklon (vTIE-2-receptorlegeme) ble fremstilt.

SF-21AE-celler ble kultivert i serumfritt medium (SF-900 II, Gibco BRL) som inneholdt 1X antibiotisk/antimykotisk oppløsning (Gibco BRL) og 25 mg/l gentamycin (Gibco BRL). "Pluronic" F-68 ble tilsatt som surfaktant til en slutlig konsentrasjon på 1 g/l. Kulturer (4 l) ble dyrket i en

bioreaktor (Artisan Cell Station System) i minst tre dager før infeksjonen. Celler ble dyrket ved 27°C under en gassstrøm til 50% oppløst oksygen ved en gass-strømningshastighet på 80 ml/min (beluftning med spredning). Rystning ble utført ved hjelp av en "marine impeller" ved en hastighet på 100 rpm. Cellene ble samlet i den midtlogaritmiske vekstfase (ca. 2×10^6 celler pr. ml), konsentrert ved sentrifugering og infisert med 5 plakkdannende enheter vTIE-2-receptorlegeme pr. celle. Celler og podestoff ble brakt til 400 ml med ferskt medium, og viruset ble adsorbert i 2 timer ved 27°C i en roterende kolbe. Kulturen ble deretter resuspendert i et slutlig volum på 8 l med ferskt serumfritt medium, og cellene ble inkubert i bioreaktoren under anvendelse av de tidligere beskrevne betingelser.

Kulturmedium fra vTIE-2-receptorlegeme-infiserte SF21AE-celler ble samlet ved sentrifugering (500 g, 10 minutter) 72 timer etter infeksjonen. Cellesupernatantene ble brakt til pH 8 med NaOH. EDTA ble tilsatt til en slutlig konsentrasjon på 10 mM, og supernatantens pH-verdi ble gjenjustert til 8. Supernatantene ble filtrert (0,45 µm, Millipore) og ladet på en protein A-kolonne (protein A-sepharose 4 raskt flytende eller HiTrap-protein A, begge fra Pharmacia). Kolonnen ble vasket med PBS som inneholdt 0,5 M NaCl inntil absorbansen ved 280 nm sank til grunnlinjen. Kolonnen ble vasket i PBS og eluert med 0,5M eddiksyre. Kolonnefraksjonene ble umiddelbart nøytralisert ved å eluere i rør som inneholdt 1M Tris pH 9. Toppfraksjonene som inneholdt TIE-2-RB, ble samlet og dialysert mot PBS.

EKSEMPEL 3 PÅVISNING AV AT TIE-2 SPILLER EN KRITISK ROLLE VED UTVIKLING AV ÅRESYSTEMET

Uti fra at det ikke finnes noen kjent ligand for TIE-2-receptor, trakk man den slutning at det kanskje ville være mulig å få innblikk i funksjonen av TIE-2 ved tilføring av et "overskudd" oppløselig TIE-2-receptorlegeme (TIE-2-RB)

til et system i utvikling. Den potensielle evne av TIE-2-RB til å binde, og dermed nøytralisere, foreliggende TIE-2-ligand, kunne føre til en synlig forstyrrelse av den normale vaskulære utvikling, og karakterisering av liganden. For å bestemme om TIE-2-RB kunne anvendes for å stanse den vaskulære utvikling i tidlige kyllingembryoer, ble små stykker av et biologisk resorberbart skum fuktet med TIE-2-RB og innført umiddelbart under chorioallantoïnmembran like ved siden av den primitive embryo.

10

Tidlige kyllingembryoer utvikles oppå eggeplommen fra en liten celleplate som er dekket av chorioallantoïnmembran (CAM). Endotelcellene som kommer til å kante åresystemet i embryo, stammer både fra ekstra- og intra-embryonale cellekilder. Ekstraembryonalt avledede endotelceller, som utgjør den største kilde for endotelceller i embryoen, stammer fra en tilvekst av mesenkym som er plassert lateralt rundt den egentlige embryo, like under CAM. Når disse mesenkymceller modner, gir de opphav til en felles forløper av både endotel- og den hematopoetiske cellelinjer, benevnt heman-
gioblast. Hemangioblastene i sin tur gir opphav til en blandet populasjon av angioblaster (endotelcelle-forløperen) og hematoblaster (den pluripotensielle hematopoetiske forløper). Dannelse av rudimenter av åresystemet starter
når endotelcelle-forløpere segregerer for å danne en 1
celle tykk vesikkel som omringer de primitive blodceller. Proliferasjon og migrering av disse cellulære komponenter fremkaller til slutt et vidt nett av blodfylte mikrokår under CAM som til slutt vil bevege seg inn i embryo for å
slå seg sammen med begrensede intraembryonalt avledede vaskulære elementer.

Nybefruktede kyllingegg erholdt fra Spafas, Inc. (Boston, MA) ble inkubert ved 37,5°C, 55% fuktighet. Etter ca. 24
timers utvikling ble eggskallet tørket av med 70% etanol, og man anvendte et tannlegebor for å bore et 1,5 cm hull i den butte ende av hvert egg. Skallmembranen ble fjernet for

å frigjøre et luftrom direkte ovenfor embryo. Små rektangulære biter sterilt "Gelfoam" (Upjohn) ble skåret med en skalpell og bløtet i like konsentrasjoner enten TIE-2- eller EHK-1-receptorlegeme. EHK-1-receptorlegemet ble fremstilt som beskrevet i Eksempel 2, under anvendelse av EHK-1-ekstracellulært parti istedenfor TIE-2-ekstracellulært parti (Maisonpierre et al., Oncogene 8:3277-3288 (1993). Hvert Gelfoam-stykke absorberte ca. 6 µg protein i 30 µl. En steril urmakerpinsett ble anvendt for å rive et lite hull i CAM flere millimeter fra den primitive embryo. Hovedparten av det RB-bløtede Gelfoam-stykke ble innført under CAM, og egget ble lukket med et stykke teip. Andre egg som var forberedt på lignende måte, ble behandlet parallelt med RB av det ubeslektede, neuronalt uttrykte receptor-tyrosinkinase EHK-1 (Maisonpierre et al., Oncogene 8:3277-3288 (1993). Utviklingen fikk fremskride i 4 dager, og deretter ble embryoene undersøkt ved visuell inspeksjon. Embryonene ble fjernet ved å forsiktig slå skallene i skåler av oppvarmet PBS og å forsiktig skjære bort embryo med det omliggende CAM. Av de 12 egg som var behandlet med receptorlegeme, hadde 6 TIE-2-RB- og 5 EHK-1-RB-behandlede embryoer utviklet seg videre fra det trinn som ble observert ved eksperimentets start. Man kunne se en dramatisk forskjell mellom disse utviklede embryoer, som vist på Figurene 1A og 1B. De EHK-1-RB-behandlede embryoer syntes å ha utviklet seg relativt normalt. Fire av de fem EHK-1-embryoer ble ansett å være levedyktige, bedømt ifølge nærværet av et slående hjerte. Videre var den ekstraembryonale vaskulatur, som er visuelt påfallende på grunn av nærværet av røde blodceller, stor og strakk seg flere centimeter lateralt under CAM. I motsetning til dette var de TIE-2-RB-behandlede embryoer sterkt forkrøplet og hadde en diameter på kun 2-5 mm, sammenlignet med 10 mm for EHK-1-RB-embryoene. Alle TIE-2-RB-behandlede embryoer var døde, og deres CAM manglet blodkar. Evnen av TIE-2-RB til å blokkere vaskulær utvikling i kylling, demonstrerer at TIE-2-liganden er nødvendig for utviklingen av åresystemet.

EKSEMPEL 4 IDENTIFIKASJON AV EN TIE-2-SPESIFIKK
BINDINGSAKTIVITET I KONDISJONERT MEDIUM FRA
ras-ONKOGEN-TRANSFORMERT C2C12-MUSEMYOBLAST-
CELLELINJE

Testing av 10 ganger konsentrert cellekondisjonert medium (10X CCM) fra diverse cellelinjer for nærværet av oppløselig TIE-2-spesifikk bindingsaktivitet (BIAcore; Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ) viste bindingsaktivitet i serumfritt medium fra onkogen-ras-transformerte C2C12-celler (C2C12-ras), RAT 2-ras (som er en ras-transformert fibroblastcellelinje), humant glioblastom T98G og human neuroblastcellelinje kjent som SHEP-1.

C2C12-ras 10X CCM stammet fra en stabilt transfisert linje av C2C12-myoblaster som var onkogen transformert ved transfeksjon med T-24-mutanten av H-ras ved standard kalsiumfosfatbaserte metoder. Et SV40-basert neomycinresistens-ekspresjonsplasmid ble fysisk bundet med ras-ekspresjonsplasmidet for å tillate utvalg av de transfiserte kloner. De erholdte G418-resistente ras-C2C12-celler ble vedlikeholdt rutinemessig som et monosjikt på plastskåler i DMEM/-glutamin/penicillin-streptomycin som var supplementert med 10% føtalt kalveserum (FCS). Serumfritt C2C12-ras 10X CCM ble fremstilt ved å plassere cellene på plater ved 60% sammenløp i et serumfritt definert medium i 12 timer (Zhan og Goldfarb, Mol. Cell. Biol. 6:3541-3544 (1986); Zhan et al., Oncogene 1:369-376 (1987)). Mediet ble kastet og skiftet ut mot ferskt DMEM/Q/P-S i 24 timer. Dette medium ble isolert, og cellene ble igjen tilført ferskt DMEM/Q/P-S, som også ble isolert etter ytterligere 24 timer. Disse CCM ble supplementert med proteasehemmerne PMSF (1 mM) og aprotinin (10 µg/ml) og konsentrert 10 ganger på sterile størrelsessekskluderende membraner (Amicon). TIE-2-bindingsaktiviteten kunne nøytraliseres ved inkubasjon av

mediet med et overskudd TIE-2-RB, men ikke ved inkubasjon med EHK-1-RB, før BIAcore-analysen.

5 Bindingsaktiviteten av 10X CCM ble målt under anvendelse av biofølerteknologi (BIAcore; Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ), som overvåker biomolekylære vekselvirkninger i sanntid via flateplasmon-resonans. Renset TIE-2-RB ble kovalent bundet via primære aminer til karboksymetyldekstransjiktet av en CM5 forskningskvalitets følerchip (Pharmacia Biosensor; Piscataway, NJ). Følerchipens overflate ble aktivert under anvendelse av en blanding av N-hydroksysuksinimid (NHS) og N-etyl-N'-(3-dimetylaminopropyl)karbodiimid (EDC) etterfulgt av immobiliseringen av TIE-2-RB (25 µg/ml, pH 4,5) og deaktivering av ureagerte stillinger med 1,0M etanolamin (pH 8,5). En negativ kontrollflate med EHK-1-receptorlegemet ble fremstilt på lignende måte.

Løpebufferen anvendt i systemet, var HBS (10 mM Hepes, 3,4 mM edta, 150 mM NaCl, 0,005% P₂O-surfaktant, pH 7,4). 10X CCM-prøvene ble sentrifugert i 15 minutter ved 4°C og ytterligere klarnet under anvendelse av et sterilt, lavt proteinbindende 0,45 µm filter (Millipore; Bedford, MA). Dekstran (2 mg/ml) og P20-surfaktant (0,005%) ble tilsatt til hver CCM-prøve. Alikvoter på 40 µl ble injisert gjennom den immobiliserte overflate (enten TIE-2 eller EHK-1) i en strømningshastighet på 5 µl/min, og receptorbindingen ble overvåket i 8 minutter. Bindingsaktiviteten (resonansenheter, R.U.) ble målt som forskjellen mellom en grunnverdi som ble bestemt 30 sekunder før injeksjon av prøven, og en måling som ble tatt 30 sekunder etter injeksjonen. Regenerering av overflaten ble utført med et 12 µl støt av 3 M MgCl₂.

Instrumentets støynivå er 20 R.U.; derfor kan en bindingsaktivitet med et signal over 20 R.U. tydes som en faktisk vekselvirkning med receptoren. For C2C12-ras-kondisjonert medium var bindingsaktiviteten i området 60-90 R.U. for den

TIE-2-RB-immobiliserte overflate. For de samme prøver når de ble testet på en EHK-1-RB-immobilisert overflate, var den målte aktivitet under 35 R.U. Den spesifikke binding til TIE-2-receptorlegemet ble bedømt ved å inkubere prøvene med et overskudd av enten oppløselig TIE-2- eller EHK-1-RB før testing av bindingsaktiviteten. Tilsetningen av oppløselig EHK-1-RB hadde ingen innvirkning på TIE-2-bindingsaktiviteten for noen av prøvene, men i nærvær av oppløselig TIE-2, var bindingen til overflaten 2/3 mindre enn når den ble målt i fravær av TIE-2. Et gjentatt assay under anvendelse av >50X konsentrert C2C12-ras-CCM førte til en fire gangers økning over bakgrunnen av det TIE-2-spesifikke bindingssignal.

15 EKSEMPEL 5 C2C12-ras-CCM INNEHOLDER EN AKTIVITET SOM
INDUSERER TYROSINFOSFORYLASJON AV TIE-2-
RECEPTOR

C2C12-ras-10X CCM ble undersøkt for sin evne til å indusere tyrosinfosforylasjon av TIE-2 i ABAE-celler. Serumberøvede ABAE-celler ble raskt inkubert med C2C12-ras-CCM, oppløst og underkastet immunofelning og "western"-analyse som beskrevet ovenfor. Stimulasjon av serumberøvede ABAE-celler med serumfritt C2C12-ras-10X CCM ble utført som følger. Mediet av ABAE-celler som var berøvet som beskrevet ovenfor, ble fjernet og skiftet ut mot enten definert medium eller 10X CCM som på forhånd var oppvarmet til 37°C. Etter 10 minutter ble mediet fjernet, og cellene ble rensset to ganger på is med et overskudd nedkjølt PBS som var supplert med ortovanadat/NaF/benzamidin. Celleoppløsningen og TIE-2-spesifikk immunofelning ble utført som beskrevet ovenfor.

ABAE-celler som var inkubert i 10 minutter med definert medium, viste ingen induksjon av TIE-2-tyrosinfosforylasjon, mens inkubasjon med C2C12-ras-CCM stimulerte en minst 100 gangers økning i TIE-2-fosforylasjonen. Denne aktivitet ble

nesten fullstendig fjernet ved forinkubasjon av C2C12-ras-10X CCM i 90 minutter ved værelsestemperatur med 13 µg TIE-2-RB koblet med protein G-sepharose-kuler. Medium inkubert med kun protein G-sepharose, mistet ikke sin fosforylasjonsaktivitet.

EKSEMPEL 6 EKSPRESJONSKLONING AV TIE-2-LIGANDEN

COS-7-celler ble kultivert i Dulbeccos modifiserte Eagles medium (DMEM) som inneholdt 10% føtalt bovint serum (FBS), hver 1% penicillin og streptomycin (P/S) og 2 mM glutamin under en atmosfære av 5% CO₂. Muse-myoblast-C2C12-ras-cellelinjen ble kultivert i Eagles minste essensielle medium (EMEM) med 10% FBS, (P/S) og 2 mM glutamin. Uforkortede TIE-2-ligand-cDNA-kloner ble erholdt ved å teste en C2C12-ras-cDNA-samling i pJFE14-vektoren som uttrykkes i COS-celler. Denne vektor, vist på Figur 2, er en modifisert versjon av vektoren pSR_α (Takebe et al., 1988, Mol. Cell. Biol. 8:466-472). Samlingen ble skapt ved anvendelse av de to BSTX1-restriksjonsstillinger i pJFE14-vektoren.

COS-7-celler ble forbigående transfisert med enten pJFE14-samlingen eller kontrollvektor, ved DEAE-dekstransfeksjonsprotokollen. Kort sagt ble COS-7-celler plassert på plater i en tetthet på 1,0 x 10⁶ celler pr. 100 mm plate 24 timer før transfeksjonen. For transfeksjon ble cellene kultivert i serumfritt DMEM som inneholdt 400 µg/ml DEAE-dekstran, 1 µM klorkin og 2 mM glutamin og 1 µg av det aktuelle DNA i 3-4 timer ved 37°C under en atmosfære av 5% CO₂. Transfeksjonsmediet ble oppsugd og skiftet ut mot fosfatbufret saltvann med 10% DMSO i 2-3 minutter. Etter denne DMSO-"sjokk" ble COS-7-cellene plassert i DMEM med 10% FBS, hver 1% penicillin og streptomycin og 2 mM glutamin i 48 timer.

Fordi TIE-2-liganden utsondres, var det nødvendig å permeabilisere cellene for å påvise binding av receptorlegemegenproben til liganden. To dager etter transfeksjonen ble

cellene skylt med PBS og deretter inkubert med PBS som inneholdt 1,8% formaldehyd i 15-30 minutter ved værelses-temperatur. Cellene ble deretter vasket med PBS og inkubert i 15 minutter med PBS som inneholdt 0,1% Triton X-100 og 10% bovint kalveserum for å permeabilisere cellene og blok- kere ikke-spesifikke bindingssteder. Testingen ble utført ved direkte lokalisering av flekker under anvendelse av TIE-2-receptorlegemet, som bestod av det ekstracellulære parti av TIE-2 som var smeltet sammen med IgG1-konstant parti. Dette receptorlegeme ble fremstilt som beskrevet i Eksempel 2. En 100 mm skål transfiserte, fikserte og permeabiliserte COS-celler ble testet ved å inkubere dem i 30 minutter med TIE-2-RB. Cellene ble deretter vasket to ganger med PBS og inkubert i ytterligere 30 minutter med PBS/10% bovint kalveserum/anti-humant IgG-alkalisk fosfatasekonjugat. Etter tre PBS-vaskinger ble cellene inkubert i alkalisk fosfatasesubstrat i 30-60 minutter. Skålen ble deretter inspisert mikroskopisk for nærværet av fargede celler. For hver fargede celle ble et lite område av celler som inneholdt den fargede celle, skrappt fra platen under anvendelse av en plastpipettetupp, og plasmid-DNA ble deretter isolert og anvendt for å elektroporere bakterieceller. Enkelte bakteriekolonier fra denne elektroporese ble samlet, og plasmid-DNA fremstilt fra disse kolonier ble anvendt for å transfisere COS-7-celler som var blitt testet for TIE-2-ligandekspresjon ifølge bindingen til TIE-2-receptorlegemer. Dette gjorde det mulig å identifisere enkelte kloner som kodet for TIE-2-liganden. Bekreftelse av TIE-2-ligandekspresjon ble oppnådd ved fosforylasjon av TIE-2-receptor under anvendelse av fremgangsmåten som ble beskrevet i Eksempel 5. En plasmidklon som kodet for TIE-2-liganden, ble deponert hos ATCC den 7. oktober 1994 med benevnelsen "pJFE14 som koder for TIE-2-ligand", under ATCC-tilgangsnummeret 75910.

35

EKSEMPEL 7 ISOLERING OG SEKVENSIERING AV UFORKORTET
CDNA-KLON SOM KODER FOR HUMAN TIE-2-LIGAND

En human føtal lunge-cDNA-samling i lambda gt-10 (jfr. Figur 3) ble erholdt fra Clontech Laboratories Inc. (Palo Alto, CA). Plakk ble plassert på plater i en tetthet på 1,25 x 10⁶/20x20 cm plate, og gjentatte filtreringer ble utført ifølge standardprosedyrer (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. utg., s. 8.46, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York).

- 10 Isolasjon av humane tie-2-ligandkloner ble utført som følger. Et 2,2 kb XhoI-fragment fra den deponerte tie-2-ligandklon (ATCC-nr. 75910 - jfr. Eksempel 6 ovenfor) ble merket ved tilfeldig priming til en spesifikk aktivitet på ca. 5 x 10⁸ cpm/ng. Hybridisering ble utført ved 65°C i en
- 15 hybridiseringsoppløsning som inneholdt 0,5 mg/ml laksesæd-DNA. Filtrene ble vasket ved 65°C i 2 x SSC, 0,1% SDS og utviklet på Kodak XAR-5-film over natten ved -70°C. Positive fager ble rensset for plakk. Høytiters faglysater av ren fag ble anvendt for isolasjon av DNA via en Qiagen-
- 20 kolonne under anvendelse av standardteknikker (Qiagen, Inc., Chatsworth, CA, 1995-katalog, s. 36). Fag-DNA ble spaltet med EcoRI for å frigi det klonede cDNA-fragment for påfølgende subkloning. En lambda-fagvektor som inneholdt human tie-2-ligand-DNA ble deponert hos ATCC den 26. oktober 1994 med benevnelsen "λgt10 som koder for htie-2-ligand 1" (ATCC-tilgangsnummer 75928). Fag-DNA kan underkastes direkte DNA-sekvensanalyse ved dideoxy-kjede-terminasjonsmetoden (Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74:5463-5467).

30

Subkloning av human TIE-2-ligand i pattedyrs ekspresjonsvektor

- 35 Klonen λgt10 som koder for htie-2-ligand 1, inneholder en EcoRI-stilling som er plassert 490 basepar nedstrøms fra starten av kodesekvensen for human tie-2-ligand. Kodepartiet kan fjernes under anvendelse av ensartede restriks-

sjonsstillinger oppstrøms og nedstrøms for initiatoren hhv. stopkodon. F.eks. en Spel-stilling, plassert 70 basepar 5' for initiator-kodonet, og en Bpu1102i-stilling (også kjent som B1pl), plassert 265 basepar 3' for stopkodonet, kan anvendes for å skjære ut det fullstendige kodende parti. Dette kan deretter subklones i pJFE14-klonvektor under anvendelse av XbaI- (kompatibel med Spel-**overheng**) og PstI-stillingene (PstI- og Bpu1102i-stillingene gjøres hver buttendet).

Sekvensiering av human TIE-2-ligand

Det kodende parti fra klonen λ gt10 som koder for htie-2-ligand 1 ble sekvensiert under anvendelse av en ABI 373A DNA-sekvensierer og "Taq Dyedexy Terminator Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Nukleotidet, og den avledede aminosyresekvens av human TIE-2-ligand fra klonen λ gt10 som koder for htie-2-ligand 1 vises på Figur 4.

I tillegg ble uforkortede humane TIE-2-ligand-cDNA-kloner erholdt ved å teste en samling av humant glioblastom-T98G-cDNA i pJFE14-vektoren. Kloner som kodet for human tie-2-ligand, ble identifisert ved DNA-hybridisering under anvendelse av et 2,2 kb XhoI-fragment fra den deponerte tie-2-ligandklon (ATCC nr. 75910) som genprobe (jfr. Eksempel 6 ovenfor). Det kodende parti ble sekvensiert under anvendelse av en ABI 373A DNA-sekvensierer og "Taq Dyedexy Terminator Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Denne sekvens var nærmest identisk med sekvensen for klonen λ gt10 som koder for htie-2-ligand 1. Som vist på Figur 4 inneholder klonen λ gt10 som koder for htie-2-ligand 1, et ytterligere glycinresiduum, som kodes for med nukleotidene 1114-1116. Kodesekvensen av T98G-klonen inneholder ikke dette glycinresiduum, men er ellers identisk med kodesekvensen av λ gt10 som koder for htie-2-

ligand 1. Figur 5 viser nukleotidsekvensen og den avledede aminosyresekvens av human TIE-2-ligand fra T98G-klonen.

EKSEMPEL 8 ISOLERING OG SEKVENSIERING AV EN ANDRE UFOR-
KORTET cDNA-KLON SOM KODER FOR HUMAN TIE-2-
LIGAND

En samling av humant føtalt lunge-cDNA i lambda gt-10 (jfr. Figur 3) ble erholdt fra Clontech Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA). Plakk ble plassert på plater i en tetthet på $1,25 \times 10^6/20 \times 20$ cm plate, og gjentatte filtreringer ble utført ifølge standard prosedyrer (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. utg., s. 8.46, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York).

Doble filtre ble testet ved lav stringens ($2 \times \text{SSC}$, 55°C) med genprober som var rettet mot human tie-2 L-1-sekvensen. Et av de doble filtre ble testet med en 5'-genprobe som kodet for aminosyrene 25-265 av human tie-2L-1 som vist på Figur 4. Det andre doble filter ble testet med en 3'-genprobe som kodet for aminosyrene 282-498 av human tie-2 L-1-sekvens (jfr. Figur 4). Begge genprober ble hybridisert ved 55°C i hybridiseringsoppløsning som inneholdt 0,5 mg/ml laksesæd-DNA. Filtrene ble vasket i $2 \times \text{SSC}$ ved 55°C og utviklet over natten på røntgenfilm. I tillegg ble doble filtre også hybridisert ved normal stringens ($2 \times \text{SSC}$, 65°C) til uforkortet kode-genprobe av muse-tie2L (F3-15, Xhol-innføyelse). Man valgte ut tre positive kloner, som oppfylte de følgende kriterier: i. hybridisering ble ikke observert til den uforkortede (muse)-genprobe ved normal stringens, og ii. hybridisering ble iakttatt ved lav stringens for både 5'- og 3'-genprobene. EcoRI-spaltning av fag-DNA som ble erholdt fra disse kloner, tydet på to uavhengige kloner med innføyelsesstørrelser på ca. 2,2 kb hhv. ca. 1,8 kb. EcoRI-innføyelsen på 2,2 kb ble subklonet i EcoRI-stillingene av både pBluescript KS-vektoren (Stratagene) og en pattedyrs-ekspresjonsvektor egnet for anvendelse i COS-celler. To orienteringer ble identifisert for pattedyrs-

ekspresjonsvektoren. 2,2 kb-innnføyelsen i pBluescript KS ble deponert hos ATCC den 9. desember 1994 med benevnelsen "pBluescript KS som koder for human TIE-2-ligand 2". Startposisjonen av den TIE-2-ligand 2-kodende sekvens er ca. 355
5 basepar nedstrøms for pBluescript EcoRI-stillingen.

COS-7-celler ble forbigående transfisert med enten ekspresjonsvektoren eller en kontrollvektor ifølge DEAE-dekstran-transfeksjonsprotokollen. Kort sagt ble COS-7-celler plassert på plater i en tetthet på $1,0 \times 10^6$ celler pr. 100 mm plate 24 timer før transfeksjonen. For transfeksjon ble cellene kultivert i serumfritt DMEM som inneholdt 400 µg/ml DEAE-dekstran, 1 µM klorkin og 2 mM glutamin, og 1 µg av det egnede DNA i 3-4 timer ved 37°C under en atmosfære av
10 5% CO₂. Transfeksjonsmediet ble oppsugd og skiftet ut mot fosfatbufret saltvann med 10% DMSO i 2-3-minutter. Etter denne DMSO-"sjokk" ble COS-7-cellene plassert i DMEM med 10% FBS, hver 1% penicillin og streptomycin og 2 mM glutamin i 48 timer.

20 Fordi TIE-2-liganden utsondres, var det nødvendig å permeabilisere cellene for å påvise binding av receptorlegemenproben til liganden. Transfiserte COS-7-celler ble plassert på plater i en tetthet på $1,0 \times 10^6$ celler pr. 100
25 mm plate. Cellene ble skylt med PBS og deretter inkubert med PBS som inneholdt 1,8% formaldehyd i 15-30 minutter ved værelsestemperatur. Cellene ble deretter vasket med PBS og inkubert i 15 minutter med PBS som inneholdt 0,1% triton X-100 og 10% bovint kalveserum for å permeabilisere cellene
30 og blokkere ikke-spesifikke bindingssteder. Testingen ble utført ved direkte lokalisering av flekker under anvendelse av TIE-2-receptorlegemet, som bestod av det ekstracellulære parti av TIE-2 som var smeltet sammen med IgG1-konstant parti. Dette receptorlegeme ble fremstilt som beskrevet i
35 Eksempel 2. Transfiserte COS-celler ble testet ved å inkubere dem i 30 minutter med TIE-2-RB. Cellene ble deretter vasket to ganger med PBS, fiksert med metanol og inkubert i

ytterligere 30 minutter med PBS/10% bovint kalveserum/anti-humant IgG-alkalisk fosfatasekonjugat. Etter tre PBS-vas-
kinger ble cellene inkubert i alkalisk fosfatasesubstrat i
30-60 minutter. Skålen ble deretter inspisert mikroskopisk
5 for nærværet av fargede celler. Celler som uttrykte én
orientering av klonen, men ikke den andre, syntes å binde
TIE-2-receptorlegemet.

En fagmann vil lett se at de beskrevne fremgangsmåter kan
10 anvendes for å ytterligere identifisere andre beslektede
medlemmer av TIE-ligandfamilien.

Sekvensiering av den andre humane TIE-2-ligand

15 Kodepartiet fra klonen pBluescript KS som koder for human
TIE-2-ligand 2, ble sekvensiert under anvendelse av en ABI
373A DNA-sekvensierer og et "Taq Dyedexy Terminator Cycle
Sequencing Kit" (Applied Biosystems, Inc., Foster City,
CA). Nukleotidsekvensen og den avledede aminosyresekvens av
20 human TIE-2-ligand fra klonen pBluescript KS som koder for
human TIE-2-ligand 2, vises på Figur 6.

EKSEMPEL 9 TIE-2-LIGAND 2 ER EN RECEPTORANTAGONIST

25 Kondisjonert medium fra COS-celler som uttrykte enten
TIE-2-ligand 2 (TL2) eller TIE-2-ligand 1 (TL1) ble sammen-
lignet vedrørende sin evne til å aktivere TIE-2-receptorer
som foreligger naturlig i en human endotelcellelinje.

30 Lipofektaminreagens (GIBCO-BRL, Inc.) og anbefalte proto-
koller ble anvendt for å transfiserer COS-7-celler med enten
kun pJFE14-ekspresjonsvektor, med pJFE14-vektor som inne-
holdt human TIE-2-ligand 1-cDNA, eller med en pMT21-ekspre-
sjonsvektor (Kaufman, R.J., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci.
35 USA 82:689-693) som inneholdt human TIE-2-ligand 2-cDNA.
COS-media som inneholdt utsondrede ligander, ble isolert
etter tre dager og konsentrert 20 ganger ved diafiltrering

(DIAFLO-ultrafiltreringsmembraner, Amicon, Inc.). Mengden aktiv TIE-2-ligand 1 og TIE-2-ligand 2 i disse medier, ble bestemt og uttrykt som mengden (i resonansenheter, R.U.) TIE-2-receptorspesifikk bindingsaktivitet ifølge et BIAcore
5 bindingsassay.

"Northern" (RNA-) analyse viste signifikante mengder TIE-2-transkripsjoner i HAEC- (humane aorta-endotelceller) humane primære endotelceller (Clonetics, Inc.). Derfor ble disse
10 celler anvendt for å undersøke om TIE-2-receptor tyrosin-fosforyleres når den behandles med COS-media som inneholder TIE-2-ligandene. HAEC-cellene ble holdt i et fullstendig endotelcellevekstmedium (Clonetics, Inc.), som inneholdt 5% føtalt bovint serum, oppløselig bovint hjerneekstrakt, 10
15 ng/ml human EGF, 1 mg/ml hydrokortison, 50 mg/ml gentamicin og 50 ng/ml amfotericin-B. Bestemmelsen om TL1 og TL2 kunne aktivere TIE-2-receptor i HAEC-celler, ble utført som følger. Semikonfluerende HAEC-celler ble berøvet for serum i 2 timer i høyt glykoseholdig Dulbeccos MEM med tilsatt L-glutamin og penicillin-streptomycin ved 37°C, etterfulgt av
20 utskifting av berøvningsmediet med ligandholdig kondisjonert COS-medium i 7 minutter ved 37°C i en 5% CO₂-inkubator. Cellene ble deretter oppløst, og TIE-2-receptor-proteinet ble isolert ved immunofelning av lysatene med
25 TIE-2-peptid-antiserum, etterfulgt av "western blotting" med anti-fosfotyrosin-antiserum, nøyaktig som beskrevet i Eksempel 1. Resultatene vises på Figur 7. Fosfotyrosinmengder på TIE-2-receptor (TIE2-R) ble indusert ved behandling av HEAC-celler med COS-medium som var kondisjonert med
30 TIE-2-ligand 1 (bane L1), men ikke med TIE-2-ligand 2 (bane L2). BLINDPRØVE er kondisjonert medium fra COS som var transfisert med JFE14-tom vektor.

Tegn på at TL1 og TL2 spesifikt bindes til TIE-2-receptor,
35 ble demonstrert under anvendelse av en BIAcore for å teste TIE-2-receptorspesifikk bindingsaktivitet i transfisert

COS-medium og ved immunofarging av TL1- og TL2-uttrykkende COS-celler med TIE-2-receptorlegemer.

5 Fordi TL2 ikke aktiverte TIE-2-receptor, prøvde foreliggende oppfinnere å finne ut om TL2 kanskje kunne tjene som antagonist mot TL1-aktivitet. HAEC-fosforylasjonsassayer ble utført, hvor cellene først ble inkubert med et "overskudd" TL2, etterfulgt av tilsetningen av fortynnet TL1. Man resonerte at tidligere besetning av TIE-2-receptor på
10 grunn av store mengder TL2, kanskje kunne hindre en påfølgende stimulering av receptoren etter behandling med TL1 i en begrenset konsentrasjon.

15 Semikonfluente HAEC-celler ble berøvet for serum som beskrevet ovenfor, og deretter inkubert i 3 minutter ved 37°C med 1-2 ml 20X COS/JFE14-TL2-kondisjonert medium. Kontrollplatene ble behandlet med 20X kun COS/JFE14-medium (BLIND-PRØVE). Platene ble fjernet fra inkubatoren, og forskjellige fortynninger COS/JFE14-TL1-medium ble deretter tilsatt,
20 etterfulgt av ytterligere inkubering av platene i 5-7 minutter ved 37°C. Cellene ble deretter skylt og oppløst, og TIE-2-spesifikk tyrosinfosforylasjon i lysatene ble undersøkt ved receptor-immunofelning og "western blotting" som beskrevet ovenfor. TL1-fortynninger ble brukt under
25 anvendelse av 20X COS/JFE14-TL1-medium som var fortynnet til 2X, 0,5X, 0,1X eller 0,02X ved tilsetning av 20X kun COS/JFE14-medium. Et assay av de opprinnelige 20X-TL1- og 20X-TL2-COS-media under anvendelse av BIAcore bioføler-teknologi tyder på at de inneholdt lignende mengder TIE-2-spesifikke bindingsaktiviteter, dvs. 445 R.U. og 511 R.U.
30 for TL1 hhv. TL2. Resultatene av antifosfotyrosin-"western blot", vist på Figur 8, tyder på at sammenlignet med tidligere behandling av HAEC-celler med BLINDPRØVE-medium (bane 1), antagoniserer en forbehandling av HAEC-celler med et
35 overskudd TIE-2-ligand 2 (bane 2) den påfølgende evne av fortynnet TIE-2-ligand 1 til å aktivere TIE-2-receptor (TIE2-R).

Disse data tyder på at TL2, til forskjell fra TL1, ikke kunne stimulere TIE-2-receptorkinaseaktivitet i HAEC-celler. Videre blokkerte en forinkubasjon av endotelcellene med høye konsentrasjoner av TL2 etterfulgt av tilsetningen av TL1, evnen av TL1 til å stimulere TIE-2-receptor, hvilket tyder på at TL2 er en TIE-2-receptorantagonist.

10 EKSEMPEL 10 IDENTIFIKASJON AV TIE-2-SPESTIFIKK BINDINGS-
AKTIVITET I KONDISJONERT MEDIUM OG COS-
CELLESUPERNATANTER

Bindingsaktiviteten av 10X CCM fra cellelinjene C2C12-ras-, Rat2-ras-, SHEP- og T98G- eller cos-cellesupernatanter etter transfeksjon med enten human TIE-2-ligand 1 (hTL1) eller human TIE-2-ligand 2 (hTL2) ble målt under anvendelse av biofølerteknologi (BIAcore; Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ), som måler biomolekylære vekselvirkninger i sanntid via flateplasmon-resonans (SPR). Renset TIE-2-RB ble kovalent bundet via primære aminer til karboksymetyldextransjiktet av en CM5 forskningskvalitets følerchip (Pharmacia Biosensor; Piscataway, NJ). Følerchipens flate ble aktivert under anvendelse av en blanding av N-hydroksysuksinimid (NHS) og N-etyl-N'-(3-dimetylaminopropyl)karbodiimid (EDC) etterfulgt av immobiliseringen av TIE-2-RB (25 µg/ml, pH 4,5) og deaktivering av ureagerte stillinger med 1,0M etanolamin (pH 8,5). Generelt ble 9000-10000 R.U. av hvert receptorlegeme koblet til følerchipen.

30 Løpebufferen anvendt i systemet, var HBS (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,005% P₂O-surfaktant, pH 7,4). Prøvene ble sentrifugert i 15 minutter ved 4°C og ytterligere klarnet under anvendelse av et sterilt, lavt proteinbindende 0,45 µm filter (Millipore; Bedford, MA). Dekstran (2 mg/ml) og P₂O-surfaktant (0,005%) ble tilsatt til hver prøve. Alikvoter på 40 µl ble injisert gjennom den immobiliserte overflate (enten rotte- eller human TIE2) i en strømnings-

hastighet på 5 µl/min, og receptorbindingen ble overvåket i 8 minutter. Bindingsaktiviteten (resonansenheter, R.U.) ble målt som forskjellen mellom en grunnverdi som ble bestemt 30 sekunder før injeksjon av prøven, og en måling som ble tatt 30 sekunder etter injeksjonen. Regenerering av overflaten ble utført med et 15 µl støt av 3 M MgCl₂.

CCM-prøvene (C2C12-ras, Rat2-ras, SHEP, T98G) ble testet på den rotte-TIE2-RB-immobiliserte overflate, mens rekombinant hTL1 og hTL2 ble testet på den human TIE2-RB-immobiliserte overflate. I hvert tilfelle ble den spesifikke binding til TIE-2-receptorlegemet bedømt ved å inkubere prøvene med 25 µg/ml enten oppløselig rotte- eller humant TIE-2-RB eller trkB-RB før testing av bindingsaktiviteten. Som vist på Figurene 9 og 10 forårsaker tilsetningen av oppløselig trkB-RB en svak nedgang av TIE-2-bindingsaktiviteten, mens tilsetningen av oppløselig TIE-2-RB signifikant senker bindingsaktiviteten sammenlignet med det som måles i fravær av TIE-2-RB.

20

EKSEMPEL 11 TIE-2-RB BLOKKERER SPESIFIKT AKTIVERINGEN AV TIE-2-RECEPTOREN VED TIE-2-LIGAND 1

Foreliggende oppfinnere prøvde å bestemme om oppløselig TIE-2-RB kan tjene som en kompetitiv hemmer for å blokkere TIE-2-ligandens 1 (TL1) aktivering av TIE-2-receptor. For å undersøke dette ble TL1-holdig COS-media på forhånd inkubert med enten TIE2-RB eller TrkB-RB og deretter sammenlignet hva angår deres evne til å aktivere TIE-2-receptorer som forekommer naturlig i en human endotelcellelinje.

30

Kondisjonerte COS-media ble generert fra COS-7-celler som var transfisert med enten kun pJFE14-ekspresjonsvektoren (BLINDPRØVE) eller med pJFE14-vektor som inneholdt human TIE-2-ligand 1-cDNA (TL1) og som ble isolert som beskrevet ovenfor i Eksempel 9, unntatt at mediene ble sterilfiltrert, men ikke konsentrert. Mengden TL1 ble bestemt og

35

uttrykt som mengden (i resonansenheter, R.U.) TIE-2-receptorspesifikk bindingsaktivitet ifølge BIAcore-bindingsassay.

- 5 "Northern" (RNA-) analyse viste signifikante mengder TIE-2-transkripsjoner i HUVEC- (human navlevene-endotelcelle) humane primære endotelceller (Clonetics, Inc.). Derfor ble disse celler anvendt for å undersøke om TIE-2-receptor kan tyrosinfosforyleres når de i nærvær av TIE2- eller TrkB-RB
- 10 utsettes for COS-medium som inneholder TL1. HUVEC-celler ble holdt ved 37°C, 5% CO₂ i et fullstendig endotelcellevækstmedium (Clonetics, Inc.) som inneholdt 5% føtalt bovint serum, oppløselig bovint hjerneekstrakt med 10 µg/ml heparin, 10 ng/ml human EGF, 1 µg/ml hydrokortison, 50
- 15 µg/ml gentamicin og 50 ng/ml amfotericin-B. Bestemmelsen om hvorvidt TL1 kunne aktivere TIE-2-receptor i HUVEC-cellene, ble utført som følger. Sammenløpende skåler av HUVEC-celler ble berøvet for serum i 2-4 timer i lav-glykose Dulbeccos MEM ved 37°C, 5% CO₂, etterfulgt av 10 minutters inkubasjon
- 20 i et berøvelsesmedium som omfattet 0,1 mM natriumorto-vanadat, en sterk hemmer av fosfotyrosinfosfatase. Imens ble COS-medier på forhånd inkubert i 30 minutter ved værelsestemperatur med enten TIE2- eller TrkB-RB, tilsatt til 50 µg/ml. Berøvelsesmediet ble deretter fjernet fra HUVEC-
- 25 skålene og inkubert med de RB-holdige COS-medier i 7 minutter ved 37°C. HUVEC-cellene ble deretter oppløst, og TIE-2-receptorprotein ble isolert ved immunofelning med TIE-2-peptidantiserum, etterfulgt av "Western blotting" med et anti-fosfotyrosin-antistoff som beskrevet i Eksempel 1.
- 30 Resultatene vises på Figur 11. Fosfotyrosinmengdene på TIE-2-receptor ble indusert ved behandling av HUVEC-cellene med TIE-2-ligand 1 (TL1) i forhold til hva som er synlig med kontrollmediet (BLINDPRØVE), og denne induksjon blokkeres spesifikt ved tidligere inkubasjon med TIE2-RB (TIE2-Fc), men ikke ved tidligere inkubasjon med TrkB-RB (TrkB-Fc). Disse data tyder på at oppløselig TIE-2-RB kan tjene
- 35

som en selektiv hemmer for å blokkere aktiveringen av TIE-2-receptor ved TIE-2-ligand 1.

EKSEMPEL 12 KONSTRUKSJON AV TIE-2-LIGANDLEGEMER

5

Det ble skapt en ekspresjonskonstruksjon som ville gi et utsondret protein bestående av den fullstendige kodende sekvens for human TIE-2-ligand 1 (TL1) eller TIE-2-ligand 2 (TL2) smeltet sammen med human immunoglobulin gamma-1-konstant parti (IgG1-Fc). Disse fusjonsproteiner benevnes TIE-2-"ligandlegemer" (TL1-Fc eller TL2-Fc). Fc-partiet av TL1-Fc og TL2-Fc ble fremstilt som følger. Et DNA-fragment som koder for Fc-partiet av humant IgG1 som strekker seg fra hengselpartiet til karboksyterminus av proteinet, ble
10 amplifisert fra human placenta-cDNA ved PCR med oligonukleotider som tilsvarte den publiserte sekvens av IgG1; det resulterende DNA-fragment ble klonet i en plasmidvektor. Egnede DNA-restriksjonsfragmenter fra et plasmid som kodet for uforkortet TL1 eller TL2 og fra human IgG1-Fc-plasmid,
15 ble ligert på enten side av et kort PCR-derivert fragment som var utviklet for å innen rammen smelte sammen TL1 eller TL2 med humane IgG1-Fc-proteinkodende sekvenser.

TL2-Fc i milligramstørrelsesorden ble erholdt ved å klon
25 TL2-Fc-DNA-fragmentet inn i pVL1393-baculovirusvektoren og å deretter infisere *Spodoptera frugiperda* SF-21AE-insektcellelinjen. Alternativt kan cellelinjen SF-9 (ATCC-tilgangsnummer CRL-1711) eller cellelinjen BTI-TN-5b1-4 anvendes. DNA som koder for TL2-Fc, ble klonet som et Eco RI-
30 NotI-fragment inn i baculovirus-overføringsplasmidet pVL1393. Plasmid-DNA ble rekombinert i viralt DNA ved å blande 3 mg plasmid-DNA med 0,5 mg Baculo-Gold-DNA (Pharminigen), etterfulgt av innføring i liposomer under anvendelse av 30 mg Lipofectin (GIBCO-BRL). DNA-liposomblandinger
35 ble tilsatt til SF-21AE-celler (2×10^6 celler/60 mm skål) i TMN-FH-medium (modifisert Graces insektcellemedium, GIBCO-BRL) i 5 timer ved 27°C, etterfulgt av inkubasjon ved

27°C i 5 dager i TMN-FH-medium supplementert med 5% føtalt kalveserum. Vevkulturmediet ble isolert for plakkrensing av rekombinante virus, hvilket ble utført ved anvendelse av tidligere beskrevne fremgangsmåter (D.R. O'Reilly, L.K.

5 Miller og V.A. Luckow, Baculovirus Expression Vectors - A Laboratory Manual, 1992, New York: W.H. Freeman), unntatt at agarosesupernatanten inneholdt 125 mg/ml X-gal (5-brom-4-klor-3-indolyl-b-D-galaktopyranosid; GIBCO-BRL). Etter 5 dagers inkubasjon ved 27°C ble ikke-rekombinante plakk
10 bedømt ved positiv kromogen reaksjon med X-gal-substratet, og deres stillinger ble merket. Rekombinante plakk ble deretter anskueliggjort ved tilsetning av en andre supernatant som inneholdt 100 mg/ml MTT (3-[4,5-dimetyltiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolbromid; Sigma). Formentlige rekombi-
15 nante virusplakk ble plukket ved pluggbortsuging og rensset ved flere omganger plakkisolasjon for å sikre homogeniteten. Virusstammer ble generert ved seriell lavt antalls passasje av plakkrenset virus. Stammer av én virusklon med lavt antall passasjer (vTL2-Fc-klon nr. 7) ble fremstilt.

20

SF-21AE-celler ble kultivert i serumfritt medium (SF-900 II, Gibco BRL) som inneholdt 1X antibiotisk/antimykotisk oppløsning (Gibco BRL) og 25 mg/l gentamycin (Gibco BRL). "Pluronic" F-68 ble tilsatt som surfaktant til en slutlig
25 konsentrasjon på 1 g/l. Kulturer (4 l) ble dyrket i en bioreaktor (Artisan Cell Station System) i minst 3 dager før infiseringen. Celler ble dyrket ved 27°C under en gasstrøm til 50% oppløst oksygen ved en gass-strømningshastighet på 80 ml/min (beluftning med spredning). Ryst-
30 ning ble utført ved hjelp av en "marine impeller" ved en hastighet på 100 rpm. Cellene ble samlet i den midtlogaritmiske vekstfase (ca. 2×10^6 celler pr. ml), konsentrert ved sentrifugering og infisert med 5 plakkdannende enheter vTL2-Fc pr. celle. Celler og podestoff ble brakt til 400 ml
35 med ferskt medium, og viruset ble adsorbert i 2 timer ved 27°C i en roterende kolbe. Kulturen ble deretter resuspendert i et slutlig volum på 8 l med ferskt serumfritt medi-

um, og cellene ble inkubert i bioreaktoren under anvendelse av de tidligere beskrevne betingelser.

Kulturmedium fra vTL2-Fc-infiserte SF21AE-celler ble samlet
5 ved sentrifugering (500 g, 10 minutter) 72 timer etter
infeksjonen. Cellesupernatantene ble brakt til pH 8 med
NaOH. EDTA ble tilsatt til en slutlig konsentrasjon på 10
mM, og supernatantens pH-verdi ble gjenjustert til 8.
Supernatantene ble filtrert (0,45 µm, Millipore) og ladet
10 på en protein A-kolonne (protein A-sepharose 4 raskt flyt-
ende eller HiTrap-protein A, begge fra Pharmacia). Kolonnen
ble vasket med PBS som inneholdt 0,5 M NaCl inntil absor-
bansen ved 280 nm sank til grunnlinjen. Kolonnen ble vasket
i PBS og eluert med 0,5M eddiksyre. Kolonnefraksjonene ble
15 umiddelbart nøytralisert ved å eluere i rør som inneholdt
1M Tris pH 9. Toppfraksjonene som inneholdt TL2-Fc, ble
samlet og dialysert mot PBS.

DEPONERINGER

20 De følgende prøver er deponert hos American Type Culture
Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852
ifølge Budapest-avtalen. En plasmidklon som koder for en
TIE-2-ligand, ble deponert hos ATCC den 7. oktober 1994 med
25 benevnelsen "pJFE14 som koder for TIE-2-ligand" under ATCC-
tilgangsnummeret 75910. Rekombinant *Autographa californica*-
baculovirus som koder for TIE-2-receptorlegeme, ble depo-
nert hos ATCC den 7. oktober 1994 med benevnelsen "vTIE-2-
receptorlegeme" under ATCC-tilgangsnummeret VR2484. En
30 lambda-fagvektor som inneholdt human tie-2-ligand-DNA, ble
deponert hos ATCC den 26. oktober 1994 og benevnt "λgt10
som koder for htie-2-ligand 1" under ATCC-tilgangsnummeret
75928. En plasmidklon som koder for en andre TIE-2-ligand,
ble deponert hos ATCC den 9. desember 1994 med benevnelsen
35 "pBluescript KS som koder for human TIE-2-ligand 2" under
ATCC-tilgangsnummeret 75963.

P a t e n t k r a v

1. Isolert nukleinsyremolekyl som koder for en TIE-2-
5 ligand, hvor nukleinsyresekvensen er:
 - (a) nukleinsyresekvensen som omfatter det kodende parti av human TIE-2-ligand som vist på Figur 4 eller Figur 5,
 - (b) en nukleinsyresekvens som hybridiseres under moderat stringente betingelser til nukleinsyresekvensen ifølge
10 (a), og som koder for en TIE-2-ligand som binder TIE-2-reseptor, eller
 - (c) en nukleinsyresekvens som, hvis det ikke var for at den genetiske kode er degenerert, ville hybridiseres til en nukleinsyresekvens ifølge (a) eller (b), og som
15 koder for en TIE-2-ligand som binder TIE-2-reseptor.
2. Nukleinsyremolekyl ifølge krav 2, hvor TIE-2-liganden som kodes for, er en TIE-2-agonist.
3. Isolert nukleinsyremolekyl som koder for en TIE-2-
ligand, hvor nukleinsyresekvensen er:
 - 20 (a) nukleinsyresekvensen som omfatter det kodende parti av human TIE-2-ligand som vist på Figur 6,
 - (b) en nukleinsyresekvens som hybridiseres under moderat stringente betingelser til nukleinsyresekvensen ifølge (a), og som koder for en TIE-2-ligand som binder
25 TIE-2-reseptor, eller
 - (c) en nukleinsyresekvens som, hvis det ikke var for at den genetiske kode er degenerert, ville hybridiseres til en nukleinsyresekvens ifølge (a) eller (b), og som koder for en TIE-2-ligand som binder TIE-2-reseptor.

4. Nukleinsyremolekyl ifølge krav 3, hvor TIE-2-liganden som kodes for, er en TIE-2-antagonist.
5. Vektor som omfatter et nukleinsyremolekyl ifølge et av de forutgående krav.
- 5 6. Vektor ifølge krav 5, hvor nukleinsyremolekylet er operativt forbundet med en ekspresjonskontrollsekvens som har evnen til å regulere dens ekspresjon i en vertscelle.
7. Vektor ifølge krav 5 eller 6 som er et plasmid.
8. Plasmid ifølge krav 7, benevnt pJFE14 som koder for
10 TIE-2-ligand med ATCC-tilgangsnummer 75910.
9. Plasmid ifølge krav 7, benevnt pBluescript KS som koder for human TIE-2-ligand 2 med ATCC-tilgangsnummer 75963.
10. Vektor ifølge krav 5 eller 6, benevnt λ gt10 som koder
15 for hTIE-2-ligand 1 med ATCC-tilgangsnummer 75928.
11. Isolert TIE-2-ligand som har aminosyresekvensen angitt i figur 4, 5 eller 6 eller et fragment eller derivat derav og som binder TIE-2-reseptor, hvilket protein er i alt vesentlig fri for andre proteiner.
- 20 12. Isolert TIE-2-ligand koder for av en nukleinsyre ifølge krav 1 eller 2 og som er i hovedsak fri for andre proteiner.
13. Isolert TIE-2-ligand kodet for av nukleinsyre ifølge krav 3 eller 4 og som er i hovedsak fri for andre protei-
25 ner.

14. Vert/vektor-system for fremstilling av en ligand ifølge et av kravene 11-13, som omfatter en vektor ifølge et av kravene 7-12 i en vertscelle.
15. Vert/vektor-system ifølge krav 14, hvor vertscellen er en bakteriecelle, en gjærcelle, en insektcelle eller en pattedyrcelle.
16. Vert/vektor-system som omfatter vert/vektor-systemet ifølge krav 14 eller 15 og en nukleinsyre som koder for TIE-2-reseptor.
17. Fremgangsmåte ved fremstilling av en ligand ifølge et av kravene 11-13, omfattende dyrking av celler i et vert/vektor-system ifølge et av kravene 14-16 under betingelser som tillater fremstilling av liganden, og gjenvinning av den således fremstilte ligand.
18. Antistoff som spesifikt binder liganden ifølge et av kravene 11-13.
19. Antistoff ifølge krav 18, som er et monoklonalt antistoff.
20. Ligandlegeme som omfatter en TIE-2-ligand som definert i ethvert av kravene 11-13 kondensert til et immunoglobulin konstant område.
21. Ligandlegeme ifølge krav 20, hvor TIE-2-liganden har aminosyresekvensen angitt i figur 4, 5 eller 6 og det immunoglobulin konstante område er Fc-delen av humant IgG1.
22. Konjugat som omfatter en ligand ifølge et av kravene 11-13 og et cytotoksisk middel som er konjugert med denne.
23. Konjugat ifølge krav 22, hvor det cytotoksiske middel er en radioisotop eller et toksin.

24. Farmasøytisk blanding omfattende en TIE-2-ligand ifølge et av kravene 11-13 og et farmasøytisk akseptabelt bærerstoff.

5 25. Farmasøytisk sammensetning omfattende et ligandlegeme ifølge krav 20 eller 21 og et farmasøytisk akseptabelt bærerstoff.

26. Farmasøytisk sammensetning omfattende et konjugat ifølge krav 22 eller 23 og et farmasøytisk akseptabelt bærerstoff.

10 27. Anvendelse av ligand ifølge ethvert av kravene 11-13, ligandlegeme ifølge krav 20 eller 21, konjugat ifølge krav 22 eller 23, eller en sammensetning ifølge ethvert av kravene 24-26, ved fremstilling av et medikament for anvendelse ved behandling av en menneske- eller dyrekropp, eller
15 ved diagnostisering.

28. Anvendelse av ligand ifølge krav 12 ved fremstilling av et medikament for anvendelse ved behandling av en menneske- eller dyrekropp.

20 29. Anvendelse av ligand ifølge krav 13 ved fremstilling av et medikament til behandling av en menneske- eller dyrekropp.

30. Anvendelse av ligand ifølge krav 12 ved fremstilling av et medikament for anvendelse i forbindelse med en fremgangsmåte ved fremming av neovaskularisering i et pattedyr.

25 31. Anvendelse ifølge krav 30 ved fremstilling av et medikament for anvendelse ved fremming av sårleging.

32. Anvendelse ifølge krav 30 ved fremstilling av et medikament for anvendelse ved behandling av iskemi.

33. Anvendelse av ligand ifølge krav 13 ved fremstilling av et medikament for anvendelse i en metode for å inhibere TIE-2-ligandaktivitet i et pattedyr.

34. Anvendelse ifølge krav 33 hvor pattedyret er et menneske.

35. Anvendelse ifølge krav 34 ved fremstilling av et medikament til anvendelse i en metode for å svekke eller forhindre tumorvekst i et menneske.

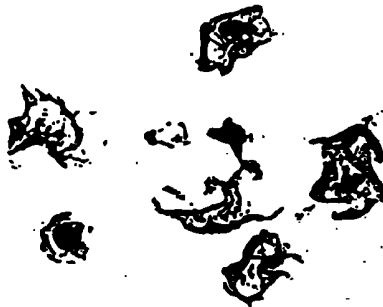
1/14

Figur 1A



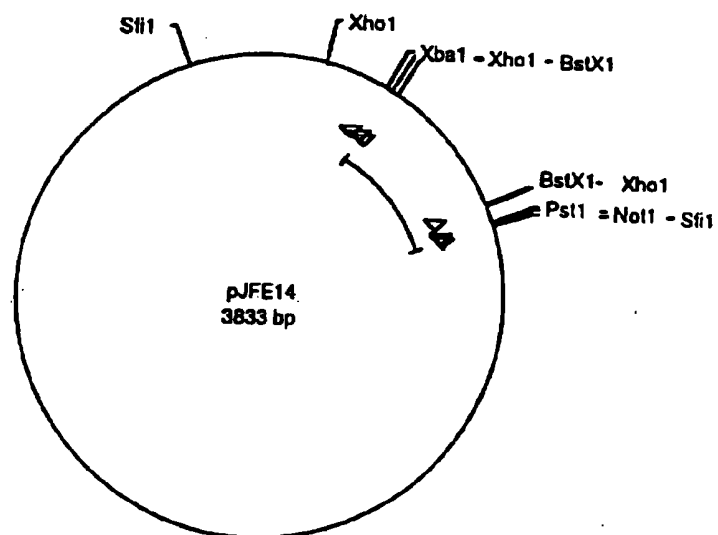
rEHK-1 ekto/h IgG1 Fc
"Gelfoam" (6 μ g)

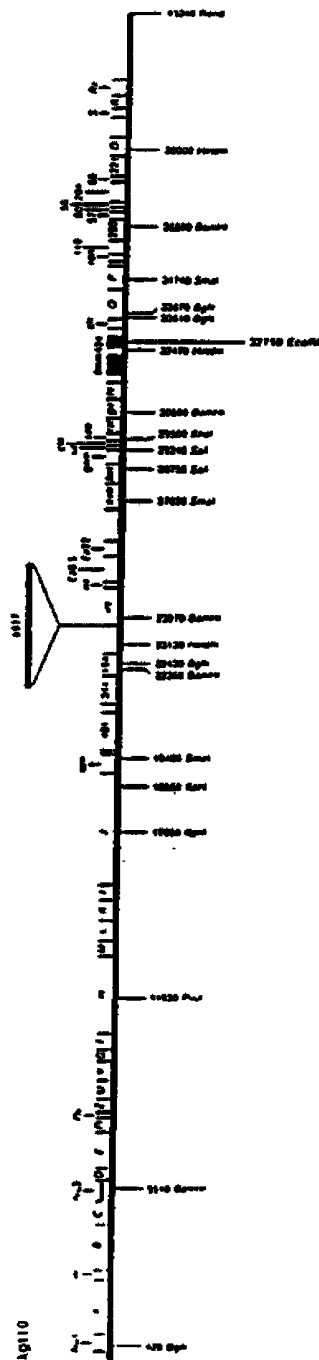
Figur 1B



rTIE-2 ekto/h IgG1 Fc
"Gelfoam" (6 μ g)

Figur 2





Figur 4

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
CAGCTGACTCAGGCAGGCTCCATGCTGAACGGTCACACAGAGAGGAAACAATAATCTCAGCTACTATGCAATAAATATC

      90      100     110     120     130     140     150     160
TCAAGTTTTAACGAAGAAAAACATCATTTGCAGTGAATAAAAAATTTTAAAAATTTTAGAACAAAGCTAACAAATGGCTAG

      170     180     190     200     210     220     230     240
TTTTCTATGATTCTTCTTCAAAACGCTTCTTTTGAGGGGGAAGAGTCAAAACAACAGCAGTTTACCTGAAATAAAGAA

      250     260     270     280     290     300     310
CTAGTTTTAGAGGTGAGAAAGGAGCAAGTTTTGCGAGAGGCACGGAAGGAGTGTGCTGGCAGTACA ATG ACA
                                         M T>

      320     330     340     350     360     370
GTT TTC CTT TCC TTT GCT TTC CTC GCT GCC ATT CTG ACT CAC ATA GGG TGC AGC AAT CAG
V F L S F A F L A A I L T H I G C S N Q>

      380     390     400     410     420     430
CGC CGA AGT CCA GAA AAC AGT GGG AGA AGA TAT AAC CGG ATT CAA CAT GGG CAA TGT GCC
R R S P E N S G R R Y N R I Q H G Q C A>

      440     450     460     470     480     490
TAC ACT TTC ATT CTT CCA GAA CAC GAT GGC AAC TGT CGT GAG AGT ACG ACA GAC CAG TAC
Y T F I L P E H D G N C R E S T T D Q Y>

      500     510     520     530     540     550
AAC ACA AAC GCT CTG CAG AGA GAT GCT CCA CAC GTG GAA CCG GAT TTC TCT TCC CAG AAA
N T N A L Q R D A P H V E P D F S S Q K>

      560     570     580     590     600     610
CTT CAA CAT CTG GAA CAT GTG ATG GAA AAT TAT ACT CAG TGG CTG CAA AAA CTT GAG AAT
L Q H L E H V H E N Y T Q W L Q K L E N>

      620     630     640     650     660     670
TAC ATT GTG GAA AAC ATG AAG TCG GAG ATG GCC CAG ATA CAG CAG AAT GCA GTT CAG AAC
Y I V E N H K S E H A Q I Q Q N A V Q N>

      680     690     700     710     720     730
CAC ACG GCT ACC ATG CTG GAG ATA GGA ACC AGC CTC CTC TCT CAG ACT GCA GAG CAG ACC
H T A T H L E I G T S L L S Q T A E Q T>

      740     750     760     770     780     790
AGA AAG CTG ACA GAT GTT GAG ACC CAG GTA CTA AAT CAA ACT TCT CGA CTT GAG ATA CAG
R K L T D V E T Q V L N Q T S R L E I Q>

      800     810     820     830     840     850
CTG CTG GAG AAT TCA TTA TCC ACC TAC AAG CTA GAG AAG CAA CTT CTT CAA CAG ACA AAT
L L E N S L S T Y K L E K Q L L Q Q T N>

      860     870     880     890     900     910
GAA ATC TTG AAG ATC CAT GAA AAA AAC AGT TTA TTA GAA CAT AAA ATC TTA GAA ATG GAA
E I L K I H E K N S L L E H K I L E H E>

      920     930     940     950     960     970
GGA AAA CAC AAG GAA GAG TTG GAC ACC TTA AAG GAA GAG AAA GAG AAC CTT CAA GGC TTG
G K H K E E L D T L K E E K E N L Q G L>

      980     990     1000    1010    1020    1030
GTT ACT CGT CAA ACA TAT ATA ATC CAG GAG CTG GAA AAG CAA TTA AAC AGA GCT ACC ACC
V T R Q T Y I I Q E L E K Q L N R A T T>

      1040    1050    1060    1070    1080    1090
AAC AAC AGT GTC CTT CAG AAG CAG CAA CTG GAG CTG ATG GAC ACA GTC CAC AAC CTT GTC
N N S V L Q K Q Q L E L H D T V H N L V>

```

Figur 4 (forts.)

1100 1110 1120 1130 1140 1150
 AAT CTT TGC ACT AAA GAA GGT GTT TTA CTA AAG GGA GGA AAA AGA GAG GAA GAG AAA CCA
 N L C T K E G V L I K G G K R E E E K P>
 1160 1170 1180 1190 1200 1210
 TTT AGA GAC TGT GCA GAT GTA TAT CAA GCT GGT TTT AAT AAA AGT GGA ATC TAC ACT ATT
 F R D C A D V Y Q A G F N K S G I Y T I>
 1220 1230 1240 1250 1260 1270
 TAT ATT AAT AAT ATG CCA GAA CCC AAA AAG GTG TTT TGC AAT ATG GAT GTC AAT GGG GGA
 Y I N N M P E P K K V F C N M D V M G G>
 1280 1290 1300 1310 1320 1330
 GGT TGG ACT GTA ATA CAA CAT CGT GAA GAT GGA AGT CTA GAT TTC CAA AGA GGC TGG AAG
 G W T V I Q H R E D G S L D F Q R G W K>
 1340 1350 1360 1370 1380 1390
 GAA TAT AAA ATG GGT TTT GGA AAT CCC TCC GGT GAA TAT TGG CTG GGG AAT GAG TTT ATT
 E Y K N G F G N P S G E Y W L G N E F I>
 1400 1410 1420 1430 1440 1450
 TTT GCC ATT ACC AGT CAG AGG CAG TAC ATG CTA AGA ATT GAG TTA ATG GAC TGG GAA GGG
 F A I T S Q R Q Y H L R I E L H D W E G>
 1460 1470 1480 1490 1500 1510
 AAC CGA GCC TAT TCA CAG TAT GAC AGA TTC CAC ATA GGA AAT GAA AAG CAA AAC TAT AGG
 N R A Y S Q Y D R F H I G N E K Q N Y R>
 1520 1530 1540 1550 1560 1570
 TTG TAT TTA AAA GGT CAC ACT GGG ACA GCA GGA AAA CAG AGC AGC CTG ATC TTA CAC GGT
 L Y L K G H T G T A G K Q S S L I L H G>
 1580 1590 1600 1610 1620 1630
 GCT GAT TTC AGC ACT AAA GAT GCT GAT AAT GAC AAC TGT ATG TGC AAA TGT GCC CTC ATG
 A D F S T K D A D N D N C H C K C A L M>
 1640 1650 1660 1670 1680 1690
 TTA ACA GGA GGA TGG TGG TTT GAT GCT TGT GGC CCC TCC AAT CTA AAT GGA ATG TTC TAT
 L T G G W W F D A C G P S N L N G H F Y>
 1700 1710 1720 1730 1740 1750
 ACT GCG GGA CAA AAC CAT GGA AAA CTG AAT GGG ATA AAG TGG CAC TAC TTC AAA GGG CCC
 T A G Q N H G K L N G I X W N Y F K G P>
 1760 1770 1780 1790 1800 1810
 AGT TAC TCC TTA CGT TCC ACA ACT ATG ATG ATT CGA CCT TTA GAT TTT TGA AAG CGCAATGT
 S Y S L R S T T M M I R P L D F >
 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
 CAGAACGATTATGAAAGCAAGAAATCCGGAGAGCTGCCAGGTGAGAACTGTTTGAAGAACTTCAGAACCAACA
 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970
 ATATTGCTCTCCAGCAATAAGTGGTAGTTATGTGAAGTACCAAGGTTCTTGACCGTGAATCTGGAGCCGTTTGAG
 1980 1990 2000 2010 2020 2030 2040 2050
 TTCACAGAGTCTCTACTTGGGGTGACAGTGTCTACGTGGCTCGACTATAGAAAACTCCACTGACTGTGGGCTTTAAAA
 2060 2070 2080 2090 2100 2110 2120 2130
 AGCGAAGAAACTGCTGAGCTTGTGTGCTTCAAACTACTACTGGACCTTATTTTGGAACTATGGTAGCCAGATGATAAAT
 2140
 ATGGTTAATTTC

Figur 5

10 20 30 40 50 60 70 80
 CAGCTGACTCAGGCAGGCTCCA/TGCTGAACGGTCACACAGAGAGGAACAAATAATCTCAGCTACTATGCAATAATATC
 90 100 110 120 130 140 150 160
 TCAAGTTTAAAGGAAGAAAACATCATTTGCAGTGAATTAATAATTTTAATTTTGAACAAAGCTAAGCAATGGCTAG
 170 180 190 200 210 220 230 240
 TTTTCTATGATCTCTCTCAAAAGCTTTCTTTGAGGGGGAAAGAGTCAAACAAACAGCAGTTTAACTGAATAAAGAA
 250 260 270 280 290 300 310
 CTAGTTTATAGAGTCAAGAAAGAGCAAGTTTTCGGAGAGGCAAGCAAGAGTGTCTGGCAGTACA ATG ACA
 H T>
 320 330 340 350 360 370
 GTT TTC CTT TCC TTT GCT TTC CTC GCT GCC ATT CTG ACT CAC ATA GGG TGC AGC AAT CAG
 V F L S F A F L A A I L T H I G C S H Q>
 380 390 400 410 420 430
 CGC CGA AGT CCA GAA AAC AGT GCG AGA AGA TAT AAC GCG ATT CAA CAT GCG CAA TGT GCC
 R R S P E N S G R R Y N R I Q H G Q C A>
 440 450 460 470 480 490
 TAC ACT TTC ATT CTT CCA GAA CAC GAT GGC AAC TGT CGT GAG AGT ACG ACA GAC CAG TAC
 Y T F I L P E H D G N C R E S T T D Q Y>
 500 510 520 530 540 550
 AAC ACA AAC GCT CTG CAG AGA GAT GCT CCA CAC GTG GAA GCG GAT TTC TCT TCC CAG AAA
 H T N A L Q R D A P H V E P D F S S Q K>
 560 570 580 590 600 610
 CTT CAA CAT CTG GAA CAT GTG ATG GAA AAT TAT ACT CAG TGG CTG CAA AAA CTT GAG AAT
 L Q H L E H V H E H Y T Q W L Q K L E N>
 620 630 640 650 660 670
 TAC ATT GTG GAA AAC ATG AAG TCG GAG ATG GCC CAG ATA CAG CAG AAT GCA GTT CAG AAC
 Y I V E N H K S E H A Q I Q Q N A V Q N>
 680 690 700 710 720 730
 CAC ACC GCT ACC ATG CTG GAG ATA GCA ACC ACC CTC CTC TCT CAG ACT GCA GAG CAG ACC
 H T A T H L E I G T S L L S Q T A E Q T>
 740 750 760 770 780 790
 AGA AAG CTG ACA GAT GTT GAG ACC CAG GTA CTA AAT CAA ACT TCT GCA CTT GAG ATA CAG
 R K L T D V E T Q V L N Q T S R L E I Q>
 800 810 820 830 840 850
 CTG CTG GAG AAT TCA TTA TCC ACC TAC AAG CTA GAG AAG CAA CTT CTT CAA CAG ACA AAT
 L L E N S L S T Y K L E K Q L L Q Q T N>
 860 870 880 890 900 910
 GAA ATC TTG AAG ATC CAT GAA AAA AAC AGT TTA TTA GAA CAT AAA ATC TTA GAA ATG GAA
 E I L K I H E K N S L L E H K I L E N E>
 920 930 940 950 960 970
 GCA AAA CAC AAG GAA GAG TTG GAC ACC TTA AAG GAA GAG AAA GAG AAC CTT CAA GCG TTG
 G K H K E E L D T L K E E K E N L Q G L>
 980 990 1000 1010 1020 1030
 GTT ACT CGT CAA ACA TAT ATA ATC CAG GAG CTG GAA AAG CAA TTA AAC AGA GCT ACC ACC
 V T R Q T Y I L Q E L E K Q L H R A T T>
 1040 1050 1060 1070 1080 1090
 AAC AAC AGT GTC CTT CAG AAG CAG CAA CTG GAG CTG ATG GAC ACA GTC CAC AAC CTT GTC
 H H S V L Q K Q Q L E L H D T V H H L V>

Figur 5 (forts.)

1100 1110 1120 1130 1140 1150
 AAT CTT TGC ACT AAA GAA GTT TTA CTA AAG GGA GGA AAA AGA GAG GAA GAG AAA CCA TTT
 N L C T K E V L L K G G K R E E E K P F>
 1160 1170 1180 1190 1200 1210
 AGA GAC TGT GCA GAT GTA TAT CAA GCT GGT TTT AAT AAA AGT GGA ATC TAC ACT ATT TAT
 R D C A D V Y Q A G F N K S G I Y T I Y>
 1220 1230 1240 1250 1260 1270
 ATT AAT AAT ATG CCA GAA CCC AAA AAG GTG TTT TGC AAT ATG GAT GTC AAT GGG GGA GGT
 I N N H P E P K K V F C N H D V N G G G>
 1280 1290 1300 1310 1320 1330
 TGG ACT GTA ATA CAA CAT CGT GAA GAT GGA AGT CTA GAT TTC CAA AGA GGC TGG AAG GAA
 W T V I Q H R E D G S L D F Q R G W K E>
 1340 1350 1360 1370 1380 1390
 TAT AAA ATG GGT TTT GGA AAT CCC TCC GGT GAA TAT TGG CTG GGG AAT GAG TTT ATT TTT
 Y K H G F G N P S G E Y W L G N E F I F>
 1400 1410 1420 1430 1440 1450
 GCC ATT ACC AGT CAG AGG CAG TAC ATG CTA AGA ATT GAG TTA ATG GAC TGG GAA GGG AAC
 A I T S Q R Q Y H L R I E L H D W E G N>
 1460 1470 1480 1490 1500 1510
 CGA GGC TAT TCA CAG TAT CAC ACA TTC CAC ATA GGA AAT GAA AAG CAA AAC TAT AAG TTC
 R A Y S Q Y D R F H I G N E K Q N Y R L>
 1520 1530 1540 1550 1560 1570
 TAT TTA AAA GGT CAC ACT GGG ACA GCA GGA AAA CAG AGC AGC CTG ATC TTA CAC GGT GCT
 Y L K G H T G T A G K Q S S L I L H G A>
 1580 1590 1600 1610 1620 1630
 GAT TTC ACC ACT AAA GAT GCT GAT AAT GAC AAC TGT ATG TGC AAA TGT GCC CTC ATG TTA
 D F S T K D A D N D N C N C K C A L H L>
 1640 1650 1660 1670 1680 1690
 ACA GGA GGA TGG TGG TTT GAT GCT TGT GGC CCC TCC AAT CTA AAT GGA ATG TTC TAT ACT
 T G G W W F D A C G P S N L N G H F Y T>
 1700 1710 1720 1730 1740 1750
 GCG GGA CAA AAC CAT GGA AAA CTG AAT GGG ATA AAG TGG CAC TAC TTC AAA GGG CCC AGT
 A G Q N H G K L N G I K W H Y F K G P S>
 1760 1770 1780 1790 1800 1810
 TAC TCC TTA CGT TCC ACA ACT ATG ATG ATT CGA CCT TTA GAT TTT TGA AAGCGAATGTCAGAA
 Y S L R S T T H H I R P L D F >
 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
 CGGATTATGAAGCAACAAGAAATCCGAGAGCTGCCAGGTGAGAAGCTGTTTGAAACTTCAGAAAGCAAAATATT
 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970
 GTCTCCCTCCAGCAATAAGTGGTAGTTATGTGAAGTCACCAAGCTTCTTGACCGTGAATCTGGAGCCGTTTCAGTTCAC
 1980 1990 2000 2010 2020 2030 2040 2050
 AAGAGTCTCTACTTGGGGTGACAGTCTCTACGTGGCTGACTATAGAAACTCCACTGACTGTGGGCTTTAAAAACCGA
 2060 2070 2080 2090 2100 2110 2120 2130
 AGAAACTGCTGAGCTTGTGTCTTCAAACTACTGTGACCTTATTTTGGAACTATGTTAGCCAGATGATAAATATGGT
 2140
 TAAATTC

8/14
Figur 6

```

10      20      30      40      50      60      70      80
GAATTCCTGGGTGGTGTATTATCTCTCCAGCCTTGAGGGAGGGAAACAACACTGTAGGATCTGGGGAGAGAGGAACAAA

90      100     110     120     130     140     150     160
GGACCCGTGAAAGCTGCTCTGTAAAAGCTGACACAGCCCTCCCAAGTGAGCAGGACTGTTCCTCCCACTGCAATCTGACAG

170     180     190     200     210     220     230     240
TTTACTGCATGCCTGGAGAGAACACAGCAGTAAAAACCAGGTTTGCTACTGGAAAAAGAGGAAAGAGAAGACTTTTCATTG

250     260     270     280     290     300     310     320
ACGGACCCAGCCATGGCAGCGTAGCAGCCCTGCGTTTCAGACGGCAGCAGCTCGGACTCTGGACGTGTGTTTGCCCTCA

330     340     350     360     370     380
AGTTTGCCTAAGCTGCTGTTTATTACTGAAGAAGA ATG TGG CAG ATT GTT TTC TTT ACT CTG AGC TGT
          M   W   Q   I   V   F   F   T   L   S   C>

390     400     410     420     430     440
GAT CTT GTC TTG GCC GCA GCC TAT AAC AAC TTT CGG AAG AGC ATG GAC AGC ATA GGA AAG
D   L   V   L   A   A   A   Y   N   N   F   R   K   S   H   D   S   I   G   K>

450     460     470     480     490     500
AAG CAA TAT CAG GTC CAG CAT GGG TCC TGC AGC TAC ACT TTC CTC CTG CCA GAG ATG GAC
K   Q   Y   Q   V   Q   H   G   S   C   S   Y   T   F   L   L   P   E   M   D>

510     520     530     540     550     560
AAC TGC CGC TCT TCC TCC AGC CCC TAC GTG TCC AAT GCT GTG CAG AGG GAC CGC CGC CTC
N   C   R   S   S   S   S   P   Y   V   S   N   A   V   Q   R   D   A   P   L>

570     580     590     600     610     620
GAA TAC GAT GAC TCG GTG CAG AGG CTG CAA GTG CTG GAG AAC ATC ATG GAA AAC AAC ACT
E   Y   D   D   S   V   Q   R   L   Q   V   L   E   N   I   H   E   N   N   T>

630     640     650     660     670     680
CAG TGC CTA ATG AAG CTT GAG AAT TAT ATC CAG GAC AAC ATG AAG AAA GAA ATG GTA GAG
Q   W   L   H   K   L   E   N   Y   I   Q   D   N   H   K   K   E   H   V   E>

690     700     710     720     730     740
ATA CAG CAG AAT GCA GTA CAG AAC CAG ACG GCT GTG ATG ATA GAA ATA GGG ACA AAC CTG
I   Q   Q   N   A   V   Q   N   Q   T   A   V   H   I   E   I   G   T   N   L>

750     760     770     780     790     800
TTG AAC CAA ACA GCT GAG CAA ACG CGG AAG TTA ACT GAT GTG GAA GCC CAA GTA TTA AAT
L   N   Q   T   A   E   Q   T   R   K   L   T   D   V   E   A   Q   V   L   N>

810     820     830     840     850     860
CAG ACC ACG AGA CTT GAA CTT CAG CTC TTG GAA CAC TCC CTC TCG ACA AAC AAA TTG GAA
Q   T   T   R   L   E   L   Q   L   L   E   H   S   L   S   T   N   K   L   E>

870     880     890     900     910     920
AAA CAG ATT TTG GAC CAG ACC AGT GAA ATA AAC AAA TTG CAA GAT AAG AAC AGT TTC CTA
K   Q   I   L   D   Q   T   S   E   I   N   K   L   Q   D   K   N   S   F   L>

930     940     950     960     970     980
GAA AAG AAG GTG CTA GCT ATG GAA GAC AAG CAC ATC ATC CAA CTA CAG TCA ATA AAA GAA
E   K   K   V   L   A   H   E   D   K   H   I   I   Q   L   Q   S   I   K   E>

990     1000    1010    1020    1030    1040
GAG AAA GAT CAG CTA CAG GTG TTA GTA TCC AAG CAA AAT TCC ATC ATT GAA GAA CTA GAA
E   K   D   Q   L   Q   V   L   V   S   K   Q   N   S   I   I   E   E   L   E>

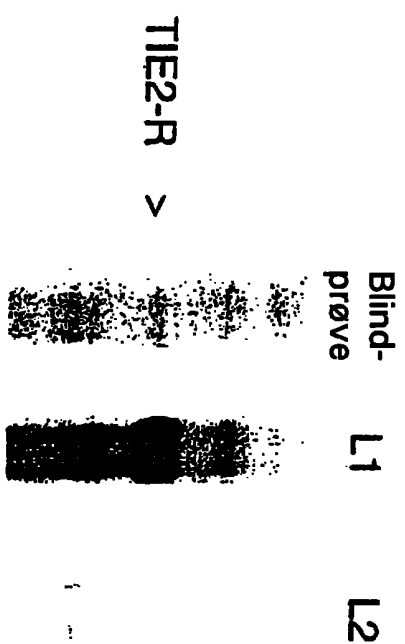
1050    1060    1070    1080    1090    1100
AAA AAA ATA GTG ACT GCC ACG GTG AAT AAT TCA GTT CTT CAA AAG CAG CAA CAT GAT CTC
K   K   I   V   T   A   T   V   N   N   S   V   L   Q   K   Q   Q   H   D   L>

```

Figur 6 (forts.)

1110 1120 1130 1140 1150 1160
 ATG GAG ACA GTT AAT AAC TTA CTG ACT ATG ATG TCC ACA TCA AAC TCA GCT AAG GAC CCC
 M E T V N N L L T M H S T S N S A K D P>
 1170 1180 1190 1200 1210 1220
 ACT GTT GCT AAA GAA GAA CAA ATC AGC TTC ACA CAC TGT GCT GAA GTA TTC AAA TCA GGA
 T V A K E E Q I S F R D C A E V F K S G>
 1230 1240 1250 1260 1270 1280
 CAC ACC ACA AAT GGC ATC TAC ACG TTA ACA TTC CCT AAT TCT ACA GAA GAG ATC AAG GCC
 H T T N G I Y T L T F P N S T E E I K A>
 1290 1300 1310 1320 1330 1340
 TAC TGT GAC ATG GAA GCT GGA GGA GGC GGG TGG ACA ATT ATT CAG CGA CGT GAG GAT GGC
 Y C D H E A G G G G W T I I Q R R E D G>
 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 AGC GTT GAT TTT CAG AGG ACT TGG AAA GAA TAT AAA GTG GGA TTT GGT AAC CCT TCA GGA
 S V D F Q R T W K E Y K V G F G N P S G>
 1410 1420 1430 1440 1450 1460
 GAA TAT TGG CTG GGA AAT GAG TTT GTT TCG CAA CTG ACT AAT CAG CAA CGC TAT GTG CTT
 E Y W L G N E F V S Q L T N Q Q R Y V L>
 1470 1480 1490 1500 1510 1520
 AAA ATA CAC CTT AAA GAC TGG GAA GGG AAT GAG GCT TAC TCA TTG TAT GAA CAT TTC TAT
 K I H L K D W E G N E A Y S L Y E H F Y>
 1530 1540 1550 1560 1570 1580
 CTC TCA AGT GAA GAA CTC AAT TAT AGG ATT CAC CTT AAA GGA CTT ACA GGG ACA GCC GGC
 L S S E E L N Y R I H L K G L T G T A G>
 1590 1600 1610 1620 1630 1640
 AAA ATA AGC AGC ATC AGC CAA CCA GGA AAT GAT TTT AGC ACA AAG GAT GGA GAC AAC GAC
 K I S S I S Q P G N D F S T K D G D N D>
 1650 1660 1670 1680 1690 1700
 AAA TGT ATT TGC AAA TGT TCA CAA ATG CTA ACA GGA GGC TGG TGG TTT GAT GCA TGT GGT
 K C I C K C S Q M L T G G W W F D A C G>
 1710 1720 1730 1740 1750 1760
 CCT TCC AAC TTG AAC GGA ATG TAC TAT CCA CAG AGG CAG AAC ACA AAT AAG TTC AAC GGC
 P S N L N G H Y Y P Q R Q N T N K F N G>
 1770 1780 1790 1800 1810 1820
 ATT AAA TGG TAC TAC TGG AAA GGC TCA GGC TAT TCG CTC AAG GCC ACA ACC ATG ATG ATC
 I K W Y Y W K G S G Y S L K A T T M H I>
 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900
 CGA CCA GCA GAT TTC TAAACATCCAGTCCACTGAGGAAGTGTCTGCAACTATTTTCAAAGACTTAAGCCCAGT
 R P A D F>
 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980
 GCACTGAAAGTCACGGCTGCGCACTGTGTCTCTCCACCACAGAGGGCGGTGTGCTCGGTGCTGACGGGACCCACATGCT
 1990 2000 2010 2020 2030 2040 2050 2060
 CCAGATTAGAGCCTGTAACCTTTATCACTTAACTTGCATCACTTAACGGACCAAGCAAGACCCTAAACATCCATATT
 2070 2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140
 GTGATTAGACAGAACCTTATGCAAGATGAACCCGAGGCTGAGAAATCAGACTGACAGTTTACAGACGCTGCTGTACAA
 2150 2160 2170 2180 2190 2200 2210 2220
 CCAAGAAATGTTATGTGCAAGTTTATCAGTAAATAACTGGAACAGAACACTTATGTTATACATACAGATCATCTTGGGA
 2230 2240 2250 2260 2270 2280
 ACTGCAATCTCTGAGCACTGTTTATACACTGTGTAATACCCATATGTCTGAATTC

Figur 7



Figur 8

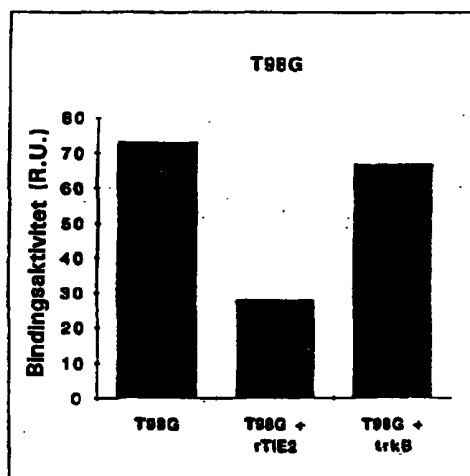
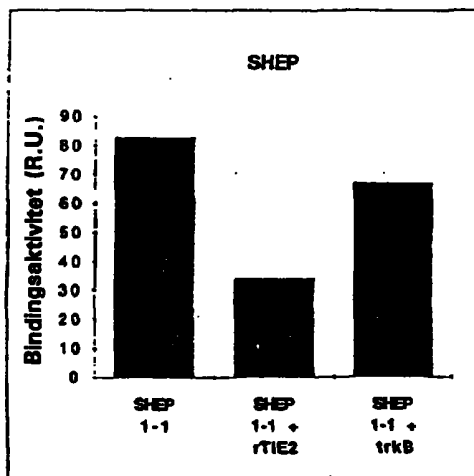
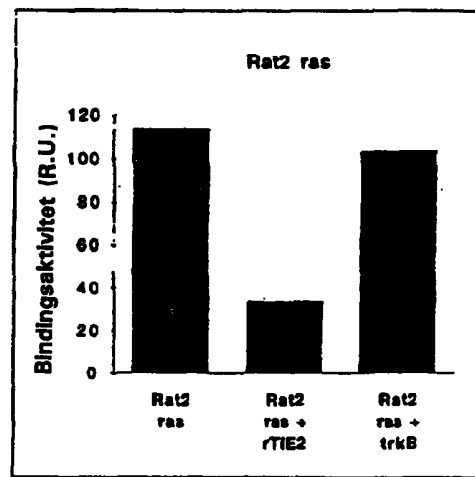
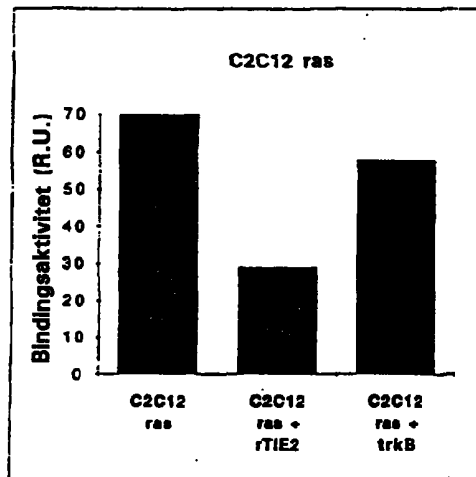
20x Blindprøve 20x L 2
+
0.1 x L 1 0.1 x L 1

TIE2-R >



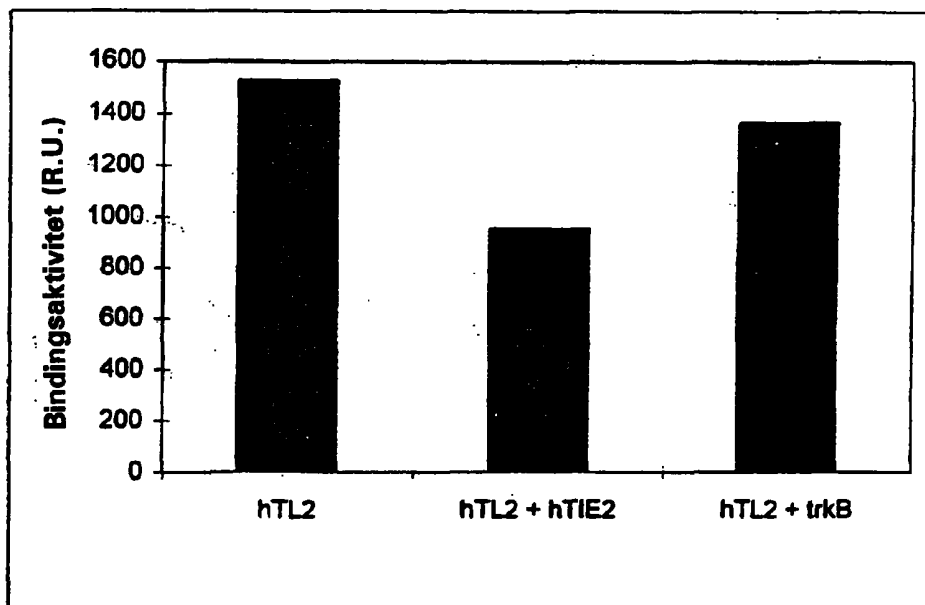
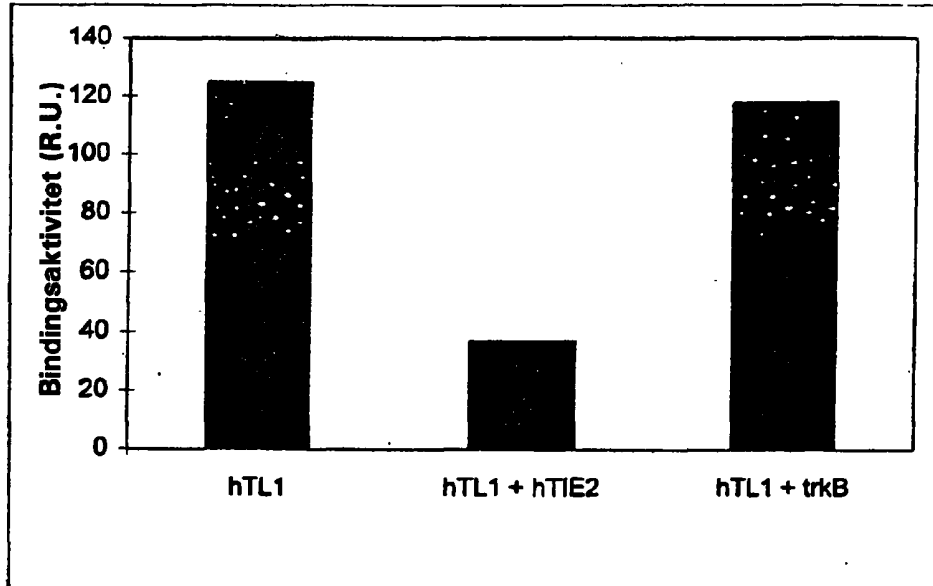
12/14

Figur 9



Figur 10

13/14



Figur 11

