[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 95196465.8

[51] Int. Cl[7]
C12N 15/12
C07K 14/47
C07K 16/28
C12N 15/62
A61K 47/48
A61K 38/17
C12N 5/06

[45] 授权公告日 2005 年 12 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 1230536C

[22] 申请日 1995.10.6 [21] 申请号 95196465.8

[30] 优先权

[32] 1994.10. 7 [33] US [31] 08/319,932

[32] 1994.10.27 [33] US [31] 08/330,261

[32] 1994.12. 2 [33] US [31] 08/348,492

[32] 1994.12. 9 [33] US [31] 08/353,503

[32] 1995. 1.17 [33] US [31] 08/373,579

[32] 1995. 4. 6 [33] US [31] 08/418,595

[86] 国际申请 PCT/US1995/012935 1995.10.6

[87] 国际公布 WO1996/011269 英 1996.4.18

[85] 进入国家阶段日期 1997.5.27

[71] 专利权人 里珍纳龙药品有限公司

地址 美国纽约州塔里敦

[72] 发明人 S·戴维斯 J·布伦诺

M·高德法布 T·H·奥尔德里奇

P·C·梅森皮埃尔

C·雷兹耶瓦斯基 P·F·琼斯

G·D·杨科普罗斯

审查员 丁慧萍

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华 温宏艳

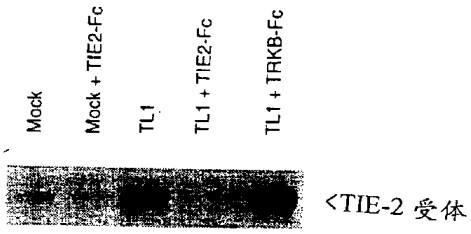
A61P 17/02 A61P 9/00 A61P 9/10 A61P 35/00

权利要求书 3 页 说明书 32 页 附图 14 页

[54] 发明名称 TIE－2 配体,制备方法及其应用

[57] 摘要

本发明提供了一种分离的编码人 TIE－2 配体的核酸分子。另外，本发明提供了一种特异性地结合人 TIE－2 配体的受体。本发明还提供了特异性地结合人 TIE－2 配体的抗体。本发明进一步提供了人 TIE－2 的拮抗剂。本发明还提供了治疗组合物以及阻止血管生长的方法，促进新血管形成的方法，促进表达 TIE－2 受体的细胞生长或分化的方法，阻止表达 TIE－2 受体的细胞生长或分化的方法及减弱或防止人肿瘤生长的方法。




ISSN1008-4274

1. 一种分离的编码 TIE-2 配体的核酸分子，其中核酸序列是：

（a）包含图 4 或图 5 所示人 TIE-2 配体编码区的核酸序列，所述序列编码结合 TIE－2 受体的配体；或

（b）（a）的核酸序列的简并核酸序列，且该序列编码结合 TIE-2 受体的 TIE-2 配体。

2. 根据权利要求 1 的核酸分子，其中所编码的 TIE-2 配体是 TIE-2 激动剂。

3. 一种分离的编码 TIE-2 配体的核酸分子，其中核酸序列是：

（a）包含图 6 所示的人 TIE-2 配体编码区的核酸序列，所述序列编码结合 TIE-2 受体的配体；或

（b）（a）的核酸序列的简并核酸序列，并且该序列编码结合 TIE-2 受体的 TIE-2 配体。

4. 根据权利要求 3 的核酸分子，其中所编码的 TIE-2 配体是 TIE-2 拮抗剂。

5. 一种核酸分子，它是权利要求 1 或 3 的序列的简并序列且编码结合 TIE-2 受体的配体。

6. 一种载体，该载体包含前面任一权利要求的核酸分子。

7. 根据权利要求 6 的载体，其中核酸分子可操作地连接到能指导其在宿主细胞中表达的表达控制序列上。

8. 根据权利要求 6 或 7 的载体，它是一种质粒。

9. 根据权利要求 8 的质粒，该质粒命名为如图 2 所示的、编码 TIE-2 配体的 pJFE14。

10. 一种分离的 TIE-2 配体，该 TIE-2 配体具有图 4、5 或 6 所示的氨基酸序列。

11. 一种分离的 TIE-2 配体，该 TIE-2 配体由根据权利要求 1 或 2 的核酸分子编码。

12. 一种分离的 TIE-2 配体，该 TIE-2 配体由根据权利要求 3 或 4 的核酸编码。

13. 一种用于生产根据权利要求 10 至 12 中任意一项的配体的宿主-载体系统，它包含宿主细胞中的根据权利要求 6 至 9 中任意一项的载体。

14. 根据权利要求 13 的宿主-载体系统，其中宿主细胞是细菌、酵

母、昆虫或哺乳动物细胞。

15. 一种宿主-载体系统，它包含权利要求 13 或 14 的宿主-载体系统和编码 TIE-2 受体的核酸。

16. 一种生产权利要求 10 至 12 中任意一项所限定的配体的方法，该方法包括在允许配体生产的条件下培养根据权利要求 13 至 15 中任意一项的宿主－载体系统的细胞并回收所产生的配体。

17. 一种配体融合体，它包含融合于免疫球蛋白恒定区的如权利要求 10-12 中任一项所限定的 TIE-2 配体。

18. 权利要求 17 的配体融合体，其中 TIE-2 配体具有图 4、5 或 6 所示的氨基酸序列，免疫球蛋白恒定区是人 IgG1 的 Fc 部分。

19. 一种偶联物，它包含根据权利要求 10 至 12 中任意一项的配体和偶联于其上的细胞毒剂。

20. 根据权利要求 19 的偶联物，其中的细胞毒剂是放射性同位素或毒素。

21. 一种药用组合物，它包含根据权利要求 10 至 12 中任意一项的 TIE-2 配体和药用上可接受的载体。

22. 一种药用组合物，它包含根据权利要求 17 或 18 的配体融合体和药用上可接受的载体。

23. 一种药用组合物，它包含根据权利要求 19 或 20 的偶联物和药用上可接受的载体。

24. 根据权利要求 11 的配体在制备用于促进哺乳动物新血管形成的方法的药物中的应用。

25. 根据权利要求 24 的应用，所述应用为在制备用于促进伤口愈合的方法的药物中的应用。

26. 根据权利要求 24 的应用，所述应用为在制备用于治疗局部缺血的方法的药物中的应用。

27. 根据权利要求 12 的配体在制备用于抑制哺乳动物 TIE-2 配体活性的方法的药物中的应用。

28. 根据权利要求 27 的应用，其中哺乳动物是人类。

29. 根据权利要求 28 的应用，所述应用为在制备用于减缓或防止

人肿瘤生长的方法的药物中的应用。

30. 一种维持培养物中表达 TIE-2 受体的细胞的方法，该方法包括给表达 TIE-2 受体的细胞施用有效量的权利要求 11 的配体。

31. 根据权利要求 30 的方法，其中表达 TIE-2 受体的细胞是内皮细胞。

32. 一种鉴定 TIE-2 受体拮抗剂的方法，该方法包括将表达 TIE-2 受体的细胞与下列物质：

（a）一种试验化合物；和

（b）根据权利要求 11 或 12 的配体；

在允许配体与受体结合的条件下接触并测定该试验化合物是否能干扰该配体与受体的结合。

33. 一种受体融合体，包括与人免疫球蛋白恒定区融合的 TIE 受体细胞外部分，该受体融合体它特异性地结合权利要求 10 至 12 中任意一项的 TIE-2 配体。

34. 一种分离的核酸分子，它编码根据权利要求 33 的受体融合体。

35. 一种载体，它包含根据权利要求 34 的核酸分子。

36. 根据权利要求 35 的载体，它是一种质粒。

37. 一种药物组合物，它包含根据权利要求 33 的受体融合体和药用上可接受的载体。

# TIE-2 配体，制备方法及其应用

## 前 言

本发明总的说来涉及遗传工程领域，更具体地说，涉及受体酪氨酸激酶及其相关配体的基因，其插入重组 DNA 载体和编码的蛋白质在微生物的受体株和受体真核细胞中的生产。

## 发明背景

负责分化的细胞和组织的发育、维持和修复的细胞行为大部分受经生长因子和相似配体及其受体传递的细胞间信号调控。受体位于应答细胞的细胞表面且它们结合称为生长因子的肽或多肽以及其它激素样配体。这种相互作用的结果是在应答细胞中的快速生化变化以及细胞基因表达的快速和长期重调。与不同细胞表面相关的一些受体可结合特定的生长因子。

酪氨酸激酶对蛋白质上酪氨酸的磷酸化是一个主要的模式，其中信号通过质膜转导。一些熟知的蛋白质酪氨酸激酶基因编码多肽生长因子和激素的跨膜受体，如上皮生长因子（EGF），胰岛素，胰岛素样生长因子－1（IGF-1），来源于血小板的生长因子（PDGF-A 和-B）和成纤维细胞生长因子（FGFs）。（Heldin et al., Cell Regulation ,1:555-566（1990）；Ullrich et al., Cell, 61:243-54(1990)）。在每种情况下，这些生长因子经过与其相关受体的细胞外部分结合发挥其作用，这导致存在于受体细胞质部分的固有的酪氨酸激酶的活化。对内皮细胞的生长因子受体的特别感兴趣是由于在一些重要的生理和病理过程。如血管形成，血管发生，动脉粥样硬化和发炎性疾病中可能涉及生长因子（Folkman, et al. Science, 235: 442-447(1987)。另外，一些造血生长因子的受体是酪氨酸激酶；这些包括 c-fms（它是集落刺激因子 I 受体，Sherr, et al., Cell, 41:665-676(1985)）和, c-kit（在 Huang, et al., Cell, 63: 225-33(1990)中报道的原始造血生长因子受体）。

受体酪氨酸激酶根据其胞外结构域的特征性结构被分成进化亚家族（Ullrich, et al., Cell, 61: 243-54(1990)）。这些亚家族包括 EGF 受体样激酶（亚类 1）和胰岛素受体样激酶（亚类 II），各自在其细胞外区域含有重复的同源富含半胱氨酸的序列。在 eph 样激酶的细胞外结构域也发现单个富含半胱氨酸的区域。Hirai, et al., Science, 238: 1717-1720（1987）; Lindberg, et al., 分子细胞生物学，10: 6316－24（1990）;

Lhotak, et al., 分子细胞生物学, 11: 2496-2502(1991)。PDGF 受体以及 c-fms 和 c-kit 受体酪氨酸激酶可分成亚类 III; 而 FGF 受体形成亚类 IV。这些亚类的成员典型地经链内二硫键稳定细胞外折叠单元。这些所谓的免疫球蛋白（Ig）样折叠在含具有细胞结合或可溶性配体的许多种其它细胞表面受体的免疫球蛋白超家族的蛋白中发现。Williams, et al., 免疫学年评, 6:381-405 (1988)。

受体酪氨酸激酶在其特异性和亲和力方面有区别。一般来说，受体酪氨酸激酶是糖蛋白，它由下列结构组成:（1）能结合特异性生长因子的细胞外结构域;（2）通常是蛋白质α－螺旋部分的跨膜结构域;（3）近膜结构域，受体可能在此受诸如蛋白质磷酸化调节;（4）酪氨酸激酶区，它是受体的酶成份;（5）羧基末端尾巴，在许多受体中它涉及酪氨酸激酶底物的识别和结合。

诸如另外的外显子剪接和基因启动子或多聚腺苷酸化位点的其它选择的过程据报道能从相同基因产生一些明显不同的多肽。这些多肽可含有或不含上面列出的各个结构域。因此，一些细胞外结构域可作为单独的，分泌蛋白表达，该受体的一些形式可缺乏酪氨酸激酶结构域和仅含有经跨膜区插入质膜的细胞外结构域加上短羧基末端尾巴。

以前经 RT-PCR 作为未知酪氨酸激酶同源 cDNA 片段从人白血病细胞鉴定的编码内皮细胞跨膜酪氨酸激酶的基因由 Partanen et al.,美国国家科学院院刊, 87: 8913-8917（1990）描述。该基因和其编码的蛋白质称为“tie”它是“具有 Ig 和 EGF 同源结构域的酪氨酸激酶”的缩写, Partanen et al.,分子细胞生物学, 12: 1698-1707（1992）。

已报道 tie mRNA 存在于所有人类胎儿和小鼠胚胎组织中。经检查，tie 信使已定位于心血管内皮细胞。tie mRNA 定位于 9.5 至 18.5 日龄小鼠胚胎的血管和心内内皮中。与发育的卵泡和皮肤伤口肉芽组织相关的新血管形成期间显示出 tie 表达增强。Korhonen, et al., Blood 80: 2548-2555(1992)。因此认为 tie 在血管形成中发挥作用，它对形成治疗实体肿瘤和一些其它血管形成依赖性疾病如糖尿病性视网膜病，牛皮癣，动脉粥样硬化和关节炎较重要。

已报道 2 个结构上相关的大鼠 TIE 受体蛋白质由具有相关表达情况的不同基因编码。一个基因称为 tie-1，它是人 tie 的大鼠同源物，Maisonpierre, et al., Oncogene 8: 1631-1637 (1993)。另一基因 tie-2 可能是鼠 tek 基因的大鼠同源物，它与 tie 一样，已报道专一性地在小鼠内皮细胞和其假定的祖先细胞中表达。Dumont et al. Oncogene 8: 1293-1301（1993）。

发现两个基因都在胚胎和出生后的组织内皮细胞中广泛表达。tie-2 转录物的明显水平也存在于其它胚胎细胞群体中，包括晶状体上皮，心外膜和间质区。Maisonpierre et al., Oncogene 8: 1631-1637（1993）。

TIE 受体在血管内皮中的优势表达表明 TIE 在血管系统的发育和维持中起作用。这可能包括在内皮细胞决定，增生，分化和细胞迁移及血管成份定型中的作用。已报道 TIE-2 缺陷型小鼠胚胎的分析显示它在血管形成，特别是在内皮细胞血管网形成中是重要的。Sato, T. N., et al., Nature. 376: 70-74 (1994)。在成熟血管系统中，TIE 在内皮细胞存活，维持及对病原性感染的反应中发挥功能。

## 发明概述

本发明涉及能结合 TIE-2 受体的新配体及制备和使用该 TIE-2 配体的方法。本发明进一步提供了编码 TIE-2 配体的核酸序列以及产生编码 TIE-2 配体的核酸及其基因产物的方法。TIE-2 配体以及编码它们的核酸可能在涉及内皮细胞和有关 TIE 受体的某些疾病，如涉及肿瘤血管形成的赘生性疾病、伤口愈合、血栓栓塞疾病、动脉粥样硬化和发炎疾病的诊断和治疗中有用。更普遍的是，生物学活性 TIE-2 配体可用于促进表达 TIE-2 受体的细胞生长、存活和/或分化。生物学活性 TIE-2 配体可用于在培养物中体外维持表达 TIE-2 受体的细胞。表达 TIE-2 受体的细胞和组织包括例如心和血管内皮细胞、晶状体上皮和心外膜。另外，这种配体可用于支持改造成表达 TIE-2 受体的细胞。而且，TIE-2 配体和其相关受体可用于鉴定 TIE-2 受体的激动剂或拮抗剂的试验系统。

本发明的一个实施方案提供了编码 TIE-2 配体的分离的核酸分子，其中的核酸序列是：

（a）包含图 4 或图 5 所示人 TIE-2 配体编码区域的核酸序列；

（b）（a）的核酸序列的简并核酸序列，且该序列编码结合 TIE-2 受体的 TIE-2 配体的核酸序列。

所述核酸优选编码 TIE-2 激动剂。

本发明的另一个实施方案提供了编码 TIE-2 配体的分离的核酸分子，其中的核酸序列是：

（a）包含图 6 所示的人 TIE-2 配体编码区的核酸序列；

（b）（a）的核酸序列的简并核酸序列，且该序列编码结合 TIE-2 受体的 TIE-2 配体的核酸序列。

所述核酸优选编码 TIE-2 拮抗剂。

分离的核酸可以是 DNA、cDNA 或 RNA。本发明还提供了包含编

码 TIE-2 配体的分离的核酸分子的载体。本发明进一步提供了在合适的宿主细胞中生产具有 TIE-2 配体生物学活性的多肽的宿主－载体系统。合适的宿主细胞可以是细菌、酵母、昆虫或哺乳动物细胞。本发明还提供了生产具有 TIE-2 配体生物学活性的多肽的方法，该方法包括在允许该多肽生产的条件下培养宿主－载体系统的细胞并回收所产生的多肽。

本文描述的本发明的编码 TIE-2 配体的分离的核酸分子进一步用于形成配体、其片段或衍生物、或称为受体激动剂或拮抗剂的另一分子，作为用于治疗患有涉及表达 TIE 受体的细胞、组织或器官的紊乱的病人的治疗剂。

本发明还提供了由本发明的核酸编码的分离的 TIE-2 配体，它基本上不含其它蛋白质。

另外，本发明提供了一种分离的 TIE-2 配体，它具有图 4、5 或 6 所示的氨基酸序列。

本发明还提供了上述配体用于人体或动物体的治疗方法或诊断方法。

本发明进一步提供了包含在药用上可接受的载体中的 TIE-2 配体的治疗组合物。这些组合物可用于例如促进新血管形成。在具体的实施方案中，这些组合物可用于促进伤口愈合或治疗局部缺血。

另外，本发明提供了 TIE-2 配体可偶联到细胞毒剂上并由此制备治疗组合物。本发明进一步提供了特异性地结合 TIE-2 配体的受体融合体。本发明进一步提供了包含在药用上可接受的载体中的特异性地结合 TIE-2 配体的受体融合体的治疗组合物。这些组合物可用于阻断

血管生长。

本发明还提供了一种 TIE-2 拮抗剂在制备用于在哺乳动物中抑制 TIE-2 配体活性的方法的药物中的应用，所述 TIE-2 拮抗剂是 TIE-2 配体或能结合 TIE-2 配体的抗体。

## 附图简述

图 1A 和 1B-TIE-2 受体（TIE-2 RB）抑制鸡胚胎绒毛膜尿囊膜（CAM）中的血管形成。用 6μg RB 浸泡的单片可消溶的明胶泡（Gelfoam）立即插入 1 日龄鸡胚 CAM 中。再培养 3 天后，取出 4 日龄胚及周围的 CAM 并检查。图 1A: 用 EHK-1RB（rEHK-1 ecto/h IgG1 Fc）处理的胚存活并在其周围 CAM 中具有正常形成的血管。图 1B: 全部用 TIE-2 RB（rTIE-2 ecto/h IgG1 Fc )处理的胚死亡，大小减小并几乎完全缺乏周围血管。

图 2 — 载体 pJFE14。

图 3 — λgt10 的限制性图谱。

图 4 — 编码 htie－2 配体 1 的克隆λgt10 的人 TIE-2 配体的核酸和推断的氨基酸（单字母代码）序列。

图 5 — 来自 T98G 克隆的人 TIE-2 配体的核酸和推断的氨基酸（单字母代码）序列。

图 6 — 编码人 TIE2 配体 2 的来自克隆 pBluescript KS 的人 TIE-2 配体的核酸和推断的氨基酸（单字母代码）序列。

图 7 — Western 印迹显示 TIE-2 受体被 TIE-2 配体 1（泳道 L1） 而不是 TIE-2 配体 2（泳道 L2）或对照（Mock）激活。

图 8 — Western 印迹显示与预先用 MOCK 培养基处理 HAEC 细胞（泳道 1）相比，预先用过量 TIE-2 配体 2 处理 HAEC 细胞（泳道 2）拮抗随后稀释的 TIE-2 配体 1 激活 TIE-2 受体（TIE2-R）的能力。

图 9 — 柱形图代表在 C2C12 ras， Rat2 ras, SHEP 和 T98G 浓缩（10x）条件培养基中 TIE2 配体与大鼠 TIE2 IgG 固定的表面的结合。经过与在可溶性 trKB RB 存在的条件下的较小减少相比，在 25μg/ml 可溶性大鼠 TIE2 RB 存在下结合活性的明显减小证实大鼠 TIE2（rTIE2）的特异性结合。

图 10 — 重组人 TIE-2 配体 1（hTL1）和人 TIE-2 配体 2（hTL2）在 cos 细胞上清中与固定于表面的人 TIE-2 RB 的结合。经过用 25μg/ml 可溶性的人 TIE2 RB 或 trKB RB 培养样品来测定人 TIE-2 特异性结合；仅在用人 TIE2 RB 培养的样品中观察到结合活性的明显减少。

图 11 — Western 印迹显示 TIE-2 受体融合体（表示 TIE-2 RB 或这里是 TIE2-Fc ）以 HUVEC 细胞中的 TIE-2 配体 1 （ $TL_1$ ）抑制 TIE-2 受体的激活，而无关受体融合体（ TRKB - Fc ）不抑制该活化。

## 发明详述

正如下文以更详细的方式所描述的，申请人经表达克隆分离了一种结合 TIE-2 受体的新配体。本发明包含一种 TIE-2 配体以及其氨基酸序列，还有序列内氨基酸残基被残基取代导致沉默变化的功能相当的分子。例如，序列内的一个或多个氨基酸残基被发挥相当功能的极性相似的另一氨基酸取代导致沉默变化。序列内的氨基酸取代物可选自该氨基酸所属类型的其它成员。例如，非极性（疏水）氨基酸类型包括丙氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，缬氨酸，脯氨酸，苯丙氨酸，色氨酸和甲硫氨酸。极性中性氨基酸包括甘氨酸，丝氨酸，苏氨酸，半胱氨酸，酪氨酸，天冬酰胺和谷氨酰胺。带正电荷（碱性）氨基酸包括精氨酸，赖氨酸和组氨酸。带负电荷（酸性）氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。还包括在本发明范围内的有表现出相同或相似生物学活性的蛋白质或其片段或衍生物及在翻译期间或之后进行不同修饰的衍生物，例如，经糖基化，蛋白水解裂解，连接到抗体分子或其它细胞配体上，等等。

本发明还包括编码本文描述为 TIE-2 配体 1 的蛋白质的核酸序列，以及经过诸如转染，转导，感染，电穿孔或显微注射存在于合适表达载体中的编码本文所述的 TIE-2 配体 1 的核酸遗传改造为产生该蛋白质的细胞。

本发明进一步包含编码本文描述为 TIE-2 配体 2 的蛋白质的核苷酸序列以及经过诸如转染，转导，感染，电穿孔或显微注射存在于合适表达载体中的编码本文所述 TIE-2 配体 2 的核酸遗传改造成产生该蛋白质的细胞。

本领域的技术人员还将认识到本发明包含在诸如 Sambrook, et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ed. Vol. 1. pp. 101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)限定的中等严格条件下与推断的 TIE-2 配体编码序列杂交的 DNA 和 RNA 序列。因此，本发明包含的核酸分子包括具有从本文所述制备的 TIE-2 配体氨基酸序列推导的序列的分子以及具有与该核酸序列杂交的核酸序列的分子，还有上述序列由于遗传密码的简并编码能结合 TIE-2 受体的配体的核酸序列。

使用本领域的技术人员已知的任何将 DNA 片段插入载体的方法可利用合适的转录/翻译控制信号和蛋白质编码序列构建编码 TIE-2 配体的表达载体。这些方法可包括体外重组 DNA 和合成技术及体内重组（基因重组）。编码 TIE-2 配体或其肽片段的核酸序列的表达可用第二种核苷酸序列来调节以便在用重组 DNA 分子转化的宿主中表达该蛋白质或肽。例如，本文描述的 TIE-2 配体的表达可用本领域已知的任何启动子/增强子元件来控制。可用于控制配体表达的启动子包括，但不限于在 Squinto et al, （ Cell 65: 1-20 (1991)）中所述的长末端重复序列； SV40 早期启动子区域（ Bernoist and Chambon, Nature 290: 304-310 ）； CMV 启动子， M-MuLV5′末端重复序列，在 Rous 肉瘤病毒 3′长末端重复中包含的启动子（ Yamamoto, et al., Cell 22: 787-797 （ 1980 ）,疱疹胸苷激酶启动子（ Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:144-1445(1981)），腺病毒启动子，金属硫蛋白基因的调节序列（ Brinster et al., Nature 296: 39-42 （ 1982 ））。原核表达载体，如β－内酰胺酶启动子（ Villa-Kamaroff, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.75: 3727-3731(1978)）,或 tac 启动子，也见“来自重组细菌的有用蛋白质”，科学的美国人， 242: 74-94 （ 1980 ）；来自酵母或其它真菌的启动子成份如 Gal 4 启动子， ADH（乙醇脱氢酶）启动子， PGK（磷酸甘油激酶）启动子，碱性磷酸酶启动子，和下面的表现出组织特异性并用于转基因动物的动物转录控制区：在胰腺泡细胞中有活性的弹性蛋白酶 I 基因控制区（ 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); 在胰腺β 细胞中有活性的胰岛素基因控制区（ Hanahan, Nature 315: 115-122(1985)），在淋巴样细胞中有活性的免疫球蛋白基因控制区（ 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 ），在睾丸，乳腺，淋巴样和肥大细胞中有活性的小鼠乳腺瘤病毒控制区（ Leder et al., 1986,Cell 45: 485-495 ），在肝脏中有活性的白蛋白基因控制区（ Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-276 ）， 在肝脏中有活性的甲胎蛋白基因控制区（ Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5: 1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 235: 53-58 ）；在肝脏中有活性的α 1 －抗胰蛋白酶基因控制区（ Kelsey et al, 1987, Genes and

Devel. 1: 161-171 ），在髓样细胞中有活性的β －球蛋白基因控制区（ Mogram et al., 1985, Nature 315: 338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46: 89-94 ）；在脑少突神经胶质细胞中有活性的髓磷脂碱性蛋白质基因控制区（ Readhead et al., 1987, Cell 48: 703-712 ）；在骨骼肌中有活性的肌球蛋白轻链-2 基因控制区（ Shani, 1985, Nature 314: 283-286 ），在下丘脑中有活性的促性腺释放激素基因控制区（ Mason et al., 1986, Science 234: 1372-1378 ）。本发明进一步包含能与编码 TIE-2 配体的 RNA 序列特异性地杂交以调节其表达的反义化合物的生产。（ Ecker, U. S. 专利号 5166,195, 1992 年 11 月 24 日出版）。因此，根据本发明，将能在细菌或真核宿主中复制的包含编码本文所述的 TIE-2 配体的核酸的表达载体用于转染宿主，从而使该核酸表达以生产 TIE-2 配体，然后以生物学活性形式回收。本文所使用的生物学活性形式包括能与 TIE-2 受体结合并引起诸如分化功能的生物学反应或影响表达受体的细胞表型的形式。例如，这种生物学活性形式可诱导 TIE-2 受体酪氨酸激酶结构域的磷酸化。

含基因插入物的表达载体可用 4 种常规方法鉴定：（ 1 ） DNA － DNA 杂交，（ b ）“标记”基因功能的存在或缺失，（ c ）插入序列的表达和（ d ） PCR 检测。在第一种方法中，插入表达载体中的外源基因的存在可使用包含与插入的 TIE-2 配体编码基因同源的序列的探针经 DNA － DNA 杂交检测。在第二种方法中，重组载体/宿主系统可基于载体中外源基因的插入引起的某些“标记”基因功能（例如，胸苷激酶活性，对抗生素的抗性，转化表型，杆状病毒中包含体形成等）的存在或缺乏来鉴定和选择。例如，如果编码 TIE-2 配体的核酸插入到载体的标记基因序列内，含该插入子的重组体以缺乏标记基因功能来鉴定。在第三种方法中，重组表达载体经过测定重组体表达的外源基因产物来鉴定。这种测定可基于诸如 TIE-2 配体基因产物的物理或功能特征，例如：以配体与用诸如可检测的抗体或其部分示踪的 TIE-2 受体或其部分的结合或以与产生的抗 TIE-2 配体蛋白或其部分的抗体的结合来测定。本发明的细胞可瞬时或优选在组成性永久地表达本文所述的 TIE-2 配体。在第四种方法中，可制备相应于 tie-2 特异性 DNA 序列的 DNA 核苷酸引物。然后，这些引物用于 PCR tie-2 基因片段。（ PCR 方法：方法和应用指南， Michael A. Innis et al. 编辑， Academic Press (1990)）。

可用允许随后形成稳定生物活性蛋白质的任意技术纯化重组配体。例如，并非是作为一种限制，可从细胞中以可溶性蛋白质或作为包含体回收配体，对于包含体可用 8M 盐酸胍并经透析大量提取。为了进一步纯化配体，可使用常规离子交换层析，疏水相互作用层析，反相色谱或凝胶过滤。

在本发明的另外的实施方案中，重组 TIE-2 配体编码基因可用于经同源重组灭活或“敲除”（knock out）内源基因，从而产生 TIE-2 配体缺陷细胞，组织或动物。例如但并非用作限制，重组 TIE-2 配体编码基因可改造成含插入突变，例如，neo 基因，它可灭活本身的 TIE-2 配体编码基因。这种构建体在合适的启动子控制下可经过诸如转染，转导或注射的技术导入细胞。如胚胎干细胞。含该构建体的细胞可用 G418 抗性来选择。然后可经过诸如 Southern 印迹，PCR 检测，Northern 印迹或表达测定鉴定缺乏完整的 TIE-2 配体编码基因的细胞。然后将缺乏完整 TIE-2 配体编码基因的细胞与早期胚细胞融合以产生该配体缺陷型的转基因动物。该动物可用于限定在正常情况下依赖于该配体的特定体内过程。

本文所述的 TIE-2 配体的抗体在配体的检测，例如诊断应用中有用。为了制备针对 TIE-2 配体的单克隆抗体，可使用提供经培养物中的连续细胞系生产抗体分子的任何技术。例如，最早由 Kohler 和 Milstein 建立的杂交瘤技术（1975, Nature, 256: 495－497），以及三体瘤技术，人 B 细胞杂交瘤技术（Kozbor et al., 1983, Immunology, Today 4:72）和生产人单克隆抗体的 EBV 杂交瘤技术（Cole et al., 1985, 见“单克隆抗体和癌症治疗” Alan R. Liss, Inc. pp.77-96）和类似方法。

单克隆抗体可以是人单克隆抗体或嵌合人－小鼠（或其它种类）单克隆抗体。可用多种本领域已知的任意技术制备人单克隆抗体（例如，Teng et al., 1983, 美国国家科学院院刊 80: 7308-7312; Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4: 72-79; Olsson et al., 1982, 酶学方法, 92: 3-16）。可制备含小鼠抗原结合结构域及人恒定区的嵌合抗体分子（Marrison et al., 1984，美国国家科学院院刊 81:6851, Takeda et al., 1985, Nature 314: 452）。

本领域已知的各种方法可用于生产抗本文所述的 TIE-2 配体的表位的多克隆抗体。为了生产抗体，可用 TIE-2 配体，其片段或衍生物注射

免疫各种宿主动物，包括但不限于兔，小鼠和大鼠。根据宿主种类，可使用各种佐剂增强免疫反应，包括但不限于弗氏（完全和不完全佐剂），矿物胶，如氢氧化铝，表面活性物质，如溶血卵磷脂，pluronic 多元醇，多聚阴离子，肽，油乳剂，钥孔蜈血蓝蛋白，二硝基苯酚，和潜在有用的人佐剂，如 BCG 卡介苗和小棒杆菌。

可用已知技术制备抗选定 TIE-2 配体表位的抗体的分子克隆。重组 DNA 方法（例如，见 Maniatis, et al., 1982, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York ）可用于构建编码单克隆抗体分子或其抗原结合区的核酸序列。

也可以获得抗体分子的片段。含该分子独特型的抗体片段可用已知技术生产。例如，该片段包括但不限于：经胃蛋白酶消化抗体分子产生的 $F(ab')_2$ 片段；经还原 $F(ab')_2$ 片段的二硫桥产生的 Fab′片段，经过用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子产生的 Fab 片段。可用已知技术纯化抗体分子，例如，免疫吸附或免疫亲和层析，色谱方法如 HPLC（高效液相色谱）或其组合。

本发明进一步包含测量生物学样品中 TIE-2 配体量的免疫试验，经过:

a)将生物学样品与至少一种能特异性地结合 TIE-2 配体的抗体结合以便该抗体与存在于样品中的任何 TIE-2 配体形成复合物;

b) 测量复合物的量并由此测定生物学样品中 TIE-2 配体的总量。

本发明进一步包含一种测定生物学样品中 TIE-2 受体总量的试验，经过:

a)将生物学样品与至少一种本发明的配体接触从而使配体与 TIE-2 受体形成复合物;

b) 测定复合物的总量，从而测定生物学样品中 TIE-2 受体总量。

本发明还提供了使用 TIE-2 配体支持 TIE-2 受体表达细胞存活和/或生长和/或分化。因此，该配体可用作一种添加剂以支持例如培养物中的内皮细胞。另外，申请人对 TIE-2 受体的相关配体的发现使试验系统的利用对 TIE-2 受体激动剂或拮抗剂的鉴定有用．该试验系统在鉴定能启动或抑制血管形成的分子中有用。例如，在一个实施方案中，TIE-2 受体拮抗剂可鉴定为能干扰 TIE-2 受体与生物活性 TIE-2 配体相互作用的

试验分子。按其能力鉴定该拮抗剂是: 1) 使用例如 BIAcore 生物传感器技术（ BIAcore; Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ ）测量时抑制生物活性 TIE-2 配体与受体的结合; 或 2) 抑制生物活性 TIE-2 配体引起生物学反应的能力。该生物学反应包括但不限于 TIE-2 受体或 TIE-2 信号转导途径下游成份的磷酸化，或携带 TIE-2 受体的细胞的存活，生长或分化。

在一个实施方案中，改造成表达 TIE-2 受体的细胞可依赖于加入 TIE-2 配体的生长。该细胞提供鉴定 TIE-2 受体的其它激动剂或能干扰 TIE-2 配体对该细胞之活性的拮抗剂的有用的试验系统。另外，改造成能共同表达 TIE-2 配体和受体的自分泌型细胞可在分析潜在的激动剂或拮抗剂中提供有用的系统。

因此，本发明提供了将 TIE-2 受体导入正常情况下不表达该受体的细胞，从而使该细胞表现出深度的且易于区分的对结合该受体的配体的反应。诱导的反应类型取决于所用的细胞，而不是导入细胞的特定受体。可选择合适的细胞系以产生对分析及发现能作用于酪氨酸激酶受体的分子最有用的反应。该分子可以是任意类型的分子，包括但不限于将在受体特异性方式中进行描述的在系统中发挥作用的肽和非肽分子。

采用的一个更有用的系统包括将 TIE-2 受体导入成纤维细胞系（例如， NIH 3T3 细胞），从而在正常情况下不介导增生反应的这类受体在导入成纤维细胞后可经过许多已建立的方法定量成纤维细胞生长因子的效应来分析( 例如, 胸苷掺入或其它类型的增生试验; 见 van Zoelen, 1990, “检测多肽生长因子的生物学分析的应用”， Progress. Fatcor Research, Vol. 2. pp. 131-152; Zhan 和 M. Goldfarb, 1986, Mol. Cell. Biol., Vol, 6, pp. 3541-3544 )。这些分析的额外优势是可能具有导入的受体的细胞系及缺乏该受体的亲本细胞学分析任何制品; 由于通过导入的受体介导，仅可判断对具有受体的细胞系的特定影响。该细胞可进一步改造成表达 TIE-2 配体，从而产生对分析以拮抗剂/激动剂相互作用起作用的分子有用的自分泌型系统。因此，本发明提供了包含编码 TIE-2 配体的核酸及编码 TIE-2 受体的核酸的宿主细胞。

TIE-2 受体/TIE-2 配体的相互作用还提供了对鉴定小分子 TIE-2 受体的激动剂或拮抗剂有用的系统。例如，可鉴定结合 TIE-2 受体但不诱导生物学活性的 TIE-2 配体片段，突变体或衍生物。另外， TIE-2 配体的

鉴定使该分子的活性部分的测定成为可能。而且，配体的鉴定使受体/配体复合物 X-射线晶体结构的测定成为可能，从而能够鉴定受体的结合位点：对结合位点的认识将提供合理设计新激动剂和拮抗剂的有用参考。

试验分子与 TIE-2 受体的特异性结合可以许多方法来测定。例如，试验分子与表达 TIE-2 的细胞的实际结合可经过检测或测量下列物质来检测或测量：(i)结合到完整细胞表面的试验分子；(ii)与细胞溶胞产物中 TIE-2 蛋白质交联的试验分子；或(iii)体外与 TIE-2 结合的试验分子。与试验分子 TIE-2 之间的特定相互作用可经过使用证实该相互作用独特特征的试剂来评价。

作为一个具体的非限制性的例子，可如下使用本发明的方法。考虑其中样品中的 TIE 配体待测的情况。将各种稀释度的样品（试验分子）与不含 TIE-2 配体活性的阴性对照（ NC ）和含已知量 TIE-2 配体的阳性对照（ PC ）在可检测标记的 TIE-2 配体（在本实施例中是放射性碘标记的配体）存在下平行地与表达 tie-2 的细胞接触。试验样品中 TIE-2 配体的总量可经过测定与对照及在各稀释度下结合的 $^{125}$I-标记的 TIE-2 配体总量，然后比较样品值与标准曲线来评价。样品中 TIE-2 配体越多，与 TIE-2 结合的 $^{125}$I-配体越少。

$^{125}$I-配体结合总量可经过测量每细胞中的放射活性总量或按 Meakin and Shooter, 1991, Neuron 6:153-163 所述使用 DSS 将 TIE-2 配体交联到细胞表面蛋白上并使用诸如能揭示具有相应于 TIE-2 配体/TIE-2 受体大小的标记蛋白的 SDS 聚丙烯凝胶电泳检测细胞提取物中标记蛋白质的总量来测定。特定的试验分子/TIE-2 相互作用可进一步经过向分析物中加入各种稀释度的不结合 TIE-2 受体并因此对标记的 TIE-2 配体和试验分子竞争结合 TIE-2 基本上无影响的未标记的对照配体来测定。另外，已知能破坏 TIE-2 配体/TIE-2 结合的分子，例如，但不局限于抗 TIE-2 抗体，或本文所述的 TIE-2 受体融合体预期会干扰 $^{125}$I - TIE-2 配体和试验分子对 TIE-2 受体结合的竞争。

可检测的标记的 TIE-2 配体包括，但不限于共价或非共价连接到放射活性物质，荧光物质，具有酶活性的物质，用作酶底物的物质（优选与比色法可检测到的相关的酶和底物）或能被抗体分子（优选可检测标记的抗体分子）识别的物质上的 TIE-2 配体。

另外，试验分子与 TIE-2 的特异性结合可经过评价 TIE-2 配体/TIE-2 受体结合的次级生物学效应，包括但不限于细胞生长和/或分化或立即早期基因表达或 TIE-2 磷酸化来测定。例如，试验分子诱导分化的能力可在缺乏 tie-2 的细胞及在表达 tie-2 的可比较细胞中测定，在表达 tie-2 的细胞中分化但不在缺乏 tie-2 的可比较细胞中分化表明有特异性的试验分子/TIE-2 相互作用，经过测定立即早期基因（例如 fos 和 jun ）在 tie-2 阴性和 tie-2-阳性细胞中的诱导，或经过使用本领域已知的标准磷酸化测定检测 TIE-2 的磷酸化可进行相似分析。这类分析在鉴定激动剂或不竞争性结合 TIE-2 的拮抗剂中可能有用。

同样，本发明提供了一种鉴定具有 TIE-2 配体生物学活性的分子的方法，包括：(i)将表达 tie-2 的细胞与试验分子接触，(ii)检测试验分子与 TIE-2 受体的特异性结合，其中与 TIE-2 的特异性结合与 TIE-2 可能的活性正相关。如上文所述，可经过分析直接结合或结合的次级生物学效应来检测特异性结合。该方法在鉴定 TIE 配体家族的新成员或在制药工业中，在筛选大量肽和非肽分子（例如，肽类似物）与 TIE 相关的生物学活性中特别有用。在本发明的一个优选的、具体的非限制性实施例中，制备许多孔的培养物孔，在不同的孔排中含有 PC12 （或成纤维细胞，见下面）细胞，它们是 tie-2 阴性或改造成 tie-2 阳性。然后加入各类试验分子，使各孔中或其一部分中含有不同的试验分子。然后计数各孔是否存在生长和/或分化。以这种方式可筛选出极大数目的试验分子的该活性。

在另一实施方案中，本发明提供了检测或测量 TIE 样活性或鉴定具有该活性的分子的方法，包含：(i)在允许发生结合的条件下，将试验分子与体外 TIE-2 受体蛋白质接触，(ii)检测试验分子与 TIE-2 蛋白质的结合，其中试验分子与 TIE-2 的结合与 TIE 样活性相关。根据该方法，TIE-2 可以是或不是基本上纯化的，可以固定于固相支持物上（例如，作为亲和柱或作为 ELISA 试验），或可以掺入人工膜上。试验分子与 TIE-2 的结合可用本领域已知的任何方法来评价。在优选的实施方案中，试验分子的结合可经过评价其与可检测标记的已知 TIE-2 配体竞争结合 TIE-2 受体的能力来评价。

本发明还提供了检测试验分子发挥 TIE 样活性拮抗剂的能力的方法，包含检测该分子抑制 TIE 配体结合表达 tie-2 的细胞上 TIE-2 的效应的能力。该拮抗剂可干扰或不干扰 TIE-2 配体/TIE-2 受体结合。TIE-2

配体与 TIE-2 受体结合的效应优选是生物学或生化效应，包括但不限于细胞存活或增生，细胞转化，立即早期基因诱导或 TIE-2 磷酸化。

本发明进一步提供了鉴定抗体或其它能在和配体或抑制与受体结合的分子的方法以及以该方法鉴定的分子。作为非限制性例子，该方法可以经过在概念上相似于 ELISA 试验的试验来进行。例如，TIE 受体融合体可结合于固相支持物上，如塑料多孔板。作为对照，将已进行 Myc 标记的已知量的 TIE 配体导入孔中，然后借助于抗 Myc-tag 的报道抗体鉴定结合受体融合体的任何标记的 TIE 配体。然后，该试验系统可用于筛选试验样品中具下列能力的分子：(i)结合标记的配体，(ii)结合受体融合体，从而抑制标记的配体与受体融合体的结合。例如，将含推定的目的分子及已知量标记配体的试验样品导入孔中并测定结合受体融合体的标记配体的总量。经过比较试样中结合的标记配体总量与对照的总量，可鉴定含有能抑制配体与受体结合的分子的样品。由此鉴定的目的分子可使用本领域的技术人员已知的方法分离。

一旦发现了配体结合的阻断剂，本领域的技术人员将知道进行次级试验以确定该阻断剂是与受体还是与配体结合，以及进行确定是否阻断剂分子能中和配体生物学活性的试验。例如，经过使用采用 BIA core 生物传感器技术（或相当技术）的结合试验，其中 TIE 受体融合体或 TIE 配体共价附着于固相支持物（例如，在金表面的羧甲基葡聚糖）上，本领域的技术人员将能测定阻断剂分子是否能特异性地结合配体或结合受体融合体。为了确定阻断剂分子是否能中和配体的生物学活性，本领域的技术人员可进行磷酸化试验（见实施例 5）或另外的功能生物测定，如经过使用诸如内皮细胞的原代培养物进行存活测定。另外，结合受体融合体的抑制剂分子可以是一种激动剂，本领域的技术人员经过进行合适的分析鉴定 TIE-2 受体的其它激动剂将了解如何进行确定。

由于已确定 TIE-2 受体与内皮细胞相关，且正如本文所证实的，对配体的阻断剂似乎防止血管形成，申请人证实了 TIE-2 配体对于表明有血管形成的疾病或紊乱中血管形成的诱导有用。该疾病或紊乱包括伤口愈合，局部缺血和糖尿病。另一方面，TIE-2 受体拮抗剂，如本文在实施例 2 和 3 中所述的受体融合体，在实施例 9 中所述的 TIE-2 配体 2 对于防止或减缓血管形成，从而防止或减缓例如肿瘤生长有用。

由于携带 TIE-2 受体的细胞似乎上调血管形成，TIE-2 配体融合体

也在防止或减缓诸如肿瘤生长中有用。 TIE-2 配体融合体对于将毒素传递给携带受体的细胞中有用。另外，其它分子，如生长因子，细胞因子或营养物可经过 TIE-2 配体融合体传递给携带 TIE-2 受体的细胞。 TIE-2 配体融合体也可用作 TIE-2 受体的诊断剂以检测体内或体外的受体。在与 TIE-2 受体相关的疾病状态中， TIE-2 配体可用作经过诸如组织染色或全身造影检测该疾病的诊断剂。

本发明还提供了药用组合物，包含存在于药物学上可接受的载体中的本文所述的 TIE-2 配体或配体融合体，其肽片段或衍生物。可全身性或局部施用 TIE-2 配体蛋白，肽片段或衍生物。可使用本领域已知的任何合适的用药方式，包括但不限于静脉内，鞘内，动脉内，鼻内，口内，皮下，腹膜内或经过局部注射或手术移植用药。还提供了缓释制剂。

本发明进一步提供了分离的和纯化的核酸分子，包含编码人 TIE-2 配体的核酸序列，其中核酸序列选自:

(a) 包含图 4，图 5 或图 6 描述的人 TIE-2 配体编码区的核酸序列;

(b) 在中等严格条件下与(a)的核酸序列杂交的且编码结合 TIE-2 受体的 TIE-2 配体的核酸序列; 和

(c)与(a)或(b)的核酸序列的遗传密码简并的核酸序列，它编码结合 TIE-2 受体的 TIE-2 配体。

在本发明的另一实施方案中，提供了编码 TIE-2 配体的分离的核酸分子，其中核酸序列是:

(a)包含图 4，图 5 或图 6 描述的人 TIE-2 配体编码区的核酸序列;

(b)在中等严格条件下与(a)的核酸序列杂交的且编码结合 TIE-2 受体的 TIE-2 配体的核酸序列; 或

(c)由于遗传密码的简并性能与(a)或(b)的核酸序列杂交的，且编码结合 TIE-2 受体的 TIE-2 配体的核酸序列。

本发明进一步提供了由本发明分离的核酸分子编码的分离和纯化的人 TIE-2 配体。本发明还提供了包含含有编码人 TIE-2 配体核酸序列的分离的核酸分子的载体。在一个实施方案中，载体命名为编码人 TIE2 配体 2 的 pBluescript KS 。

本发明进一步提供了包含编码人 TIE-2 配体 DNA 分子的表达载体，其中 DNA 分子有效连接到表达控制序列上。

本发明还提供了用于生产具有人 TIE-2 配体生物学活性之多肽的宿

主载体系统，包含在合适宿主细胞中的本发明的表达载体。在一个实施方案中，合适的宿主细胞可以是细菌细胞，酵母细胞，昆虫细胞或哺乳动物细胞。本发明进一步提供了生产具有生物学活性 TIE-2 配体活性的多肽的方法，包含在允许生产该多肽的条件下生长本发明的宿主-载体系统细胞并回收如此生产的多肽。

本文描述的本发明的分离的编码 TIE-2 配体的核酸分子进一步提供了形成配体，其片段或衍生物、或是受体激动剂或拮抗剂的另一分子作为治疗患有涉及表达 TIE 受体的细胞，组织或器官的疾病的治疗剂。作为非限制性例子，本发明提供了特异性结合 TIE-2 受体或 TIE-2 的配体融合体。在另一实施方案中，本发明提供了包含与免疫球蛋白恒定区融合的 TIE-2 配体的配体融合体。在一个实施方案中，配体融合体包含 TIE-2 配体 1，或 TIE-2 配体 2 和人 IgG1 Fc 部分。配体融合体可用于人或动物体的治疗方法或诊断方法中。

本发明进一步提供了包含人 TIE-2 配体或配体融合体和连接到其上的细胞毒剂的治疗组合物。在一个实施方案中，细胞毒剂可以是放射性同位素或毒素。

本发明进一步提供了纯化人 TIE-2 配体的方法，包括:

a)将至少一种 TIE-2 结合底物偶联到固相基质上;

b)保温 a)的底物与细胞溶胞产物使底物与细胞溶胞产物中的人 TIE-2 配体形成复合物;

c)洗涤固相基质; 和

d)从偶联的底物上洗脱出人 TIE-2 配体。

该底物可以是特异性地接合人 TIE-2 配体的任意底物。在一个实施方案中，底物选自抗－TIE-2 配体融合体，TIE-2 受体和 TIE-2 受体融合体。本发明进一步提供了特异性地结合人 TIE-2 配体的受体融合体以及包含在药用上可接受的载体中的受体融合体的治疗组合物。

本发明还提供了包含在药用上可接受的载体中的人 TIE-2 配体或配体融合体的治疗组合物。

本发明还提供了包含在药用上可接受的载体中的人 TIE-2 配体或配体融合体的治疗组合物。

另外，本发明提供了鉴定表达 TIE-2 受体的细胞的方法，包含在允许可检测标记的配体与 TIE-2 受体结合的条件下将细胞与可检测标记的 TIE-2 配体或配体融合体接触并测定可检测标记的配体是否结合到 TIE-2 受体上，从而鉴定表达 TIE-2 受体的细胞。本发明还提供了治疗组合物，包含 TIE-2 配体或配体融合体和连接到其上的细胞毒剂。细胞毒剂可以是放射性同位素或毒素。

本发明还提供了检测细胞表达 TIE-2 配体的方法，包含从细胞获得 mRNA，在杂交条件下将所获得的 mRNA 与编码 TIE-2 配体的标记的核酸分子接触，测定与标记分子杂交的 mRNA 的存在，从而检测细胞中 TIE-2 配体的表达。

本发明进一步提供了检测组织切片中 TIE-2 配体表达的方法，包含在杂交条件下，将组织切片与编码 TIE-2 配体的标记的核酸分子接触，测定与标记分子杂交的 mRNA 的存在，从而检测组织切片中 TIE-2 配体的表达。

实施例 1 - ABAE 细胞系作为 TIE-2 受体报告细胞的鉴定

成年 BAE 细胞以 ECACC#92010601 在欧洲细胞培养物保藏中心登记（见 PNAS 75:2621(1978)）。Northern（RNA）分析揭示在 ABAE（成年牛动脉内皮细胞）细胞系中 tie-2 转录子的中等水平，这与证实 tie-2 RNA 几乎专一性地位于血管内皮细胞的原位杂交结果一致。因此，我们检查了 ABAE 细胞溶胞产物中 TIE-2 蛋白质的存在，以及在正常情况下相对于无血清生长条件时 TIE-2 蛋白质酪氨酸磷酸化的程度。收获 ABAE 细胞溶胞产物并进行免疫沉淀，接着对用 TIE-2 特异的和磷酸酪氨酸特异性的抗血清免疫沉淀的蛋白质进行 Western 印迹分析。在 TIE-2 免疫沉淀期间包含或者去作为特异性抑制分子的 TIE-2 肽允许明确鉴定 TIE-2 是一种约 150KD 的中等可测蛋白，其稳定状态的磷酸酪氨酸水平经预先的细胞血清饥饿减少到几乎不可检测的水平。

按下面所述进行 ABAE 细胞的培养和细胞溶胞产物的收获。低传代数的 ABAE 细胞以 $2 \times 10^6$ 个细胞/150mm 塑料培养板（Falcon）的密度涂布成单层并在含 10%小牛血清（10％BCS），2mM L-谷氨酰胺

（Q）和青霉素及链霉素（P－S）各1％的Dulbecco氏改良的Eagle氏培养基（DMEM）中在5％ $CO_2$ 气体中培养。收获细胞溶胞产物前，细胞在DMEM/Q/P-S中血清饥饿24小时，接着吸出培养基并用加有正钒酸钠，氟化钠及苯甲脒钠的冰冻磷酸盐缓冲液（PBS）漂洗平板。细胞在加有1％ NP40去污剂和蛋白酶抑制剂，PMSF和抑蛋白酶肽的少量体积的该漂洗缓冲液中溶胞。经过在4℃以14000 × G离心10分钟从细胞溶胞产物中去掉不溶性碎片，在含有或不含加至～20μg/ml溶胞产物的抑制肽的条件下用对TIE-2受体特异性的抗血清对上清液进行免疫沉淀。免疫沉淀的蛋白质经PAGE（7.5％ Laemmli凝胶）分辨，然后电转移到PVDF膜上并与各种TIE-2或磷酸酪氨酸特异性的抗血清保温。经过将膜与HRP－连接的第二抗血清保温，接着用ECL试剂（Amersham）处理可观察TIE-2蛋白质。

实施例2－TIE-2受体融合体的克隆和表达以便对TIE-2配体相互作进行亲和性研究

构建了一个表达构建体以产生由大鼠TIE-2受体完整细胞外部分与人免疫球蛋白γ-1恒定区（IgG1 Fc）融合组成的分泌蛋白质。该融合蛋白质称为TIE-2“受体融合体”（RB），且在正常情况下根据在单个IgG1 Fc尾之间形成二硫键预期在溶液中以二聚体存在。TIE-2 RB的Fc部分制备如下。用相应于公开的人IgG1序列的寡核苷酸经PCR从人胎盘cDNA中扩增编码跨越铰合区到该蛋白质羧基末端的人IgG1 Fc部分的DNA片段；将所得的DNA片段克隆进质粒载体。将来自编码全长TIE-2受体的质粒和来自人IgG1 Fc质粒的合适的DNA限制性片段连接到短的PCR产生的片段任一侧，设计成融合的符合阅读框的TIE-2和人IgG1 Fc蛋白编码序列。因此,所得TIE-2胞外域－Fc融合蛋白质被精确取代，由IgG1 Fc代替跨越TIE-2跨膜和胞质域的区域。另一种制备RB的方法在Goodwin, et al. Cell 73: 447-456(1993)中描述。

经过将TIE-2 RB DNA片段克隆进pVL1393杆状病毒载体并随后感染草地叶蛾SF-21AE昆虫细胞系可获得毫克量的TIE-2 RB。另外，也可使用细胞系SF-9（ATCC保藏号CRL-1711）或细胞系BT1-TN-561-4。编码TIE-2 RB的DNA以Eco R1-Not1片段克隆进杆状病毒转移质粒pVL1393。经过氯化铯密度梯度离心纯化的质粒DNA经过将3μg该质粒DNA与0.5μg Baculo-Gold DNA（Pharminigen）混合重组进病毒DNA

中，接着使用 30μg Lipofectin （ GIBCO-BRL ）导入脂质体中。将 DNA 脂质体混合物加入在 TMN-FH 培养基改良的 Grace 氏昆虫细胞培养基（ GIBCO - BRL ））中的 SF - 21AE 细胞（ 2 × $10^6$ 细胞/60mm 培养皿）中 27 ℃保温 5 小时，接着在补充有 5 % 小牛血清的 TMN-FH 培养基中 27 ℃ 5 天。收获组织培养基，对重组病毒进行噬斑纯化，该步骤使用以前描述的方法（ O'Reilly, D. R., L. K. Miller, 和 V. A. Luckow, 杆状病毒表达载体 - 实验手册 ， 1992， New York; 以 H. Freeman ）进行，除了琼脂糖覆盖层含 125μg/ml X-gal （ 5 - 溴 - 4 - 氯 - 3 - 吲哚 - β - D - 半乳糖吡喃糖苷； GIBCO-BRL ）。 27 ℃培养 5 天后，以对 X-gal 底物的阳性生色反应计数非重组噬斑，标记其位置。然后经过加入含 100μg/ml MTT （ 3 - [4, 5 - 二甲基噻唑 - 2 - 基 - 2, 5 - 二苯基溴化四唑； Sigma ）的第二层观察重组噬斑。经栓塞吸出挑选推定的重组病毒噬斑，经多轮噬斑分离来纯化以保证其均一性。经过对噬斑纯化的病毒进行系列低复数传代生产病毒种子。生产了一个病毒克隆（ vTIE-2 受体融合体）的低传代种子。

在含 1 × 抗生素/抗真菌溶液（ Gibco BRL ）和 25mg/L 庆大霉素（ Gibco BRL ）的无血清培养基（ SF - 900II, Gibco BRL ）中培养基 SF - 21AE 细胞。加入 Pluronic F-68 作为表面活性剂至终浓度为 1g/L 。感染前在生物反应器（ Artisan Cell Station System ）中培养细胞（ 4L ）至少 3 天。以 80mL/分的气体流速（在喷气环中通气）通气至 50 % 溶氧，在 27 ℃生长细胞。借助于船用叶轮以 100rpm 的速度搅拌。在对数生长中期（~2 × $10^6$ 个细胞/mL ）收获细胞，离心浓缩并用每细胞 5 个噬斑形成单位的 v TIE-2 受体融合体感染。用新鲜培养基使细胞和接种物为 400mL，在转瓶中 27 ℃吸收病毒 2 小时。然后用新鲜无血清培养基重悬培养物至 8L 终体积，使用前面描述的条件在生物反应器中培养细胞。

感染 72 小时后离心（ 500 × g， 10 分钟）收集 v TIE-2 受体融合体感染的 SF 21AE 细胞的培养基。用 NaOH 将细胞上清液调至 pH8 。加入 EDTA 至终浓度为 10mM，将上清 pH 重调至 8 。过滤（ 0.45μm，Millipore ）上清并上样到蛋白质 A 柱（蛋白质 A 琼脂糖 4 快速流动或 HiTrap 蛋白质 A，均来自 Pharmacia ）。用含 0.5M NaCl 的 PBS 洗柱至 280nm 吸光率减少到基线。在 PBS 中洗涤柱并用 0.5M 乙酸洗脱。经过洗脱进含 1M Tris pH9 的管立即中和柱级分。合并含 TIE-2 RB 的峰级分

并用 PBS 透析。

实施例 3 - 证实 TIE-2 在血管形成中起关键作用

由于缺乏 TIE-2 受体的已知配体，因此经过将“过多的”可溶性 TIE-2 受体融合体（ TIE-2 RB ）导入发育系统可获得对 TIE-2 功能的了解。TIE-2 RB 结合，从而中和现存 TIE-2 配体的潜在能力可导致正常血管形成的可见的破坏及配体的鉴定。为了检查 TIE-2 RB 是否能用于破坏早期鸡胚的血管形成，用 TIE-2 RB 浸泡小片生物学可吸收泡并在正靠原胚侧面的位置立即插入到绒毛膜尿囊膜下面。

早期鸡胚在卵黄顶上从被绒毛膜尿囊膜（ CAM ）覆盖的一小盘细胞上形成。将要在胚胎中排成血管的内皮细胞来自胚外和胚内细胞。胚外来源的内皮细胞提供胚胎内皮细胞的主要来源，它由位于固有胚侧面周围 CAM 正下方的间质的添加生长产生。随着这些间质细胞的成熟，产生内皮和造血细胞的共同祖先，称为血管母细胞。接着，血管母细胞产生成血管细胞（内皮细胞祖先）和成血细胞（多能造血前体）的混合群体。当内皮细胞后代围绕原始血细胞分开形成一个细胞厚的导管时开始形成循环系统原基。这些细胞成份的增生和迁移最终在 CAM 下产生庞大的充满血液的毛细血管的网络，并最后侵入胚胎与有限的胚内来源的血管单元连接。

从 Spafas, Inc.（ Boston, MA ）获得的刚受精的鸡卵在 99.5F°， 55 % RH 下培养。在发育大约 24 小时时，用 70 % 乙醇消毒蛋壳并用牙医钻在每个蛋的钝端钻一个 1.5cm 的孔。去掉壳膜以暴露胚上方的气室。用解剖刀切下无菌 Gelfoam （ Upjohn ）的小矩形片并浸泡于等浓度的 TIE-2 或 EHK-1 受体融合体中。使用 EHK-1 胞外区域代替 TIE-2 细胞外域按实施例 2 所述制备 EHK-1 受体融合体（ Maisonpierre et al., Oncogene 8: 3277-3288(1993)）。各 Gelfoam 片大约吸收 30μl 中的 6μg 蛋白。在原胚侧面几毫米的位置用无菌钟表镊在 CAM 上撕一缺口。将浸泡有 RB 的 Gelfoam 片大部分插入到 CAM 下面，用一片胶粘带密封蛋壳。其它相似状态的卵平行地用无关 RB ，神经表达受体酪氨酸激酶，EHK-1 处理（ Maisonpierre et al., Oncogene 8: 3277-3288(1993)）。使发育进行 4 天，然后经肉眼观察检查胚。经过在温 PBS 碟中小心弄破壳并小心切下带有周围 CAM 的胚来取出胚。在 12 个用各种 RB 处理蛋中，6 个 TIE-2 RB 和 5 个 EHK-1 RB 处理的胚发育超过实验开始观察的状

态。在这些形成的胚中观察到显著区别，如图 1A 和 1B 所示。那些用 EHK-1 RB 处理的胚似乎相当正常地发育。以存在跳动的心脏判断 5 个 EHK-1 胚中 4 个是活的。而且，胚外血管丰富并在 CAM 下侧面延伸几厘米，由于存在红血细胞，这肉眼观察明显。与此相反， TIE-2 RB 处理的胚与直径超过 10mm 的 EHK-1 RB 胚相比发育严重受阻，直径范围为 2-5mm 。全部 TIE-2 处理的胚死亡且其 CAM 无血管。 TIE-2 RB 在鸡中抑制血管形成的能力证实 TIE-2 RB 配体对血管发育是必须的。

实施例 4 - 在 ras 癌基因转化的 C2C12 小鼠成肌细胞系条件培养基中 TIE-2 特异性结合活性的鉴定

从各种细胞系的 10 倍浓缩的细胞条件培养基（ 10 × CCM ）中对存在可溶的， TIE-2 特异性结合活性的筛选（ BIAcore; Pharmacia 生物传感器， Piscataway. NJ )显示在癌基因 ras 转化的 C2C12 细胞（ C2C12-ras ）， RAT 2-ras （ ras 转化的成纤维细胞系），人成神经胶质细胞瘤 T98G 和称为 SHEP-1 的人成神经细胞瘤细胞子的无血清培养基中有结合活性。

从以标准磷酸钙法用 H-ras 的 T-24 突变体转染致癌转化的 C2C12 成肌细胞的稳定转染细胞系产生 C2C12 ras， 10 × CCM 。为了选择转染克隆将 SV40 为基础的新霉素抗性表达质粒与 ras 表达质粒相连。所得的 G418 - 抗性 ras - C2C12 细胞在补充有 10 % 胎牛血清（ FCS ）的 DMEM/谷氨酰胺/青霉素 - 链霉素塑料平皿中以单层按常规维持。经过在无血清限制培养基中涂布 60 % 汇合的细胞 12 小时制备无血清 C2C12 - ras 10 × CCM （ Zhan and Goldfarb, Mol. Cell. Biol. 6： 3541 - 3544 （ 1986 ）； Zhan et al.Oncogene 1: 369-376(1987) )。弃去培养基并用新鲜 DMEM/Q/P-S 代替 24 小时。收获该培养基并给细胞再供应新鲜 DMEM/Q/P-S ，也再过 24 小时后收获。给这些 CCM 补充蛋白酶抑制剂 PMSF （ 1mM ）和抑蛋白酶肽（ 10μg/ml ）， 在无菌大小排阻膜（ Amicon ）上浓缩 10 倍。在 BIAcore 分析前经过用过剩的 TIE-2 RB 保温培养基而不用 EHK-1 RB 保温中和 TIE-2 结合活性。

使用经表面胞质团共振监测实时生物分子相互作用的生物传感器技术（ BIAcore; Pharmacia Biosensor, Piscataway. NJ ）测量 10 × CCM 的结合活性。纯化的 TIE-2 RB 经伯胺共价偶联到 CM5 研究级传感器片的羧甲基葡聚糖层（ Pharmacia Biosensor, Piscataway. NJ ）上。使用 N -

羟基琥珀酰亚胺（ NHS ）和 N - 乙基 - N′ - （ 3 - 二甲氨丙基）碳二亚胺（ EDC )的混合物激活传感器片的表面，接着用 TIE-2 RB （ 25μg/ml, pH4.5 ）制动并用 1.0M 乙醇胺（ pH8.5 ）灭活非反应位点。以相似方法制备 EHK-1 受体融合体的阴性对照表面。

用于该系统的流动缓冲液是 HBS （ 10mM Hepes, 3.4mM edta, 150mM NaCl, 0.005% P20 表面活性剂， pH7.4 ）。 10 × CCM 样品在 4 ℃离心 15 分钟并进一步用无菌低蛋白结合 0.45μm 滤膜（ Millipore; Bedford, MA ）澄清。将葡聚糖（ 2mg/ml ）和 P20 表面活性剂（ 0.005%）加入各 CCM 样品中。以 5μL/分的流速将 40μL 等分试样注射通过固定化表面（ TIE-2 或 EHK-1 ）并监测受体结合 8 分钟。以样品注射前 30 秒测定的基线值与注射后 30 秒的测量值之间的差别测定结合活性（共振单位， RU ）。以 12μL 3M $MgCl_2$ 脉冲实现表面的再生。

仪器的燥声水平是 20RU ； 因此具有超过 20RU 信号的任何结合活性可解释为与受体的实际相互作用。对于 C2C12-ras 条件培养基，与 TIE-2 RB 固定化表面的结合活性范围是 60 - 90RU 。对于在 EHK-1 RB 固定化表面测定的相同样品，测定的活性小于 35RU 。在测定结合活性前，经过将样品与过剩的可溶性 TIE-2 或 EHK-1 RB 保温可评价与 TIE-2 受体融合体的特异性结合。加入可溶性 EHK-1 RB 对任何样品的 TIE-2 结合活性无影响，而在可溶性 TIE-2 存在的条件下，与表面的结合比缺乏 TIE-2 的测量值少 2/3 。使用>50 × 浓缩的 C2C12-ras CCM 的重复试验导致比 TIE-2 特异性结合信号背景值增加 4 倍。

实施例 5 - C2C12-ras 含有诱导 TIE-2 受体酪氨酸磷酸化的活性

检查 C2C12-ras 10 × CCM 在 ABAE 细胞中诱导酪氨酸磷酸化的能力。用 C2C12-ras CCM 简短地培养血清饥饿的 ABAE 细胞。溶胞并按上面所述进行免疫沉淀和 Western 分析。用无血清 C2C12-ras 10 × CCM 刺激血清饥饿的 ABAE 细胞按下面进行。取出按上面所述饥饿的 ABAE 细胞培养基并用预温到 37 ℃的限定培养基或 10 × CCM 代替。 10 分钟后，去掉培养基，细胞在冰上用加有正钒酸盐/NaF/苯甲脒的过量冰冷的 PBS 洗涤 2 次。按上面所述进行细胞溶胞和 TIE-2 特异性免疫沉淀。

用限定培养基培养 ABAE 细胞 10 分钟显示无 TIE-2 酪氨酸磷酸化诱导，而用 C2C12-ras CCM 培养刺激 TIE-2 磷酸化至少增加 100 倍。经过在室温下用 13μg 偶联到蛋白质 G-Sepharose 珠上的 TIE-2 RB 预保温

C2C12-ras 10 × CCM 90 分钟几乎完全去掉该活性。单独用蛋白质 G Sepharose 保温培养基不丧失该磷酸化活性。

实施例 6 - TIE-2 配体的表达克隆

在含 10 % 胎牛血清（ FBS ），青霉素和链霉素（ p/S ）各 1 % 和 2mM 谷氨酰胺的 Dulbecco's 改良 Eagle 培养基（ DMEM )中在 5 % $CO_2$ 的空气中培养 COS-7 细胞。在含 10 % FBS，（ P/S ）和 2mM 谷氨酰胺的 Eagle 基础培养基（ EMEM )中培养小鼠成肌细胞 C2C12 ras 细胞系。经过在 COS 细胞表达的 pJFE14 载体中筛选 C2C12 ras cDNA 文库获得全长小鼠 TIE-2 配体 cDNA 克隆。该载体，如图 2 所示，是载体 pSRα 的改良形式（ Takebe, et al, 1988, Mol. Cell. Biol. 8: 466-472 )使用在 pJFE14 载体中的 2 个 BSTX1 限制性位点生产文库。

以 DEAE - 葡聚糖转染操作用 pJFE14 文库或对照载体瞬时转染 COS-7 细胞。简单地说，在转染前 24 小时将 COS-7 细胞以 $1.0 \times 10^6$ 细胞/100mm 平板的密度涂布。为了转染，在含 400μg/ml DEAE 葡聚糖、1μM 氯喹、 2mM 谷氨酰胺、 1μg 合适 DNA 的无血清DMEM中在 5 % $CO_2$ 的大气中 37 ℃培养细胞 3 - 4 小时。吸出转染的培养基并用含 10 % DMSO 的磷酸缓冲液取代 2 - 3 分钟。经过该 DMSO “贮藏” 后，将 COS-7 细胞放入含 10 % FBS，青霉素和链霉素各 1 %， 2mM 谷氨酰胺的 DMEM 中 48 小时。

由于 TIE-2 配体是分泌型，必须透过细胞检测受体融合体探针与配体的结合。转染 2 天后，用 PBS 漂洗细胞，然后用含 1.8%甲醛的 PBS 在室温下培养 15 - 30 分钟。然后用 PBS 洗涤细胞并用含 0.1%Triton X-100 和 10 % 小牛血清的 PBS 培养 15 分钟以渗透细胞并封闭非特异性结合位点。使用由 TIE-2 细胞外域与 IgG1 恒定区融合组成的 TIE-2 受体融合体经直接染色定位进行筛选。按实施例 2 所述制备该受体。 100mm 平皿中转染的，固定并渗透的 COS 细胞经过将它们与 TIE-2-RB 保温 30 分钟进行探测。然后用 PBS 洗涤细胞 2 次并用 PBS/10%小牛血清/抗人 IgG 碱性磷酸酶连接物再保温 30 分钟。用 PBS 洗 3 次后，在碱性磷酸酶底物中保温细胞 30 - 60 分钟。然后显微观察平皿中染色细胞的存在。对于每个染色细胞，使用塑料吸管吸头从平皿中刮下包括染色细胞的细胞小区，然后回收质粒 DNA 并用于电穿孔细菌细胞。挑出由电穿孔产生的单个细菌集落，从这些菌落制备的质粒 DNA 用于转染 COS-7 细胞，

以与 TIE-2 受体融合体的结合为证据探测其中 TIE-2 配体的表达。这使得可鉴定编码 TIE-2 配体的单克隆。使用实施例 5 所述的方法经 TIE-2 受体的磷酸化证实 TIE-2 配体的表达。编码 TIE-2 配体的质粒克隆于 1994 年 10 月 7 日保藏在 ATCC 并以 ATCC 保藏号 75910 命名为“编码 TIE-2 配体的 pJFE14”

实施例 7 - 编码人 TIE-2 配体全长 cDNA 克隆的分离和测序

从 Clontech 实验室， Inc （ Palo Alto, CA ）获得在λ gt-10 中的人胎肺 cDNA 文库（见图 3 ）。以 $1.25 \times 10^6/20 \times 20$cm 平板的密度涂布噬斑，按标准方法取影印滤膜（ Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed, page 8.46, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York ）。

按下面所述进行人 tie-2 配体克隆的分离。经随机引物将来自保藏的 tie-2 配体克隆（ ATCC NO. 75910 - 见上面实施例 6 ）的 2.2kb × hol 片段标记成比活大约为 $5 \times 10^8$ cpm/ng 。在含 0.5mg/ml 鲑鱼精 DNA 的杂交溶液中 65 ℃进行杂交。在 2 × SSC， 0.1% SDS 中 65 ℃洗涤滤膜并对 kodak XAR-5 胶片在-70 ℃曝光过夜。噬斑纯化阳性噬菌体。使用标准技术经 Qiagen 柱（ Qiagen. Inc. Chatsworth, CA, 1995 catalog, Page 36 ）将纯噬菌体的高滴度噬菌体溶胞产物用于分离 DNA 。含人 tie-2 配体 DNA 的λ 噬菌体载体以编码 htie-2 配体 1 的λgt10 命称于 1994 年 10 月 26 日保藏于 ATCC （ ATCC 保藏号 75928 ）。噬菌体 DNA 可经双脱氧链终止法直接进行 DNA 序列分析（ Sanger et al., 1977,美国国家科学院院刊， 74： 5463 - 5467 ）。

将人 TIE-2 配体亚克隆进哺乳动物表达载体

编码 htie-2 配体 1 的克隆λgt10 在人 tie-2 配体编码序列起点下游 490 碱基对处含有一个 EcoR1 位点。使用分别在起始和终止密码子上游和下游的单个限制性位点可切下编码区。例如，位于起始密码 5′ 70bp 处的 Spel 位点和位于终止密码 3′265 bp 处的 Bpullozi （也称为 BlPI ）位点可用于切下完整的编码区。然后使用 Xba1（与 Spel 突出端相匹配）和 Pst1 位点（ Pst 1 和 Bpullozi 位点都制成平端）将它亚克隆进 pJFE14 克隆载体。

人 TIE-2 配体测序

使用 AB1 373A DNA 测序仪和 Tag 染料脱氧末端循环测序试剂盒

（ Applied Biosystem, Inc. Foster City, CA ）测序编码 htie-2 配体 1 的克隆λgt10 编码区。编码 htie-2 配体 1 的克隆λgt10 的人 TIE-2 配体的核苷酸和推断的氨基酸序列在图 4 中显示。

另外，经过在 pJFE14 载体中筛选人成胶质细胞瘤 T98G cDNA 文库获得全长人 TIE-2 配体 cDNA 克隆。使用保藏的 tie-2 配体克隆（ ATCC NO. 75910 ）的 2.2kb xhol 片段作探针（见上面实施例 6 ）经 DNA 杂交鉴定编码人 tie-2 配体的克隆。使用 ABI 373A DNA 测序仪和 Taq 染料脱氧终端循环测序试剂盒（ Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA ）测序编码区。该序列与编码 htie-2 配体 1 的λgt10 克隆的序列几乎相同。如图 4 所示，编码 htie-2 配体 1 的克隆λgt10 含有由核苷酸 1114 - 1116 编码的另外的甘氨酸残基。 T98G 克隆的编码序列不含该甘氨酸残基，此外与编码 htie-2 配体 1 的克隆λgt10 的编码序列相同。图 5 阐述了 T98G 克隆的人 TIE-2 配体的核苷酸和推断的氨基酸序列。

实施例 8 - 编码人 TIE-2 配体的第二种全长 cDNA 克隆的分离和测序

从 Clontech 实验室， Inc. （ Palo Alto CA ）获得λgt-10 包装的人胎肺 cDNA 文库（见图 3 ）。以 1.25 × $10^6$/20 × 20cm 平板的密度涂布噬斑，按下面标准方法制得影印滤膜（ Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed, page 8.46, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York ）。用针对人 tie 2 L-1 序列制备的探针以低严格条件（ 2 × SSC， 55 ℃ ）筛选复制滤膜。用编码图 4 所列人 tie 2 L-1 氨基酸 25-265 的 5′探针探测一个复制滤膜。用编码人 tie 2 L-1 序列氨基酸 282 - 498 （见图 4 ）的 3′探针探测第二复制滤膜。两个探针在含 0.5mg/ml 鲑鱼精 DNA 的杂交溶液中 55 ℃进行杂交。在 2 × SSC 中 55 ℃洗涤滤膜并对 X-射线胶片曝光过夜。另外，复制膜也在正常严格条件下（ 2 × SSC 65 ℃ ）与编码小鼠 tie 2L 探针全长（ F3-15， Xhol 插入片段）进行杂交。挑选满足下列标准的阳性克隆： i. 在正常严格条件下与全长（小鼠）探针看不到杂交， ii 在低严格条件下与 5′和 3′探针都可看到杂交。 EcoR1 消化从这些克隆获得的噬菌体 DNA 显示出 2 个独立的克隆，具有大约 2.2 kb 和大约 1.8kb 大小的插入片段。 2.2kb EcoRI 插入片段亚克隆进适用于 COS 细胞的 pBluescript KS （ Stratagene ）和哺乳动物表达载体的 EcoRI 位点。鉴定哺乳动物表达载体的两种取向。在 pBluescript KS 中的 2.2kb 插入片段于 1994 年 12 月 9 日保藏在

ATCC，命名为编码人 TIE-2 配体 2 的 pBluescript KS。TIE-2 配体 2 编码序列的起始位点在 pBluescript EcoRI 位点下游大约 355 碱基对处。

以 DEAE－葡聚糖转染操作用表达载体或对照载体瞬时转染 COS-7 细胞。简单地说，在转染前 24 小时以每 100mm 平板 $1.0 \times 10^6$ 个细胞的密度涂布 COS-7 细胞。为了转染，在含 400μg/ml DEAE－葡聚糖，1μM 氯喹和 2mM 谷氨酰胺，1μg 合适 DNA 的无血清 DMEM 中在 5 % $CO_2$ 的空气中 37 ℃培养细胞 3 － 4 小时。吸出转染培养基并用含 10% DMSO 的磷酸盐缓冲盐水取代 2 － 3 分钟。经过该 DMSO "贮藏" 后，将 COS-7 细胞放入含 10 % FBS，青霉素和链霉素各 1 %，2mM 谷氨酰胺的 DMEM 中 48 小时。

由于 TIE-2 配体是分泌型，必须透过细胞检测受体融合体探针与配体的结合。转染的 COS-7 细胞以每 100mm 平板 $1.0 \times 10^6$ 个细胞的密度涂布。用 PBS 漂洗细胞，然后用含 1.8 % 甲醛的 PBS 在室温下培养 15 － 30 分钟。然后用 PBS 洗涤细胞并用含 0.1%Triton X － 100 和 10 % 小牛血清的 PBS 培养 15 分钟以渗透细胞并封闭非特异性结合位点。经过使用 TIE-2 受体融合体染色的直接定位进行筛选，该受体融合体由 TIE-2 胞外区域与 IgG1 恒定区融合组成。该受体融合体按实施例 2 所述制备。转染的 COS 细胞经过与 TIE-2-RB 培养 30 分钟探测。然后用 PBS 洗涤细胞 2 次，用甲醛固定，然后用 PBS/10%小牛血清/ 抗人 IgG 碱性磷酸酶连接物再培养 30 分钟。用 PBS 洗 3 次后，细胞在碱性磷酸酶底物中培养 30 － 60 分钟。然后显微镜观察平皿中染色细胞的存在。可见表达一个克隆方向而不是另一方向的细胞结合 TIE-2 受体融合体。

本领域的技术人员易于看到所述方法可用于进一步鉴定 TIE 配体家族中的其它有关成员。

第二种人 TIE-2 配体的测序

使用 AB1 373A DNA 测序仪和 Taq 染料脱氧末端循环测序试剂盒（Applied Biosysten Inc., Foster City, CA）测序来自编码人 TIE-2 配体 2 的克隆 pBluescript KS 的编码区。来自编码人 TIE-2 配体的克隆 pBluescript KS 的人 TIE-2 配体核苷酸和推断的氨基酸序列在图 6 中显示。

实施例 9 － TIE-2 配体 2 是一种受体拮抗剂

比较表达 TIE-2 配体 2（TL2）或 TIE-2 配体 1（TL1）的 COS 细

胞的条件培养基激活天然存在于人内皮细胞系中的 TIE-2 受体的能力。

脂转染胺试剂（ GIBCO-BRL, Inc ）和推荐的方法用于以单独的 pJFE14 表达载体，含人 TIE-2 配体 1 cDNA 的 pJFE14 载体或含人 TIE-2 配体 2 cDNA 的 pMT21 表达载体（ Kaufman, R. J.1985, 美国国家科学院院刊 Sic. USA 82: 689-693 ）转染 COS-7 细胞。 3 天后收获含分泌配体的 COS 培养基并经渗滤（ DIAFLO 超滤膜， Amicon, Inc.）浓缩 20 倍。测定在该培养基中存在的活性 TIE-2 配体 1 和 TIE-2 配体 2 的量并以 BIAcore 结合试验测定的 TIE-2 受体特异性结合活性的量（共振单体， R. U.）来表达。

Northern （ RNA ）分析揭示了在 HAEC （人动脉内皮细胞）人原代内皮细胞（ Clonetics, Inc.）中 TIE-2 转录子的明显水平。因此，这些细胞用于检查当与含 TIE-2 配体的 COS 培养基接触时 TIE-2 受体是否是酪氨酸磷酸化。 HAEC 细胞在含 5 % 胎牛血清，可溶性牛脑提取物，10ng/ml 人 EGF ， 1mg/ml 氢化可的松， 50mg/ml 庆大霉素和 50ng/ml 两性霉素 - B 的完全内皮细胞生长培养基（ Clonetics, Inc.）中维持。按下面进行对 TL1 和 TL2 是否激活 HAEC 细胞中 TIE-2 受体的测定。半汇合的 HAEC 细胞在加有 L-谷氨酰胺和青霉素 - 链霉素的高葡萄糖 Dulbecco's MEM 中血清饥饿 2 小时，接着用含配体的条件 COS 培养基代替饥饿培养基在 5 % $CO_2$ 培养箱中 37 ℃培养 7 分钟。随后将该细胞溶胞并经过用 TIE-2 肽抗血清免疫沉淀溶胞产物回收 TIE-2 受体蛋白质，接着完全按实施例 1 所述用抗磷酸酪氨酸抗血清进行 Western 印迹。结果在图 7 中显示。经过用 TIE-2 配体 1 （泳道 L1 ）而不是 TIE-2 配体 2 （泳道 L2 ）条件 COS 培养基处理 HEAC 细胞可诱导对 TIE-2 受体（ TIE2-R ）的磷酸酪氨酸水平。 MOCK 是用 JFE14 空载体转染的 COS 的条件培养基。

经过使用 BIAcore 分析转染的 COS 培养基中 TIE-2 受体特异性结合活性并经过用 TIE-2 受体融合体免疫染色表达 TL1-和 TL2- 的 COS 细胞证实 TL1 和 TL2 均特异性地结合 TIE-2 受体。

由于 TL2 不激活 TIE-2 受体，申请人着手测定是否 TL2 能用作 TL1 活性的拮抗剂。进行 HAEC 磷酸化试验，其中细胞先用过量 TL2 培养，接着加入稀释的 TL1 。由于高水平的 TL2 预先占据 TIE-2 受体可能防止与有限浓度的 TL1 接触后对受体的随后刺激。

按上面所述对半汇合的 HAEC 细胞进行血清饥饿，然后用 1 - 2ml 20 × COS/JFE14 - TL2 条件培养基 37℃培养 3 分钟。用 20 × COS/JFE14 培养基（ MOCK ）处理对照平板。从培养箱中取出平板，加入各种稀释度的 COS/JFE14-TL1 培养基，接着在 37℃进一步保温平板 5 - 7 分钟。随后漂洗细胞，溶胞并按上面所述以受体免疫沉淀和 Western 印迹检查溶胞产物中 TIE-2-特异性酪氨酸磷酸化。使用经过加入 20 × COS/单独 JFE14 培养基稀释成 2 ×， 0.5 ×， 0.1 ×，或 0.02 × 的 20 × COS/JFE14-TL1 培养基制备 TL1 稀释液。使用 BIAcore 生物传感器技术分析起始 20 × TL1 和 20 × TL2 COS 培养基表明它们含有相似量的 TIE-2 特异性结合活性，即 TL1 和 TL2 分别为 445R.U. 和 511R.U.。在图 8 中显示的抗磷酸酪氨酸 Werstern 印迹的结果表明与用 MOCK 培养基预处理 HAEC 细胞相比（泳道 1），用过量 TIE-2 配体 2 预处理 HAEC 细胞（泳道 2）拮抗随后的稀释的 TIE-2 配体 1 激活 TIE-2 受体（ TIE2-R ）的能力。

这些资料表明，与 TL1 不一样， TL2 不能刺激 HAEC 细胞中 TIE-2 受体激酶活性。而且，用高浓度的 TL2 预培养内皮细胞，接着加入 TL1 后抑制 TL1 刺激 TIE-2 受体的能力，表明 TL2 是 TIE-2 受体拮抗剂。

实施例 10 - 在条件培养基和 COS 细胞上清中鉴定 TIE-2-特异性结合活性

细胞子 C2C12 ras, Rat 2 ras, SHEP 和 T98G 的 10 × CCM 或用人 TIE-2 配体 1（ hTL1 ）或人 TIE-2 配体 2（ hTL2 ）转染后的 COS 细胞上清的结合活性用经表面胞质团共振（ SPR ）监测生物分子实时相互作用的生物传感器技术（ BIAcore; Pharmacia Biosensor, Piscataway. NJ ）测量。纯化的大鼠或人 TIE-2 RB 经伯胺共价偶联到 CM5 研究级传感器片（ Pharmacia Biosensor; Piscataway. NJ ）的羧甲基葡聚糖层上。使用 N - 羟基琥珀酰亚胺（ NHS ）和 N - 乙基-N′-（ 3 - 二甲基氨基丙基）碳二亚胺（ EDC ）的混合物激活传感器片表面，接着固定 TIE-2 RB(25μg/mL, pH4.5 ）并用 1.0M 乙醇胺（ ph8.5 ）灭活未反应的位点。一般来说， 9000 - 10000RU 的各受体融合体偶联到传感器片上。

系统中使用的流动缓冲液是 HBS （ 10mM Hepes, 150mM NaCl, 0.005% P20 表面活性剂， pH7.4 ）。 4℃离心样品 15 分钟，使用无菌的低蛋白结合 0.45μm 滤膜（ Millipore; Bedford, MA ）进一步澄清。向各

样品中加入葡聚糖（ 2mg/ml ）和 P20 表面活性剂（ 0.005% ）。 40μl 等份试样以 5μL/分的流速注射通过固相表面（ 大鼠或人 TIE-2 ）并监测受体结合 8 分钟。以在样品注射前 30s 测定的基线值和注射后 30s 的测量值之间的差异测定结合活性（ 共振单位， RU ）。有 3M $MgCl_2$ 的一次 15μl 脉冲实现该表面的再生。

在大鼠 TIE2 RB 固相表面试验 CCM 样品（ C2C12 ras, Rat 2 ras , SHEP,T98G ），在人 TIE2 RB 固相表面试验重组 hTL1 和 hTL2 。在每种情况下，经过在分析结合活性前将样品与 25μg/ml 可溶性 TIE-2 （ 大鼠或人） RB 或 trKB RB 保温评价对 TIE-2 受体融合体的特异性结合。如图 9 和 10 所示，加入可溶性 TrkB-RB 引起 TIE-2 结合活性轻微减小，而加入可溶性 TIE-2-RB 与缺乏 TIE-2 RB 的测量值相比明显减小结合活性。

实施例 11 - TIE-2 RB 特异性阻断 TIE-2 配体 1 对 TIE-2 受体的激活

申请人尝试测定可溶性 TIE-2 RB 是否能用作抑制 TIE-2 配体 1 （ TL1 ）激活 TIE-2 受体的竞争性抑制剂。为做到这点，将含 TL-1 的 COS 培养基与 TIE2 或 TrkB-RB 预培养，然后比较其激活自然存在于人内皮细胞系中的 TIE-2 受体的能力。

用单独的 pJFE14 表达载体（ MOCK ）或含人 TIE-2 配体 1cDNA （ TL1 ）的 pJFE14 载体转染 COS7 细胞并按上文实施例 9 所述收获来生产条件 COS 。培养基，除了培养基经无菌过滤但不浓缩之外。测定 TL1 的量并以 BIA core 结合试验中测定的 TIE-2 受体特异性结合活性的总量（ 共振单位， R.U. ）来表达。

Northern （ RNA ）分析揭示了在 HUVEC （人脐静脉内皮细胞）人原代内皮细胞（ Clonetics, Inc. ）中 TIE-2 转录子的明显水平。因此，这些细胞用于检查是否 TIE-2 受体在存在 TIE2-或 TrkB-RB 的条件下与含 TL1 的 COS 培养基接触时能进行酪氨酸磷酸化。 HUVEC 细胞在含 5% 胎牛血清，可溶性牛脑提取物， 10μg/ml 肝素， 10ng/ml 人 EGF, 1μg/ml 氢化可的松， 50μg/ml 庆大霉素和 50ng/ml 两性霉素 B 的完全内皮细胞生长培养基（ Clonetics, Inc. ）中 5 % $CO_2$ 下 37 ℃ 维持。按下面进行 TL1 是否能激活 HUVEC 细胞中 TIE-2 受体的评价。 HUVEC 细胞的汇合平皿在低葡萄糖 Dulbecco MEM 中 5 % $CO_2$ 下 37 ℃ 血清饥饿 2 到 4 小时，

接着在包括 0.1mM 正钒酸钠（磷酸酪氨酸磷酸化酶的有效抑制剂）的饥饿培养基中再培养 10 分钟。同时，条件 COS 培养基在室温下与加至 50μg/ml 的 TIE2-或 TrkB-RB 预培养 30 分钟。然后从 HUVEC 平皿中去掉饥饿培养基并用含 RB 的 COS 培养基在 37 ℃培养 7 分钟。HUVEC 细胞随后溶胞，经过用 TIE-2 肽抗血清免疫沉淀回收 TIE-2 受体蛋白质，接着用抗磷酸酪氨酸抗体进行 Western 印迹,如实施例 1 所述。结果在图 11 中显示。相对于用对照培养基（ MOCK ）所见，用 TIE-2 配体 1（ TL1 ）处理 HUVEC 细胞诱导 TIE-2 受体的磷酸酪氨酸水平，该诱导被用 TIE-2RB（ TIE2-Fc ）的预培养而不被用 TrkB-RB（ TrkB-Fc ）的培养特异性抑制。这些资料表明可溶性 TIE-2 RB 可用作抑制 TIE-2 配体 1 激活 TIE-2 受体的选择抑制剂。

实施例 12 - TIE-2 配体融合体的构建

构建一个表达构建体，它产生分泌型蛋白质，由人 TIE-2 配体 1（ TL1 ）的完整编码序列或与人免疫球蛋白γ-1 恒定区（ IgG1 Fc ）融合的 TIE-2 配体 2（ TL2 ）组成。这些融合蛋白质称为 TIE-2 “配体融合体”（ TL1 - Fc 或 TL2 - Fc ）。按下面制备 TL1 - Fc 和 TL2 - Fc 的 Fc 部分。用相应于人 IgG1 公开序列的寡核苷酸经 PCR 从人胎盘 cDNA 扩增编码跨越铰合区到羧基末端的人 IgG1 Fc 部分的 DNA 片段；所得的 DNA 片段被克隆进质粒载体。来自编码全长 TL1 或 TL2 的质粒或来自人 IgG1 Fc 质粒的合适的 DNA 限制性片段在来自短 PCR 片段的任一侧连接，设计成融合的，符合阅读框的 TL1 或 TL2 与人 IgG1 Fc 蛋白质的编码序列。

经过将 TL2-Fc DNA 片段克隆进 pVL1393 杆状病毒载体并随后感染草地夜蛾 SF-21AE 昆虫细胞系获得毫克量的 TL2-Fc 。另外，可使用细胞系 SF-9（ ATCC 保藏号 CRL-1711 ）或细胞系 BTI-TN-5b1-4 。编码 TL2-Fc 的 DNA 以 Eco R1-Not1 片段克隆进杆状病毒转移质粒 pVL1393 。经过将 3mg 质粒 DNA 与 0.5mg Baculo-Gold DNA（ Pharminigen ）混合将质粒 DNA 重组进病毒 DNA，接着使用 30mg Lipofectin ( GIBCO-BRL) 导入脂质体。将 DNA - 脂质体混合物加入在 TMN-FH 培养基（改良的 Grace's 昆虫细胞培养基（ GIBCO-BRL））中的 SF-21AE 细胞（ $2 \times 10^6$ 细胞/60mm 平皿）中 27 ℃保温 5 小时，接着在补充有 5 % 胎中血清的 TMN-FH 培养基中 27 ℃培养 5 天。收获组织培养基用于对重组病毒进行

噬斑纯化，使用前面所述的方法（ O'Reilly, D. R., L. K. Miller, and V.A. Luckow, 杆状病毒表达载体－实验手册， 1992, New York. W. H. Freeman ）进行该步骤，除了琼脂糖覆盖层含有 125mg/ml X-gal (5-溴－4－氯－3－吲哚－b－D－吡喃半乳糖苷， GIBCO-BRL)。27℃培养5天后，经过与 X-gal 底物的阳性生色反应计数非重组噬斑并标记其位置。然后经过加入含 100mg/mL MTT （ 3－[4, 5-二甲基噻唑－2－基]2, 5二苯基溴化四唑； Sigma) 的第二层观察重组噬斑。经栓塞吸出挑出推定的重组病毒噬斑，经多轮噬斑分离纯化以保证均一性。经系列低复数传代噬斑纯化的病毒产生病毒贮液。生长一个病毒克隆（ vTL2-Fc 克隆#7 ）的低传代种子。

在含 1X 抗生素/抗真菌剂溶液（ Gibco BRL ）和 25mg/L 庆大霉素（ Gibco BRL ）的无血清培养基（ SF-900II， Gibco BRL ）中培养 SF-21AE 细胞。加入 Pluronic F-68 作为表面活性剂至终浓度为 1g/L 。感染前在生物反应器（ Artisan Cell Station System )中培养培养物（ 4L ）至少 3 天。细胞在 27 ℃，通入 50 % 溶氧，气体流速为 80mL/分（在喷气环中通气）的条件下生长。借助于船用叶轮以 100 rpm 的速率搅拌。在对数生长中期（~2 × $10^6$ 细胞/mL ）收获细胞，经离心浓缩，用每细胞 5 个 vTL2-Fc 噬斑形成单位感染。细胞和接种物用新鲜培养基加至 400mL，在烧瓶中 27 ℃吸收病毒 2 小时。然后将培养物重悬于新鲜无血清培养基中至终体积 8L ，使用以前描述两条件在生物反应器中培养细胞。

感染 72 小时后经离心（ 500 × g， 10 分钟）收集 vTL2-Fc-感染的 SF21AE 细胞的细胞培养基。细胞上清用 NaOH 调成 pH8 。加 EDTA 至终浓度为 10mM，将上清 pH 重调成 8 。过滤（ 0.45mm， Millipore ）上清并上样到蛋白质 A 柱（蛋白质 A 琼脂糖 4 快速流动或 HiTrap 蛋白质 A，均来自 Pharmacia ）。用含 0.5M NaCl 的 PBS 洗柱至 280nm 处吸光率减至基线。在 PBS 中洗柱并用 0.5M 乙酸洗脱。经过洗脱进含 1M Tris pH9 的管中立即中和柱级分。合并含 TL2-Fc 的峰值级分并用 PBS 透析。

保藏

下面按布达佩斯条约在美国典型培养物保藏中心， Parklawn Drive 12301, Rockville, Maryland 20852 进行了保藏。编码 TIE-2 配体的质粒克隆于 1994 年 10 月 7 日保藏在 ATCC ，命名为“编码 TIE-2 配体的

pJFE14”， ATCC 保藏号 75910。编码 TIE-2 受体融合体的重组苜蓿银纹夜蛾杆状病毒于 1994 年 10 月 7 日保藏，命名为“ vTIE-2 受体融合体”， ATCC 保藏号： VR2484。含人 tie-2 配体 DNA 的λ噬菌体载体于 1994 年 10 月 26 日保藏在 TACC，命名为编码 htie-2 配体 1 的λgt10，ATCC 保藏号 75928。编码第二种 TIE-2 配体的质粒克隆于 1994 年 12 月 9 日保藏在 ATCC，命名为“编码人 TIE-2 配体 2 的 pBluescript KS”，ATCC 保藏号 75963。

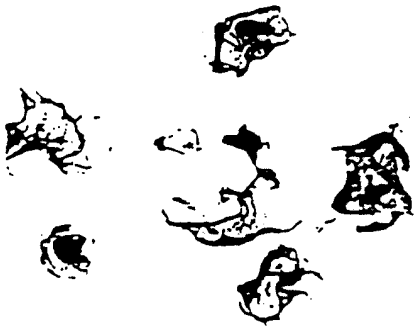
本发明范围不受本文所述具体实施方案的限制。事实上，除了上文所述外，对本发明的各种修改对本领域的技术人员而言从上面说明书和附图来看是显而易见的。这些修改试图落入所附权利要求的范围内。

图 1 A



r EHK-1 ecto / h IgG1 Fc
Gelfoam ( 6 ug)

图 1 B



r TIE-2 ecto / h IgG1 Fc
Gelfoam ( 6 ug)

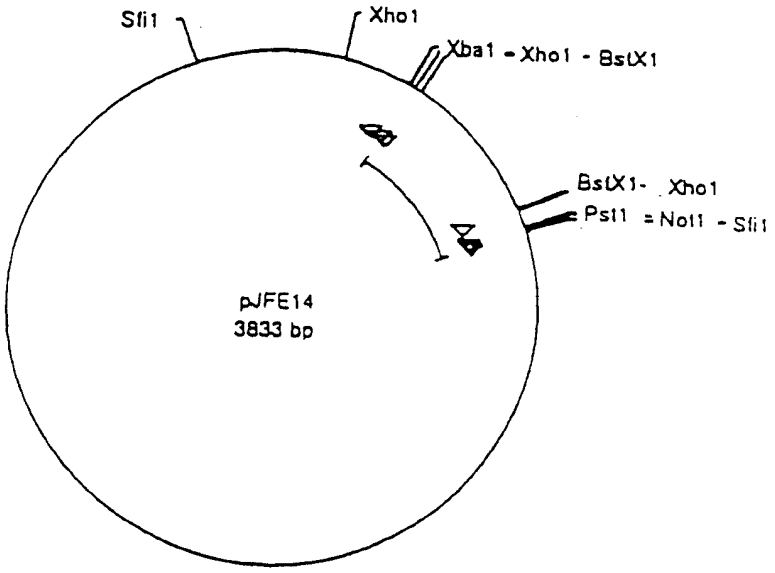

Sfi1
Xho1
Xba1 - Xho1 - BstX1
BstX1- Xho1
Pst1 - Not1 - Sfi1
pJFE14
3833 bp

图 2

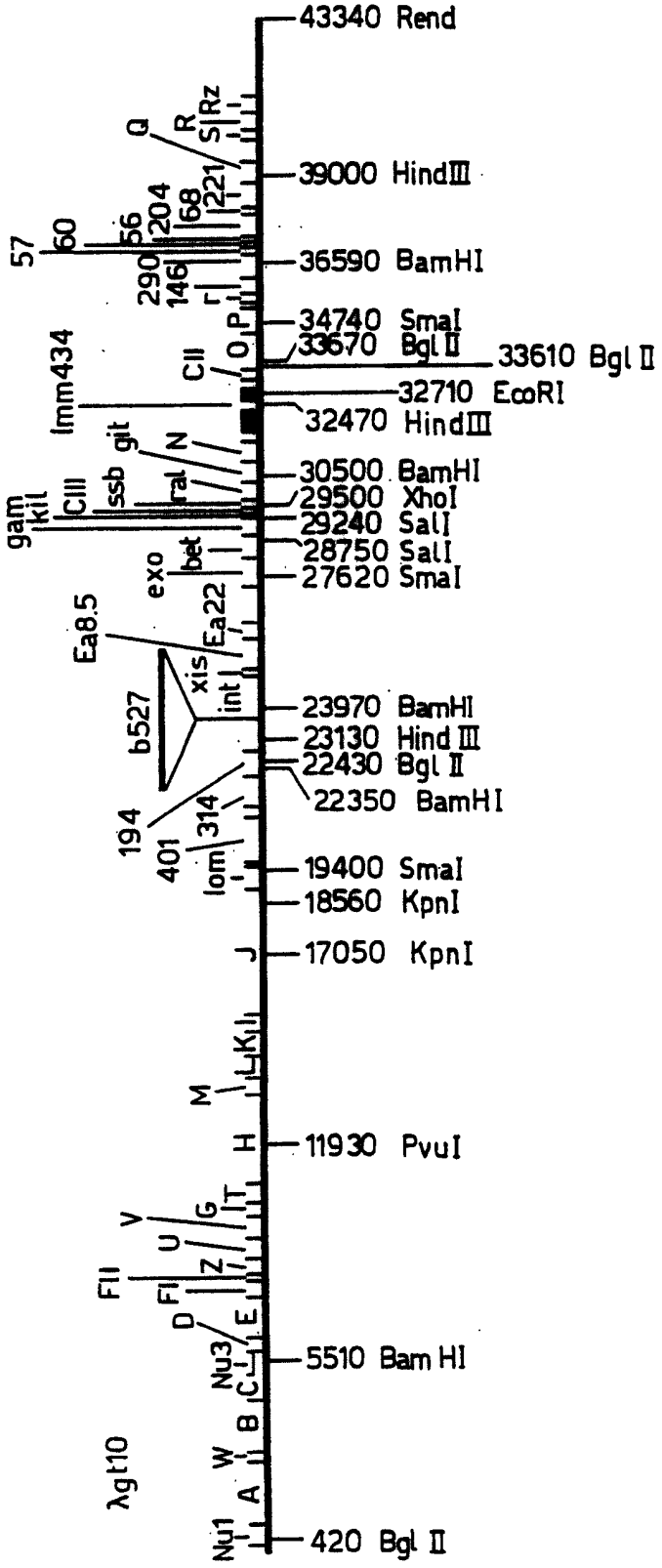

43340 Rend
39000 HindIII
36590 BamHI
34740 SmaI
33670 BglII
33610 BglII
32710 EcoRI
32470 HindIII
30500 BamHI
29500 XhoI
29240 SalI
28750 SalI
27620 SmaI
23970 BamHI
23130 HindIII
22430 BglII
22350 BamHI
19400 SmaI
18560 KpnI
17050 KpnI
11930 PvuI
5510 BamHI
420 BglII
λgt10
Nu1
Nu3
imm434
cIII
gam
kil
ssb
ral
git
exo
bet
xis
int
b527
Ea8.5
Ea22
cII
O
P
Q
R
S
Rz
FII
FI
D
E
C
B
A
W
V
U
Z
T
G
M
H
J
Kil
lom
314
401
194
221
204
68
56
60
57
290
146
r

图 3

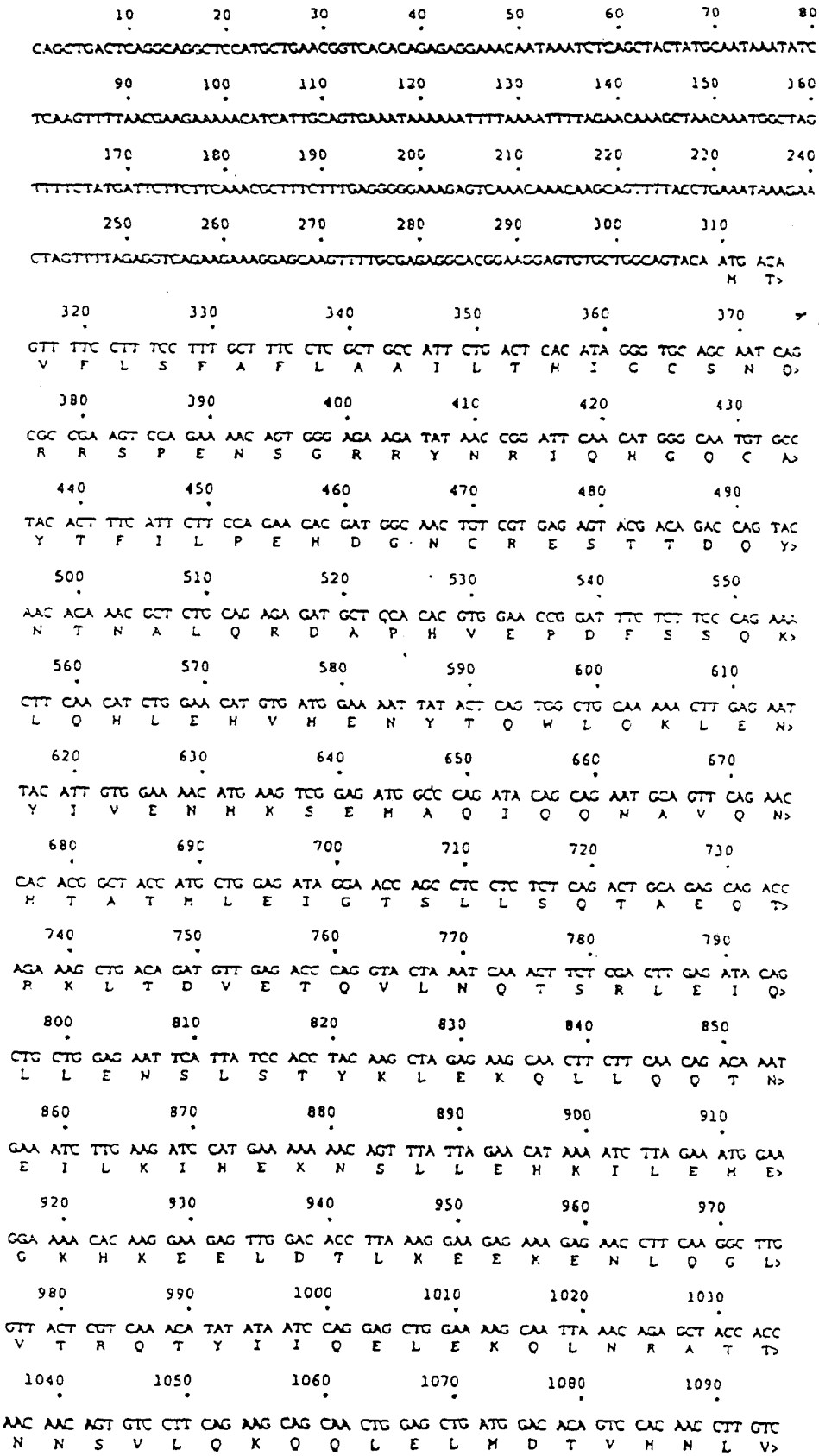


图 4

FIGURE 4 (cont'd)

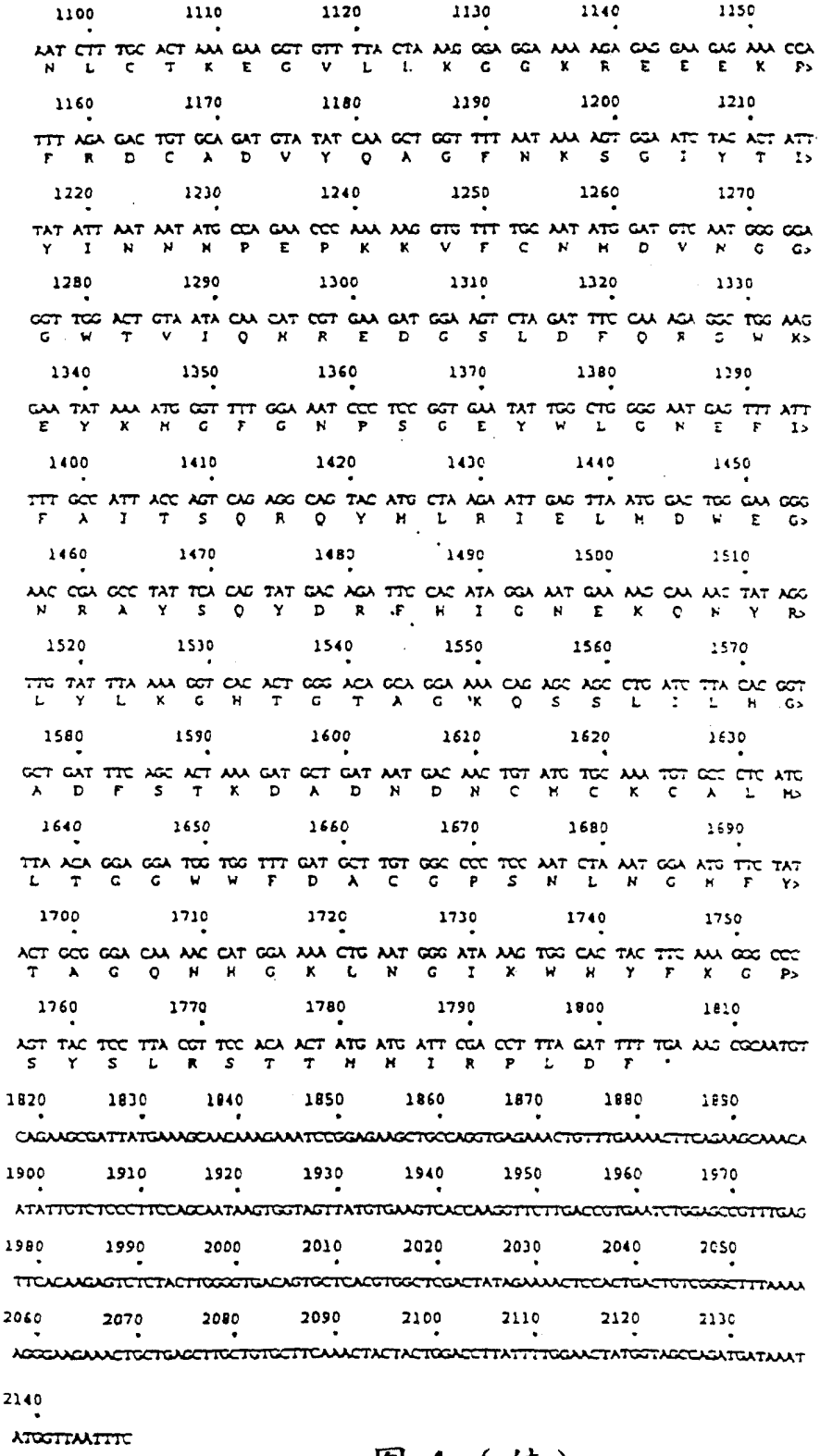


图 4（续）

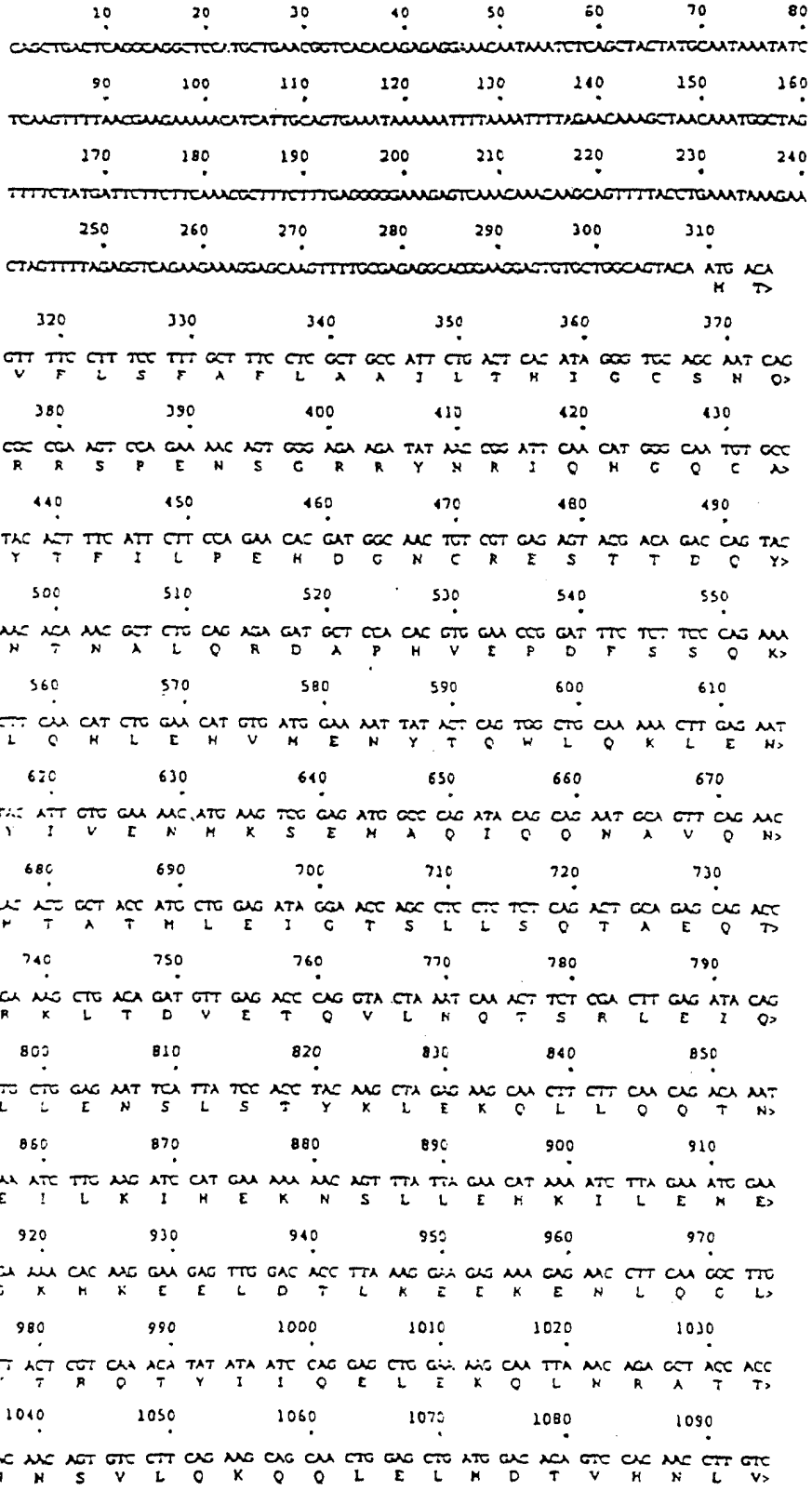


图 5

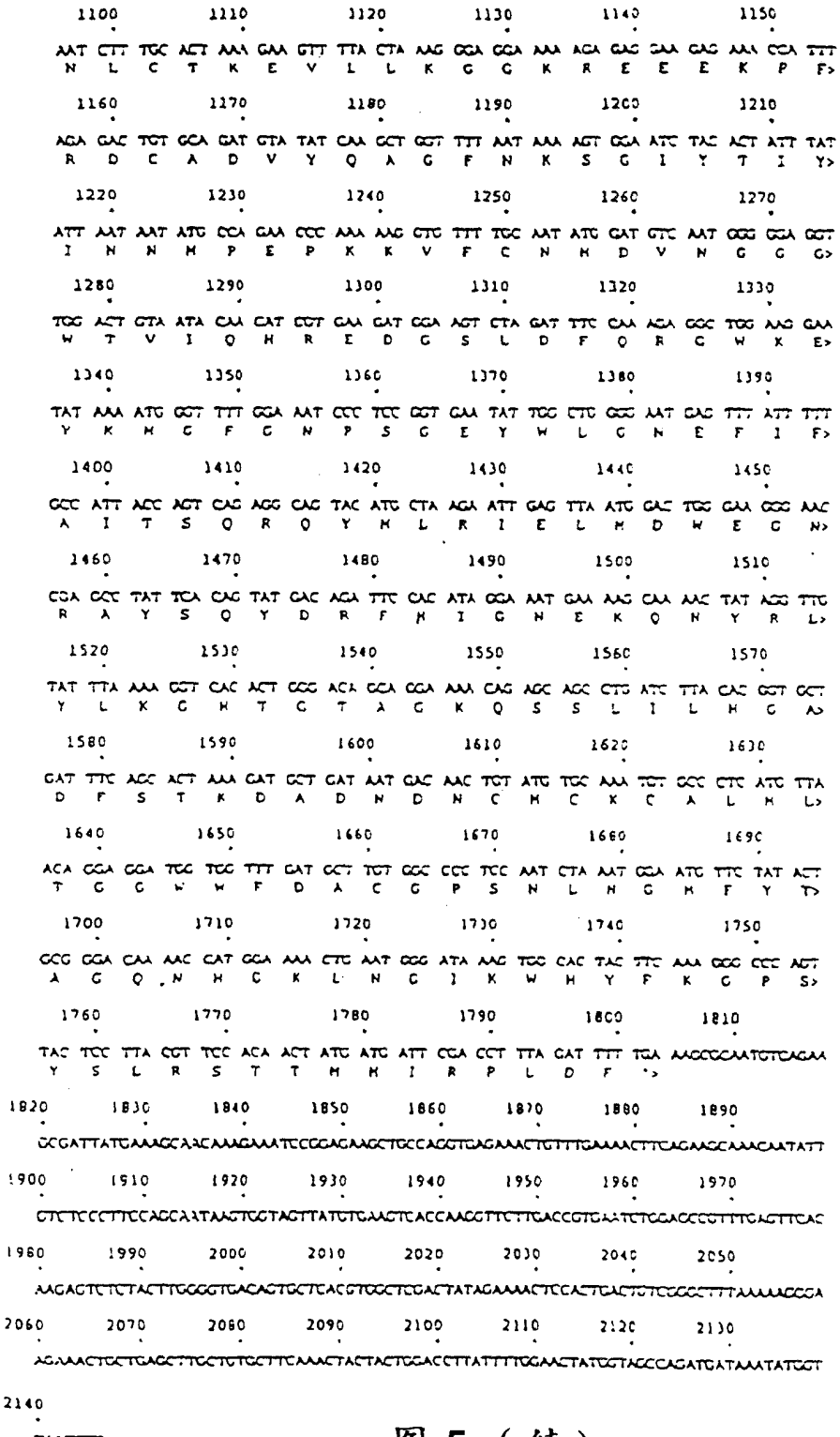


图 5（续）

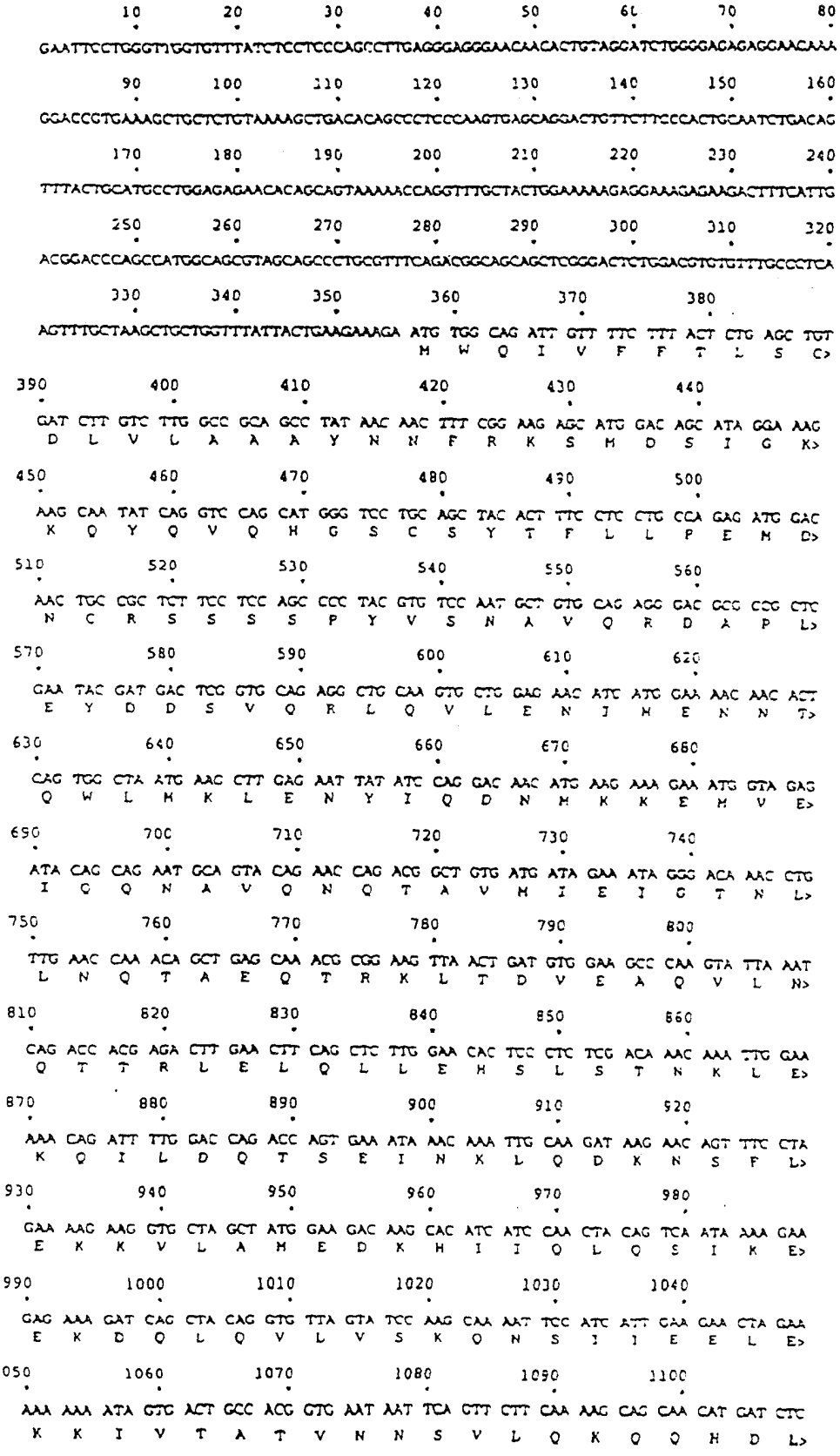


图 6

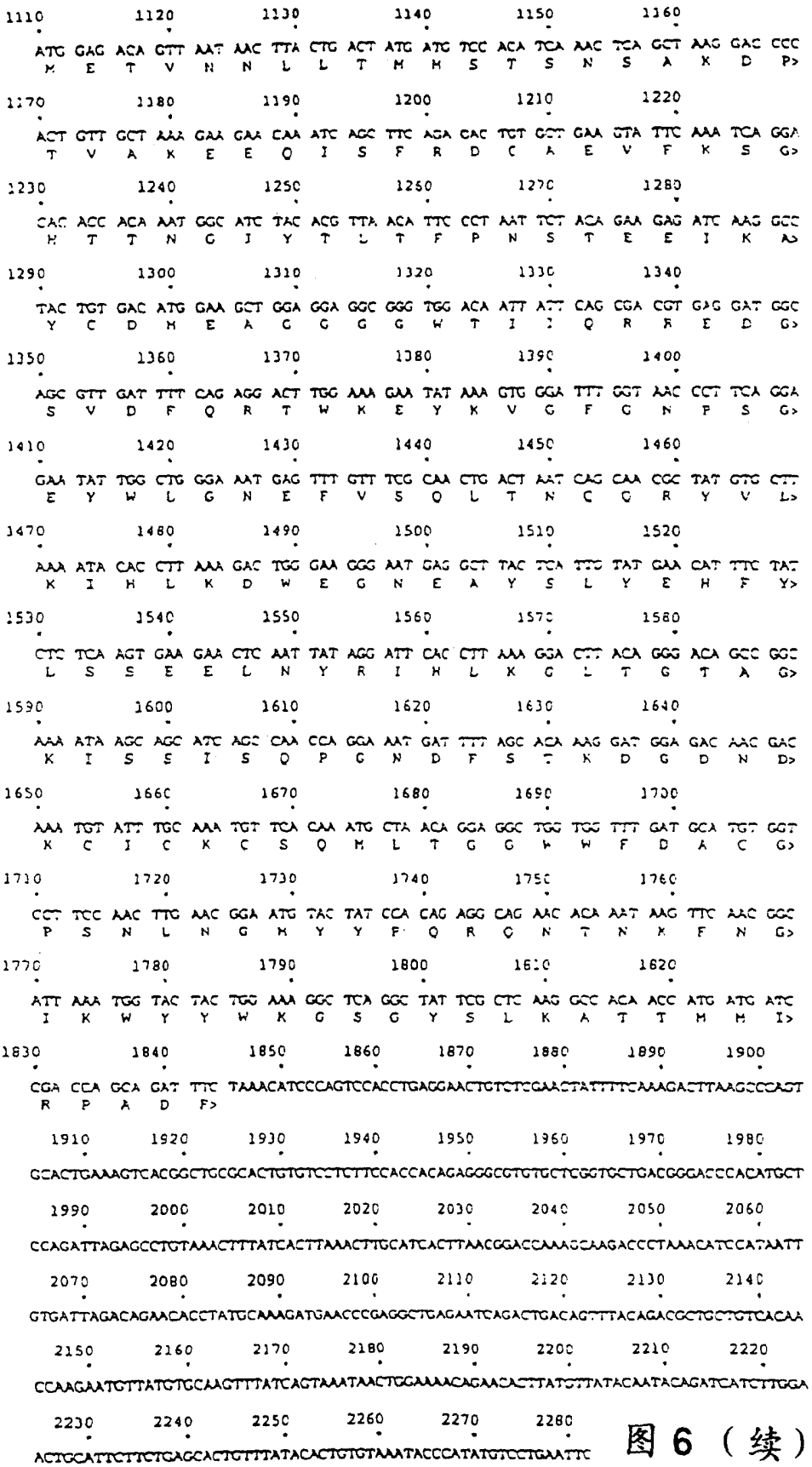

1110 1120 1130 1140 1150 1160
ATG GAG ACA GTT AAT AAC TTA CTG ACT ATG ATG TCC ACA TCA AAC TCA GCT AAG GAC CCC
M E T V N N L L T M M S T S N S A K D P>
1170 1180 1190 1200 1210 1220
ACT GTT GCT AAA GAA GAA CAA ATC AGC TTC AGA GAC TGT GCT GAA GTA TTC AAA TCA GGA
T V A K E E Q I S F R D C A E V F K S G>
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 M 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 M 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 M I>
1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900
CGA CCA GCA GAT TTC TAAACATCCCAGTCCACCTGAGGAACTGTCTCGAACTATTTTCAAAGACTTAAGCCCAGT
R P A D F>
1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980
GCACTGAAAGTCACGGCTGCGCACTGTGTCCTCTTCCACCACAGAGGGCGTGTGCTCGGTGCTGACGGGACCCACATGCT
1990 2000 2010 2020 2030 2040 2050 2060
CCAGATTAGAGCCTGTAAACTTTATCACTTAAACTTGCATCACTTAACGGACCAAAGCAAGACCCTAAACATCCATAATT
2070 2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140
GTGATTAGACAGAACACCTATGCAAAGATGAACCCGAGGCTGAGAATCAGACTGACAGTTTACAGACGCTGCTGTCACAA
2150 2160 2170 2180 2190 2200 2210 2220
CCAAGAATGTTATGTGCAAGTTTATCAGTAAATAACTGGAAAACAGAACACTTATGTTATACAATACAGATCATCTTGGA
2230 2240 2250 2260 2270 2280
ACTGCATTCTTCTGAGCACTGTTTATACACTGTGTAAATACCCATATGTCCTGAATTC

图 6（续）

图 7

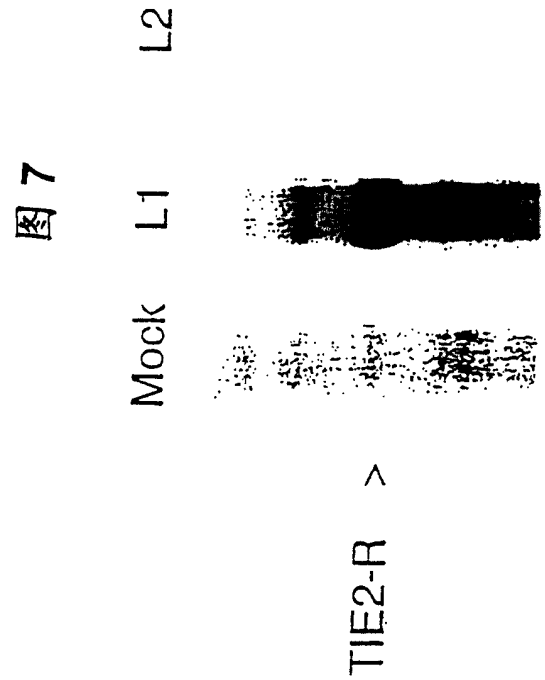
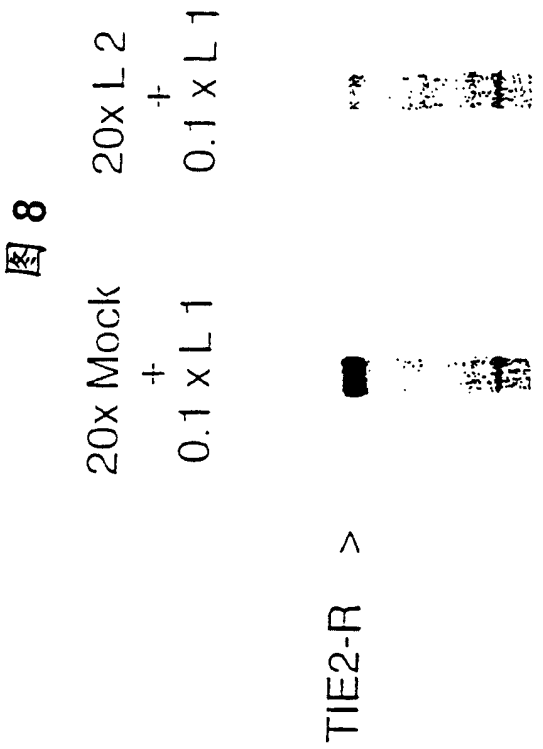
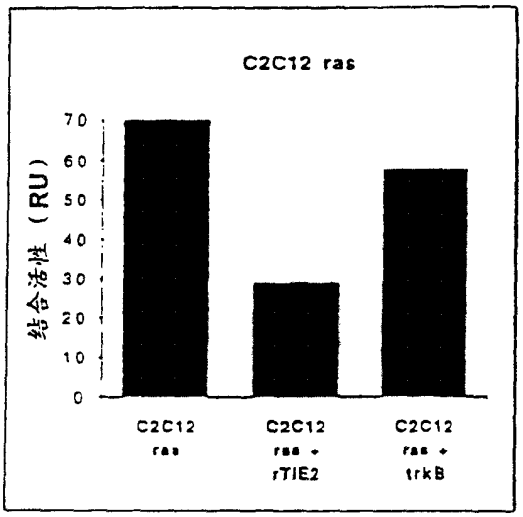
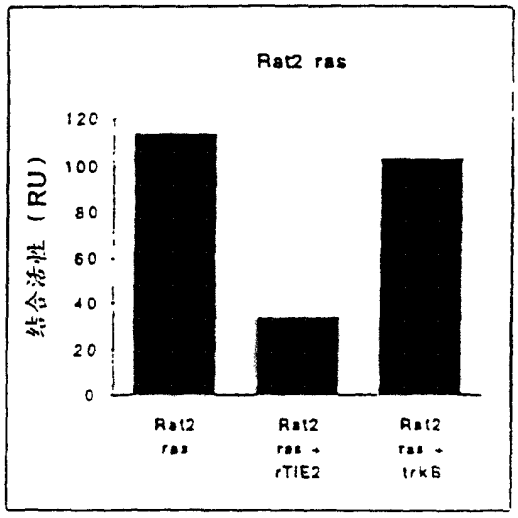
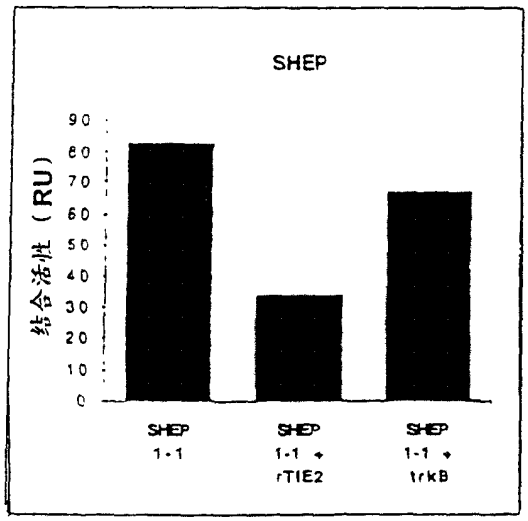


图 8




C2C12 ras
结合活性（RU）
70
60
50
40
30
20
10
0
C2C12 ras
C2C12 ras + rTIE2
C2C12 ras + trkB


Rat2 ras
结合活性（RU）
120
100
80
60
40
20
0
Rat2 ras
Rat2 ras + rTIE2
Rat2 ras + trkB


SHEP
结合活性（RU）
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
SHEP 1-1
SHEP 1-1 + rTIE2
SHEP 1-1 + trkB

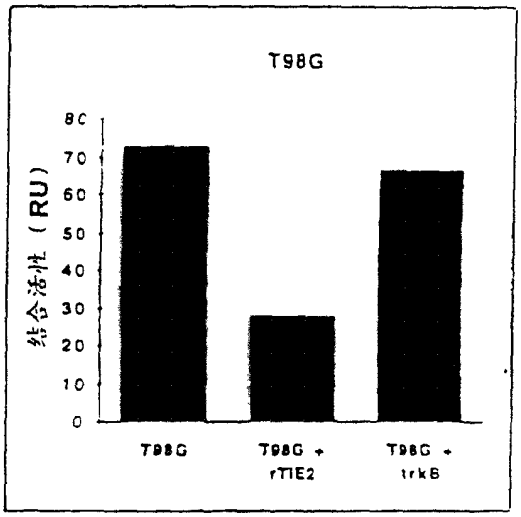
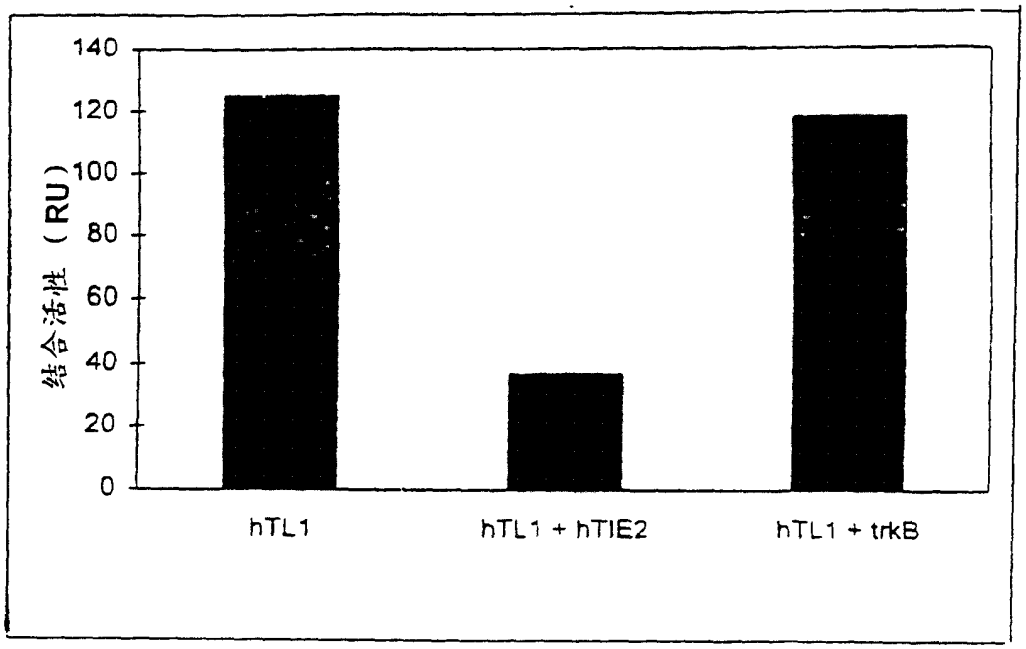

T98G
结合活性（RU）
80
70
60
50
40
30
20
10
0
T98G
T98G + rTIE2
T98G + trkB

图 9


140
120
100
80
60
40
20
0
结合活性（RU）
hTL1
hTL1 + hTIE2
hTL1 + trkB

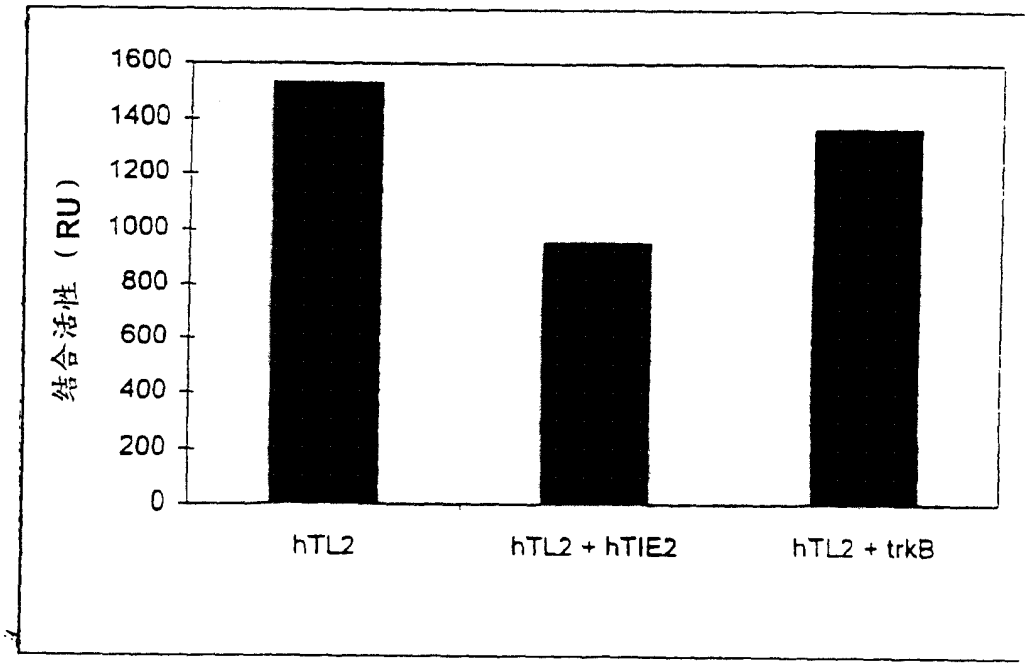

1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
结合活性（RU）
hTL2
hTL2 + hTIE2
hTL2 + trkB

图 10

图 11

