(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 33 121 T2** 2005.07.28

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 821 728 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 33 121.7**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US96/04806**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 910 769.7**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/031598**
(86) PCT-Anmeldetag: **05.04.1996**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **10.10.1996**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **04.02.1998**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **11.08.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **28.07.2005**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 15/00**
C12N 1/20, C07K 14/52, C07K 19/00, A61K 38/19

(30) Unionspriorität:

418595	**06.04.1995**	**US**
PCT/US95/12935	**06.10.1995**	**WO**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Regeneron Pharmaceuticals, Inc., Tarrytown, N.Y., US

(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

(72) Erfinder:
DAVIS, Samuel, New York, US; BRUNO, Joanne, Bloomingdale, US; GOLDFARB, Mitchell, River Edge, US; ALDRICH, H., Thomas, Ossining, US; MAISONPIERRE, C., Peter, Croton, US; RADZIEJEWSKI, Czeslaw, North White Plains, US; JONES, F., Pamela, Fairfield, US; YANCOPOULOS, D., George, Yorktown Heigths, US

(54) Bezeichnung: **TIE-2 LIGANDEN, HERSTELLUNGSVERFAHREN UND VERWENDUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

EINFÜHRUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft generell das Gebiet der Gentechnik und spezieller die Gene für Rezeptortyrosinkinasen und ihre verwandten Liganden, ihre Inserierung in rekombinante DNA-Vektoren und die Produktion der codierten Proteine in Wirtsstämmen von Mikroorganismen und eukaryontischen Wirtszellen. Spezifischer betrifft die Erfindung neue Liganden, bekannt als TIE-2-Liganden, die den TIE-2-Rezeptor binden, ebenso wie Verfahren für die Herstellung und Verwendung der TIE-2-Liganden. Die Erfindung stellt weiterhin Nucleinsäuresequenzen bereit, die TIE-2-Liganden codieren, und Verfahren für die Herstellung von Nucleinsäuren, die TIE-2-Liganden codieren, und ihre Genprodukte. Die TIE-2-Liganden ebenso wie die Nucleinsäuren, die sie codieren, können bei der Diagnose und Behandlung gewisser Krankheiten von Nutzen sein, die Endothelzellen und die assoziierten TIE-Rezeptoren betreffen, wie neoplastische Krankheiten, die Tumorangiogenese umfassen, die Wundheilung, thromboembolische Krankheiten, die Atherosclerose und Entzündungskrankheiten. Außerdem können die Liganden zur Förderung der Proliferation und/oder Differenzierung von hämatopoietischen Stammzellen verwendet werden.

[0002] Allgemeiner können biologisch aktive TIE-2-Liganden verwendet werden, um das Wachstum, das Überleben, die Wanderung und/oder Differenzierung und/oder Stabilisierung oder Destabilisierung von Zellen zu fördern, die den TIE-2-Rezeptor exprimieren. Biologisch aktive TIE-2-Liganden können für die in vitro-Erhaltung von Zellen in Kultur verwendet werden, die den TIE-2-Rezeptor exprimieren. Zellen und Gewebe, die den TIE-2-Rezeptor exprimieren, umfassen zum Beispiel Endothelzellen des Herzens und der Gefäße, Linsenepithel- und Herzepicardiumzellen und frühe hämatopoietische Zellen. Alternativ können solche Liganden zur Unterstützung von Zellen verwendet werden, die gentechnisch so verändert wurden, daß sie den TIE-2-Rezeptor exprimieren. Weiterhin können die TIE-2-Liganden und ihre verwandten Rezeptoren in Testsystemen zur Identifizierung von Agonisten oder Antagonisten des TIE-2-Rezeptors verwendet werden.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0003] Das zelluläre Verhalten, das für die Entwicklung, Erhaltung und Reparatur von differenzierten Zellen und Geweben verantwortlich ist, wird zum großen Teil von interzellulären Signalen reguliert, die über Wachstumsfaktoren und ähnliche Liganden und ihre Rezeptoren übermittelt werden. Die Rezeptoren liegen auf der Zelloberfläche der reagierenden Zellen und sie binden Peptide oder Polypeptide, die als Wachstumsfaktoren bekannt sind, ebenso wie andere hormonähnliche Liganden. Das Ergebnis dieser Wechselwirkung sind rasche biochemische Veränderungen in den reagierenden Zellen ebenso wie schnelle und langfristige Anpassungen der zellulären Genexpression. Mehrere Rezeptoren, die mit verschiedenen Zelloberflächen assoziiert sind, können spezifische Wachstumsfaktoren binden.

[0004] Die Phosphorylierung von Tyrosinresten in Proteinen durch Tyrosinkinasen ist einer der entscheidenden Wege, durch den Signale über die Plasmamembran übermittelt werden. Mehrere gegenwärtig bekannte Proteintyrosinkinasegene codieren Transmembranrezeptoren für Polypeptidwachstumsfaktoren und Hormone wie den epidermalen Wachstumfaktor (EGF), Insulin, Insulin-ähnlichen Wachstumfaktor-I (IGF-I), von Blutplättchen abgeleitete Wachstumfaktoren (PDGF-A und -B) und Fibroblastenwachstumfaktoren (FGFs). (Heldin et al., Cell Regulation, 1: 555–566 (1990); Ullrich et al., Cell, 61: 243–54 (1990)). In jedem Fall üben diese Wachstumsfaktoren ihre Wirkung durch Bindung an den extrazellulären Teil ihres verwandten Rezeptors aus, was zur Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinase führt, die am cytoplasmischen Teil des Rezeptors vorhanden ist. Wachstumsfaktorrezeptoren von Endothelzellen sind wegen der möglichen Rolle von Wachstumsfaktoren bei mehreren wichtigen physiologischen und pathologischen Prozessen von besonderem Interesse, wie der Vasculogenese, der Angiogenese, der Atherosclerose und Entzündungskrankheiten. (Folkman, et al., Science, 235: 442–447 (1987)). Auch die Rezeptoren für mehrere hämatopoietische Wachstumsfaktoren sind Tyrosinkinasen; diese umfassen c-fms, welches der Rezeptor für den Kolonie-stimulierenden Faktor 1 ist, Sherr et al., Cell, 41: 665–676 (1985), und c-kit, einen primitiven Rezeptor für hämatopoietische Wachstumsfaktoren, über den in Huang, et al., Cell, 63: 225–33 (1990) berichtet wird.

[0005] Die Rezeptortyrosinkinasen wurden aufgrund der charakteristischen Struktur ihrer Ectodomänen in evolutionäre Unterfamilien aufgeteilt. Ullrich et al., Cell, 61: 243–54 (1990)). Solche Unterfamilien umfassen die EGF-Rezeptor-ähnliche Kinase (Unterklasse I) und die Insulin-Rezeptor-ähnliche Kinase (Unterklasse II), von denen jede in ihrer extrazellulären Domäne wiederholte homologe Cystein-reiche Sequenzen enthält. Eine einzelne Cystein-reiche Region wird auch in der extrazellulären Domäne der eph-ähnlichen Kinasen gefunden. Hirai, et al., Science, 238: 1717–1720 (1987); Lindberg et al., Mol. Cell. Biol., 10: 6316–24 (1990); Lhotak, et al., Mol. Cell. Biol., 11: 2496–2502 (1991). PDGF-Rezeptoren ebenso wie c-fms- und c-kit-Rezeptortyrosinkinasen können in die Unterklasse III eingeteilt werden; während die FGF-Rezeptoren die Unterklasse IV bilden. Typisch für die Mitglieder dieser beiden Unter-

klassen sind extrazelluläre Faltungseinheiten, die durch Disulfidbindungen innerhalb der Kette stabilisiert werden. Diese sogenannten Immunglobulin(Ig)-ähnlichen Faltungen werden in den Proteinen der Immunglobulin-Superfamilie gefunden, die eine große Vielzahl von anderen Zelloberflächenrezeptoren enthält, die entweder zellgebundene oder lösliche Liganden haben. Williams, et al., Ann. Rev. Immunol., 6: 381–405 (1988).

[0006] Rezeptortyrosinkinasen unterscheiden sich in ihrer Spezifität und Affinität. Im Allgemeinen sind Rezeptortyrosinkinasen Glycoproteine, die aus (1) einer extrazellulären Domäne, die in der Lage ist, den/die spezifischen Wachstumsfaktor(en) zu binden; (2) einer Transmembran-Domäne, die üblicherweise ein alpha-helikaler Teil des Proteins ist; (3) einer Domäne neben der Membran-Domäne, wo der Rezeptor durch z. B. Proteinphosphorylierung reguliert sein kann; (4) einer Tyrosinkinase-Domäne, die die enzymatische Komponente des Rezeptors ist; und (5) einem carboxyterminalen Schwanz bestehen, der bei vielen Rezeptoren in die Erkennung und Bindung der Substrate für die Tyrosinkinase involviert ist.

[0007] Es wurde berichtet, daß Prozesse wie das alternative Exon-Splicing und die Auswahl von alternativen Genpromotoren oder Polyadenylierungsstellen in der Lage sind, mehrere verschiedene Polypeptide von demselben Gen zu produzieren. Diese Polypeptide können die verschiedenen, vorstehend aufgelisteten Domänen enthalten oder auch nicht. Als Konsequenz können einige extrazelluläre Domänen als separate, sezernierte Proteine exprimiert werden und einigen Formen des Rezeptors kann die Tyrosinkinase-Domäne fehlen und sie können nur die extrazelluläre Domäne enthalten, die mittels der Transmembran-Domäne in die Plasmamembran insertiert ist, plus einem kurzen carboxyterminalen Schwanz.

[0008] Ein Gen, das eine Endothezell-Transmembran-Tyrosinkinase codiert, ursprünglich mittels RT-PCR als ein unbekanntes Tyrosinkinase-homologes cDNA-Fragment aus menschlichen Leukämiezellen identifiziert, wurde von Partanen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 8913–8917 (1990) beschrieben. Das Gen und sein codiertes Protein werden als "TIE" bezeichnet, was eine Abkürzung für "Tyrosinkinase mit Ig- und EGF-Homologiedomänen" ist. Partanen et al. Mol. Cell. Biol. 12: 1689–1707 (1992).

[0009] Es wurde berichtet, daß tie-mRNA in allen menschlichen fötalen Geweben und allen embryonalen Geweben der Maus anwesend ist. Bei der Untersuchung wurde die tie-Botschaft in Endothelzellen des Herzens und in vaskulären Endothelzellen lokalisiert. Spezifisch wurde die tie-mRNA im Endothel von Blutgefäßen und Endocardium von Mäuseembryos von 9,5 bis 18,5 Tagen lokalisiert. Eine erhöhte tie-Expression wurde während der Neuvaskularisierung gezeigt, die mit der Entwicklung der Eierstockfollikel und von Granulationsgewebe in Hautwunden assoziiert ist. Korhonen et al., Blood 80: 2548–2555 (1992). Es wurde somit vorgeschlagen, daß die TIEs eine Rolle bei der Angiogenese spielen, was wichtig ist für die Entwicklung von Behandlungen für solide Tumore und mehrere andere von der Angiogenese abhängige Krankheiten wie der diabetischen Retinopathie, der Psoriasis, der Atherosclerose und der Arthritis.

[0010] Es wurde berichtet, daß zwei strukturell verwandte TIE-Rezeptorproteine der Ratte von verschiedenen Genen mit verwandten Expressionsprofilen codiert werden. Ein Gen, das als tie-1 bezeichnet wird, ist das Rattenhomologe des menschlichen tie. Maisonpierre, et al., Oncogene 8: 1631–1637 (1993). Das andere Gen, tie-2, kann das Rattenhomologe des tek-Gens der Maus sein, von dem berichtet wird, daß es, wie tie, in der Maus ausschließlich in Endothelzellen und ihren vermutlichen Vorläufern exprimiert wird. Dumont et al., Oncogene 8: 1293–1301 (1993). Das menschliche Homologe von tie-2 ist in Ziegler, US-Patent Nr. 5,447,860 beschrieben, das am 5. September 1995 erteilt wurde (wo es als "ork" bezeichnet wurde).

[0011] Von beiden Gene wurde gezeigt, daß sie verbreitet in Endothelzellen von embryonalem Gewebe und Gewebe nach der Geburt exprimiert werden. Signifikante Niveaus an tie-2-Transkripten waren auch in anderen Populationen von embryonalen Zellen vorhanden, einschließlich Linsenepithel, Herzepicardium und Bereiche von Mesenchym. Maisonpierre, et al., Oncogene 8: 1631–1637 (1993).

[0012] Die vorherrschende Expression des TIE-Rezeptors in vaskulärem Endothel legt nahe, daß die TIEs bei der Entwicklung und Erhaltung des vaskulären Systems eine Rolle spielen.

[0013] Dies könnte Rollen bei der Endothelzelldeterminierung, der Proliferation, der Differenzierung und der Zellwanderung und der Musterbildung in vaskuläre Elemente einschließen. Die Analyse von Mäuseembryos, die bei TIE-2 defizient sind, zeigt seine Bedeutung bei der Angiogenese, insbesondere für die Bildung des vaskulären Netzwerks bei Endothelzellen. Sato, T. N., et al., Nature 376: 70–74 (1995). Im reifen vaskulären System könnten die TIEs beim Überleben, der Erhaltung und der Reaktion auf pathogene Einflüsse von Endothelzellen eine Rolle spielen.

[0014] Die TIE-Rezeptoren werden auch in primitiven hämatopoietischen Stammzellen, B-Zellen und einer Untergruppe von megakaryontischen Zellen exprimiert, was eine Rolle der Liganden, die diese Re-

zeptoren binden, bei der frühen Hämatopoiese, der Differenzierung und/oder Proliferation von B-Zellen und bei der Differenzierung von Megakaryonten nahe legt. Iwama, et al. Biochem. Biophys Research Communications 195: 301–309 (1993); Hashiyama, et al. Blood 87: 93–101 (1996); Batard, et al. Blood 87: 2212–2220 (1996).

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0015] Die Erfindung stellt ein isoliertes Nucleinsäuremolekül bereit, welches die Fibrinogen-ähnliche Domäne eines TIE-2-Liganden und nicht die superspiralisierte Domäne codiert, wobei das Molekül im Wesentlichen aus einer Nucleotidsequenz besteht, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus:

(a) der Nucleotidsequenz, die die Fibrinogen-ähnliche Domäne des in Fig. 4, Fig. 5 oder Fig. 6 dargestellten menschlichen TIE-2-Liganden codiert; und

(b) einer Nucleotidsequenz, welche sich von (a) aufgrund der Degeneration des genetischen Codes unterscheidet.

[0016] Die isolierte Nucleinsäure kann DNA, cDNA oder RNA sein. Die Erfindung stellt auch einen Vektor bereit, der ein solches Nucleinsäuremolekül umfaßt. Die vorliegende Erfindung stellt auch ein Polypeptid bereit, das von einem solchen Nucleinsäuremolekül codiert ist, vorzugsweise im Wesentlichen frei von anderen Proteinen. Die Erfindung stellt weiterhin ein Wirts-Vektor-System für die Produktion eines Polypeptids der Erfindung in einer geeigneten Wirtszelle bereit. Die geeignete Wirtszelle kann bakteriell, eine Hefe, eine Insektenzelle oder eine Säugerzelle sein. Die Erfindung stellt auch ein Verfahren für die Produktion eines Polypeptids der Erfindung bereit, welches das Züchten von Zellen des Wirts-Vektor-System unter Bedingungen umfaßt, welche die Produktion des Polypeptid und die Gewinnung des so produzierten Polypeptids erlauben.

[0017] Die Erfindung stellt weiterhin Arzneimittel bereit, die ein Polypeptid der Erfindung in einem pharmazeutisch verträglichen Träger umfassen.

[0018] Die Erfindung stellt auch einen Antikörper bereit, der spezifisch ein Polypeptid der Erfindung bindet. Der Antikörper kann monoclonal oder polyclonal sein. Somit stellt die Erfindung weiterhin ein Arzneimittel bereit, das solch einen Antikörper umfaßt.

[0019] Alternativ stellt die Erfindung bereit, daß ein TIE-2-Ligand mit einem cytotoxischen Mittel konjugiert sein kann, und ein daraus hergestelltes Arzneimittel.

[0020] Die Erfindung stellt noch des weiteren einen Ligandenkörper bereit, der im Wesentlichen aus der Fibrinogen-ähnlichen Domäne des menschlichen TIE-2-Liganden, wie sie in Fig. 4, Fig. 5 oder Fig. 6 dargestellt ist, oder einem Konjugat davon mit einem cytotoxischen Mittel besteht, fusioniert mit einer konstanten Region eines Immunglobulins.

[0021] Die Erfindung stellt noch des weiteren Polypeptide, Konjugate, Antikörper, Arzneimittel und Ligandenkörper der Erfindung bei der Herstellung eines Medikaments für die Verwendung bei einem Verfahren der Behandlung eines Menschen oder Tieres oder bei einem diagnostischen Verfahren bereit. Solche Polypeptide können insbesondere für die Blockade des Wachstums von Blutgefäßen in einem Säuger verwendet werden und bei der Verlangsamung oder Verhinderung des Tumorwachstums.

[0022] Die Erfindung stellt weiterhin ein Verfahren für die Identifikation eines TIE-2-Rezeptor-Antagonisten bereit, welches das Inkontaktbringen des TIE-2-Rezeptors mit einer Testverbindung in der Gegenwart eines Polypeptids gemäß der Erfindung unter Bedingungen, die die Bindung des Polypeptids an den Rezeptor erlauben, und die Bestimmung, ob die Testverbindung in der Lage ist, in die Bindung des Polypeptids an den Rezeptor einzugreifen, umfaßt.

KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0023] Fig. 1A und Fig. 1B – Der TIE-2-Rezeptorkörper (TIE-2 RB) inhibiert die Entwicklung von Blutgefäßen in der embryonalen Chorioallantois-Membran des Huhns (CAM). Ein einziges Stück von resorbierbarem Gelatineschaum (Gelfoam), das mit 6 µg RB getränkt war, wurde unmittelbar unter die CAM von 1 Tag alten Hühnchenembryos inseriert. Nach 3 weiteren Tagen Inkubation wurde die 4 Tage alten Embryos und die umgebende CAM entfernt und untersucht. Fig. 1A: mit EHK-1 RB (rEHK-1 ecto/h IgG1 Fc) behandelte Embryos waren lebensfähig und besaßen normal entwickelte Blutgefäße in der umgebenden CAM. Fig. 1B: alle mit TIE-2 RB (r TIE-2 ecto/h IgG1 Fc) behandelten Embryos waren tot, von reduzierter Größe und es fehlten ihnen fast völlig die umgebenden Blutgefäße.

[0024] Fig. 2 – Vektor pJFE14.

[0025] Fig. 3 – Restriktionskarte von λgt10.

[0026] Fig. 4 – Nucleinsäure- und abgeleitete Aminosäure (Einzelbuchstabencode)sequenz von menschlichem TIE-2-Ligand 1 vom Clon λgt10, der htie-2-Ligand 1 codiert.

[0027] Fig. 5 – Nucleinsäure- und abgeleitete Aminosäure (Einzelbuchstabencode)sequenz von menschlichem TIE-2-Ligand 1 vom Clon T98G.

[0028] Fig. 6 – Nucleinsäure- und abgeleitete Aminosäure (Einzelbuchstabencode)sequenz von

menschlichem TIE-2-Ligand 2 vom Clon pBluescript KS, der den menschlichen TIE-2-Ligand 2 codiert.

[0029] Fig. 7 – Western-Blot, der die Aktivierung des TIE-2-Rezeptors durch den TIE-2-Ligand 1 (Spur L1) zeigt, aber nicht durch den TIE-2-Ligand 2 (Spur L2) oder durch die Kontrolle (Schein).

[0030] Fig. 8 – Western-Blot, der zeigt, daß die Vorbehandlung von HAEC-Zellen mit einem Überschuß an TIE-2-Ligand 2 (Spur 2) antagonistisch auf die anschließende Fähigkeit von verdünntem TIE-2-Ligand wirkt, den TIE-2-Rezeptor (TIE2-R) zu aktivieren, im Vergleich mit einer Vorbehandlung von HAEC-Zellen mit Kontrollmedium (Spur 1).

[0031] Fig. 9 – Western-Blot, der die Fähigkeit von TL2 zur kompetitiven Inhibition der TL1-Aktivierung des TIE-2-Rezeptors unter Verwendung der menschlichen Zellhybridlinie EA.hy926 zeigt.

[0032] Fig. 10 – Histogramm-Darstellung der Bindung an eine immobilisierte Oberfläche mit TIE-2-IgG der Ratte von TIE-2-Ligand in konzentriertem konditioniertem Medium (10 ×) von C2C12 ras, Rat2 ras, SHEP und T98G. Die spezifische Bindung von TIE-2 (rTIE-2) der Ratte wird durch die signifikante Reduzierung der Bindungsaktivität in der Gegenwart von 25 µg/ml löslichem TIE-2 RB der Ratte im Vergleich mit der geringeren Reduzierung in der Gegenwart von löslichem trkB RB gezeigt.

[0033] Fig. 11 – Bindung von rekombinantem menschlichem TIE-2-Ligand 1 (hTL1) und menschlichem TIE-2-Ligand 2 (hTL2) in COS-Zellüberständen an eine mit menschlichem TIE-2-Rezeptorkörper (RB) immobilisierte Oberfläche. Die spezifische Bindung von menschlichem TIE-2 wurde durch Inkubation der Proben mit 25 µg/ml von entweder löslichem menschlichem TIE-2 RB oder trkB RB bestimmt; eine signifikante Reduzierung der Bindungsaktivität wird nur bei den Proben beobachtet, die mit menschlichem TIE-2 RB inkubiert wurden.

[0034] Fig. 12 – Western-Blot, der zeigt, daß der TIE-2-Rezeptorkörper (als TIE-2 RB oder, wie hier, als TIE2-Fc bezeichnet) die Aktivierung von TIE-2-Rezeptoren durch den TIE-2-Ligand 1 (TL1) in HUVEC-Zellen blockiert, während ein nicht verwandter Rezeptorkörper (TRKB-Fc) diese Aktivierung nicht blockiert.

[0035] Fig. 13 – Agarosegele, die serielle Verdünnungen [unverdünnt (1) bis 10^{-4}] der TL1- und TL2-RT-PCR-Produkte zeigen, die aus fötaler Leber einer E14.5-Maus (Spuren 1- gesamt, Spuren 3- stromal angereichert und Spuren 4- hämatopoetische c-kit^{+}TER119-Vorläuferzellen) und fötalem Thymus einer E14.5-Maus erhalten wurden (Spuren 2- gesamt).

[0036] Fig. 14 – Agarosegele, die serielle Verdünnungen [unverdünnt (1) bis 10^{-4}] der TL1- und TL2-RT-PCR-Produkte zeigen, die aus kortikalen Stromalzellen des fötalen Thymus einer E17.5-Maus (Spuren 1- CDR1+/A2B5–) und stromalen Markzellen (Spur CDR1–/A2B5+) gewonnen wurden.

[0037] Fig. 15 – Eine schematische Darstellung der hypothetischen Rolle der TIE-2/TIE-Liganden bei der Angiogenese. TL1 wird mit (•) dargestellt, TL2 wird mit (*) dargestellt, TIE-2 wird mit (T) dargestellt, VEGF wird mit ([]) dargestellt und flk-1 (ein VEGF-Rezeptor) wird mit (Y) dargestellt.

[0038] Fig. 16 – Objektträger mit in situ-Hybridisierung, die das zeitliche Expressionsmuster von TIE-2, TL1, TL2 und VEGF während der Angiogenese zeigen, die mit der Follikelentwicklung und der Gelbkörperbildung im Eierstock einer Ratte assoziiert ist, die mit dem Serum eines schwangeren Weibchens behandelt wurde. Säule 1: Früher prä-ovulatorischer Follikel; Säule 2: prä-ovulatorischer Follikel; Säule 3: früher Gelbkörper; und Säule 4: atretischer Follikel; Reihe A: helles Feld; Reihe B: VEGF; Reihe C: TL2; Reihe D: TL1 und Reihe E: TIE-2-Rezeptor.

[0039] Fig. 17 – Diagrammdarstellung der TIE-2-Liganden, die die "superspiralisierten" und Fibrinogen-ähnlichen Domänen und die Konstruktion von Multimeren der Fibrinogen-ähnlichen Domänen unter Verwendung von Antikörpern gegen myc-Marker ebenso wie Fc-Markierung zeigen.

[0040] Fig. 18 – Western-Blot der kovalenten multimeren Struktur von TL1 und TL2 (Feld A) und die Umwandlung von TL1 und TL2 durch die Mutation von einem Cystein (Feld B).

[0041] Fig. 19 – Eine typische Kurve der Bindung von TIE-2-IgG an immobilisiertes TL1 in einem quantitativen zellfreien Bindungstest.

[0042] Fig. 20 – Eine typische Kurve, die die Bindung von TIE-2-Ligand 1-Ligandenkörper, der die Fibrinogen-ähnliche Domäne des Liganden an die Fc-Domäne von IgG (TL1-fFc) gebunden umfaßt, an die immobilisierte TIE-2-Ectodomäne in einem quantitativen zellfreien Bindungstest zeigt.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0043] Wie nachstehend ausführlicher beschrieben, haben die Anmelder Liganden isoliert und identifiziert, die den TIE-2-Rezeptor binden. Die TIE-2-Liganden, die aus natürlichen Quellen gereinigt oder rekombinant hergestellt werden können, werden hier als TIE-2-Ligand 1 (oder TL1) und TIE-2-Ligand 2 (oder TL2) bezeichnet. Der TIE-2-Ligand 1, der eine Aminosäuresequenz hat, die unter anderem von der

Nucleinsäure codiert wird, die in Fig. 4 oder Fig. 5 dargestellt ist, ist ein TIE-2-Rezeptor-Agonist. Der TIE-2-Ligand 2, der eine Aminosäuresequenz hat, die unter anderem von der Nucleinsäure codiert wird, die in Fig. 6 dargestellt ist, ist ein TIE-2-Rezeptor-Antagonist.

[0044] TIE-2-Liganden können durch ihre Aminosäuresequenzen definiert werden ebenso wie als funktionell äquivalente Varianten davon, die natürlicherweise vorkommende allelische Variationen umfassen, ebenso wie als Proteine oder Peptide, die Substitutionen, Deletionen oder Insertionsmutanten der beschriebenen Sequenzen umfassen, die die TIE-2-Rezeptoren binden und als Agonisten oder Antagonisten von ihnen fungieren. Solche Varianten umfassen diejenigen, bei denen Aminosäurereste in der Sequenz durch Reste substituiert sind, die in einer stillen Veränderung resultieren. Zum Beispiel können ein oder mehrere Aminosäurereste in der Sequenz durch eine andere Aminosäure/andere Aminosäuren von ähnlicher Polarität substituiert sein, die als funktionelles Äquivalent fungiert/fungieren, was in einer stillen Veränderung resultiert. Substituenten für eine Aminosäure innerhalb der Sequenz können aus anderen Mitgliedern der Klasse ausgesucht werden, zu der die Aminosäure gehört. Zum Beispiel umfaßt die Klasse der nicht polaren (hydrophoben) Aminosäuren Alanin, Leucin, Isoleucin, Valin, Prolin, Phenylalanin, Tryptophan und Methionin. Die polaren neutralen Aminosäuren umfassen Glycin, Serin, Threonin, Cystein, Tyrosin, Asparagin und Glutamin Die positiv geladenen (basischen) Aminosäuren umfassen Arginin, Lysin und Histidin. Die negativ geladenen (sauren) Aminosäuren umfassen Asparaginsäure und Glutaminsäure.

[0045] Die hier beschriebenen TIE-2-Liganden können während oder nach der Translation auf andere Weise modifiziert werden, z. B. durch Glycosylierung, proteolytische Spaltung, Verknüpfung mit einem Antikörpermolekül oder einem anderen zellulären Ligand, usw. Funktionell äquivalente Moleküle umfassen auch Moleküle, die Modifikationen haben, einschließlich N-terminaler Modifikationen, die aus der Expression in einem speziellen rekombinanten Wirt resultieren, wie zum Beispiel die N-terminale Methylierung, die in gewissen bakteriellen Expressionssytemen (z. B. E. coli auftritt. Funktionelle Äquivalente umfassen auch Mutanten, bei denen Aminosäuresubstitutionen für Cysteinmoleküle gemacht werden, um die Stabilität der Moleküle zu verbessern und unerwünschte Verknüpfung zu verhindern. Wie hier verwendet, umfaßt der Ausdruck "TIE-2-Ligand" auch Fragmente der TIE-2-Liganden, die mit der Bindung der Liganden an den TIE-2-Rezeptor assoziiert sind. In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt der TIE-2-Ligand die Fibrinogen-ähnliche Domäne der TIE-2-Liganden 1 und 2, wie hier beschrieben.

[0046] Die vorliegende Erfindung umfaßt Nucleotidsequenzen, die gewisse Derivate des TIE-2-Liganden codieren, ebenso wie Wirtszellen, einschließlich Hefe, Bakterien, Viren und Säugerzellen, die gentechnisch verändert wurden, um das Protein, z. B. durch Transfektion, Transduktion, Infektion, Elektroporation oder Mikroinjektion von Nucleinsäuren, die die hier beschriebenen TIE-2-Liganden codieren, in einem geeigneten Expressionsvektor zu produzieren. Die vorliegende Erfindung umfaßt auch die Einbringung der Nucleinsäuren, die Derivate des TIE-2-Liganden codieren, durch Verfahren der Gentherapie, wie sie zum Beispiel in Finkel und Epstein FASEB J. 9: 843–851 (1995); Guzman et al., PNAS (USA) 91: 10732–10736 (1994) beschrieben sind.

[0047] Ein Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet wird auch erkennen, daß die vorliegende Erfindung DNA- und RNA-Sequenzen umfaßt, die mit einer abgeleiteten TIE-2-Ligand codierenden Sequenz unter Bedingungen gemäßigter Stringenz hybridisieren, wie sie zum Beispiel bei Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2te Ausg. Bd. 1, S 101–104, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) definiert sind. Somit umfaßt ein Nucleinsäuremolekül, das für die Erfindung in Betracht kommt, eines, das eine Sequenz hat, die von einer Aminosäuresequenz eines TIE-2-Liganden abgeleitet ist, der, wie hier beschrieben, hergestellt wurde, ebenso wie ein Molekül, das eine Sequenz von Nucleinsäuren hat, die mit einer solchen Nucleinsäuresequenz hybridisiert, und auch eine Nucleinsäuresequenz, die gegenüber der vorstehenden Sequenzen als Ergebnis des genetischen Codes degeneriert ist, die aber einen Liganden codiert, der den TIE-2-Rezeptor bindet und der eine Aminosäuresequenz und andere primäre, sekundäre und tertiäre Charakteristika hat, die ein ausreichendes Duplikat der hier beschriebenen Liganden sind, damit das Molekül dieselbe biologische Aktivität wie einer der hier beschriebenen TIE-2-Ligand aufweist.

[0048] Die vorliegende Erfindung stellt weiterhin ein isoliertes und gereinigtes Derivat eines menschlichen TIE-2-Liganden bereit, das von einem isolierten Nucleinsäuremolekül der Erfindung codiert wird. Die Erfindung stellt weiterhin einen Vektor bereit, der ein isoliertes Nucleinsäuremolekül umfaßt, welches eine Nucleinsäuresequenz umfaßt, das ein Derivat eines menschlichen TIE-2-Liganden der Erfindung codiert.

[0049] Jedes Verfahren, das dem Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet für die Insertion von DNA-Fragmenten in einen Vektor bekannt ist, kann unter Verwendung geeigneter Kontrollsignale für die Transkription/Translation und der Protein codierenden Sequenzen verwendet werden, um Expressionsvektoren zu konstruieren, die TIE-2-Liganden codieren. Diese Verfahren können rekombinante DNA-Techniken in vitro und synthetische Techniken

und in vivo-Rekombinationen (genetische Rekombination) umfassen. Die Expression einer Nucleinsäuresequenz, die einen TIE-2-Liganden oder ein Peptidfragment davon codiert, kann durch eine zweite Nucleinsäuresequenz reguliert werden, die funktionell mit der Sequenz verknüpft ist, die den TIE-2-Liganden codiert, so daß das TIE-2-Liganden-Protein oder -Peptid in einem Wirt exprimiert wird, der mit dem rekombinanten DNA-Molekül transformiert wurde. Zum Beispiel kann die Expression eines hier beschriebenen TIE-2-Liganden durch jedes im Stand der Technik bekannte Promotor-/Enhancer-Element kontrolliert werden. Promotoren, die verwendet werden können, um die Expression des Liganden zu kontrollieren, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, die lange terminale Wiederholung, wie beschrieben bei Squinto et al., (Cell 65: 1–20 (1991)); die frühe SV40 Promotorregion (Bernoist und Chambon, Nature 290: 304–310), den CMV-Promotor, die 5'-terminale M-MuLV Wiederholung, den Promotor, der in der 3' langen terminalen Wiederholung des Roussarcom-Virus (Yamamoto, et al., Cell 22: 787–797 (1980)) enthalten ist, den Herpes-Thymidinkinase-Promotor (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 144–1445 (1981)), den Adenovirus-Promotor, die regulatorischen Sequenzen des Metallothionein-Gens (Brinster et al., Nature 296: 39–42 (1982)); prokaryontische Expressionsvektoren wie den β-Lactamase-Promotor (Villa-Kamaroff, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 3727–3731 (1978)) oder den tac-Promotor (DeBoer, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 21–25 (1983)), vgl. auch "Useful proteins from recombinant bacteria" in Scientific American, 242: 74–94 (1980); Promotorelemente aus Hefe oder anderen Pilzen wie der Gal 4-Promotor, der ADH(Alkoholdehydrogenase)-Promotor, der PGK(Phosphoglycerinkinase)-Promotor, der alkalische Phosphatase-Promotor, und die folgenden tierischen Kontrollregionen der Transkription, die eine Gewebespezifität aufweisen und in transgenen Tieren verwendet wurden: die Elastase I-Genkontrollregion, die in azinösen Zellen des Pankreas aktiv ist (Swift et al., Cell 38: 639–646 (1984); Ornitz et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50: 399–409 (1986); McDonald, Hepatology 7: 425–515 (1987); Insulin-Genkontrollregion, die in beta-Zellen des Pankreas aktiv ist [Hanahan, Nature 315: 115–122 (1985)]; Immunglobulin-Genkontrollregion, die in lymphoiden Zellen aktiv ist (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), Kontrollregion des Brusttumorvirus der Maus, die in Hoden-, Brust-, lymphoiden und Mastzellen aktiv ist (Leder et al., 1986, Cell 45: 485–495), Albumin-Genkontrollregion, die in Leber aktiv ist (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1: 268–276), alpha-Fetoprotein-Genkontrollregion, die in Leber aktiv ist (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5: 1639–1648; Hammer et al., 1987, Science 235: 53–58); alpha 1-Antitrypsin-Genkontrollregion, die in Leber aktiv ist (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1: 161–171), beta-Globin-Genkontrollregion, die in myeloiden Zellen aktiv ist (Mogram et al., 1985, Nature 315: 338–340; Kollias et al., 1986, Cell 46: 89–94); die Genkontrollregion des basischen Myelinproteins, die in Oligodendrocyten im Gehirn aktiv ist (Readhead et al., 1987, Cell 48: 703–712); die Genkontrollregion der leichten Kette-2 von Myosin, die in Skelettmuskel aktiv ist (Shani, 1985, Nature 314: 283–286), und die Genkontrollregion des Gonatropin freisetzenden Hormons, die im Hypothalamus aktiv ist (Mason et al., 1986, Science 234: 1372–1378). Die Erfindung umfaßt weiterhin die Produktion von Antisense-Verbindungen, die in der Lage sind, spezifisch mit einer RNA-Sequenz zu hybridisieren, die einen TIE-2-Liganden codiert, um seine Expression zu modulieren. Ecker, US-Patent Nr. 5,166,195, erteilt am 24. November 1992.

[0050] Somit werden gemäß der Erfindung Expressionsvektoren, die in der Lage sind, in einem bakteriellen oder eukaryontischen Wirt repliziert zu werden und die eine Nucleinsäure umfassen, die ein Derivat eines TIE-2-Liganden der Erfindung codieren, verwendet, um einen Wirt zu transfizieren und damit die Expression einer solche Nucleinsäure steuern, damit sie den TIE-2-Liganden produziert, der dann in einer biologisch aktiven Form gewonnen werden kann. Wie hier verwendet, umfaßt eine biologisch aktive Form eine Form, die in der Lage ist, an den TIE-2-Rezeptor zu binden und eine biologische Antwort wie eine differenzierte Funktion oder eine Beeinflussung des Phänotyps der Zelle, die den Rezeptor exprimiert, zu verursachen. Die biologische Aktivität kann eine Wirkung als ein Antagonist für den TIE-2-Rezeptor sein, wie die biologische Aktivität des TIE-2-Liganden 2. In alternativen Ausführungsformen ist die aktive Form des TIE-2-Liganden eine, die den TIE-2-Rezeptor erkennt und somit als Zielmittel für den Rezeptor zur Verwendung in der Diagnose und Therapie wirkt. Gemäß solchen Ausführungsformen muß die aktive Form einer TIE-2 exprimierenden Zelle nicht eine Veränderung des Phänotyps vermitteln.

[0051] In einer alternativen Ausführungsform ist die biologisch aktive Form des TIE-2-Liganden eine, bei der der Ligand in der Lage ist, den TIE-1-Rezeptor zu binden. Vorläufige Ergebnisse zeigen, daß TL 2 den TIE-1-Rezeptor bindet (wenn auch nur mit niedriger Affinität), was die Möglichkeit eröffnet, daß es in der Lage sein kann, den Rezeptor zu binden und zu aktivieren, oder, wie im Fall des TIE-2-Rezeptors, zu binden und als Antagonist zu wirken.

[0052] Expressionsvektoren, die die Geninsertion enthalten, können mittels vier genereller Wege identifiziert werden: (a) DNA-DNA-Hybridisierung, (b) Anwesenheit oder Abwesenheit von "Marker"-Genfunktionen, (c) Expression von inserierten Sequenzen und (d) PCR-Nachweis. Beim ersten Weg kann die

Anwesenheit eines in einen Expressionsvektor inserierten fremden Gens mittels DNA-DNA-Hybridisierung unter Verwendung von Sonden nachgewiesen werden, die Sequenzen umfassen, die zu dem inserierten, den TIE-2-Liganden codierenden Gen homolog sind. Bei dem zweiten Weg kann das rekombinante Vektor/Wirt-System auf der Basis der Anwesenheit oder Abwesenheit gewisser "Marker"-Genfunktionen identifiziert und selektiert werden (z. B. Thymidinkinase-Aktivität, Resistenz gegen Antibiotika, Transformationsphänotyp, Ausschlußkörperbildung in Baculovirus, usw.), die durch Insertion von fremden Genen in den Vektor verursacht werden. Zum Beispiel können, wenn eine Nucleinsäure, die den TIE-2-Liganden codiert, in die Markergensequenz des Vektors inseriert ist, Rekombinante, die die Insertion enthalten, durch die Abwesenheit der Markergenfunktion identifiziert werden. Beim dritten Weg können die rekombinanten Expressionvektoren durch Testen auf das fremde Genprodukt, das durch die Rekombinante exprimiert wird, identifiziert werden. Solche Tests können zum Beispiel auf den physikalischen oder funktionellen Eigenschaften der TIE-2-Liganden-Genprodukte basieren, zum Beispiel durch Bindung des Liganden an den TIE-2-Rezeptor oder einen Teil davon, der zum Beispiel mit einem nachweisbaren Antikörper oder einem Teil davon markiert sein kann, oder durch Bindung an Antikörper, die gegen das TIE-2-Liganden-Protein oder einen Teil davon erzeugt wurden. Die Zellen der vorliegenden Erfindung können transient oder vorzugsweise konstitutiv und permanent die TIE-2-Liganden exprimieren, wie hier beschrieben. Beim vierten Weg können DNA-Nucleotidprimer hergestellt werden, die einer tie-2-spezifischen DNA-Sequenz entsprechen. Diese Primer können dann verwendet werden, um ein tie-2-Genfragment einer PCR-Reaktion zu unterwerfen (PCR Protocols: A Guide To Methods and Applications, herausgegeben von Michael A. Innis et al., Academic Press (1990)).

[0053] Die rekombinanten Liganden können mit jedem Verfahren gereinigt werden, das die anschließende Bildung eines stabilen, biologisch aktiven Proteins zuläßt. Vorzugsweise werden die Liganden in das Kulturmedium sezerniert, aus dem sie dann gewonnen werden. In einer anderen Ausführungsform können die Liganden aus Zellen als lösliche Proteine oder als Einschlußkörper gewonnen werden, aus denen sie mit 8 M Guanidiniumhydrochlorid und Dialyse gemäß bekannter Verfahren quantitativ extrahiert werden können. Um den Liganden weiter zu reinigen, können Affinitätschromatographie, herkömmliche Ionenaustauscherchromatographie, hydrophobe Wechselwirkungschromatographie, Umkehrphasenchromatographie oder Gelfiltration verwendet werden.

[0054] Wie in den Beispielen detaillierter beschrieben, kann ein rekombinantes Gen, das einen TIE-2-Liganden codiert, außerdem verwendet werden, um durch homologe Rekombination das endogene Gen zu inaktivieren oder einem "knock out"-Prozess zu unterwerfen und damit eine bezüglich des TIE-2-Liganden defiziente Zelle, bezüglich des TIE-2-Liganden defizientes Gewebe oder Tier zu erzeugen. Zum Beispiel, und keinesfalls einschränkend, kann das rekombinante Gen, das einen TIE-2-Liganden codiert, so konstruiert werden, daß es eine Insertionsmutation enthält, zum Beispiel das neo-Gen, welches das native den TIE-2-Liganden codierende Gen inaktivieren würde. Ein solches Konstrukt, unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors, kann mittels einer Technik wie Transfektion, Transduktion oder Injektion in eine Zelle eingebracht werden, wie eine embryonale Stammzelle. Zellen, die das Konstrukt enthalten, können dann mittels ihrer Resistenz gegen G418 selektiert werden. Zellen, denen ein intaktes Gen, das einen TIE-2-Liganden codiert, fehlt, können dann z. B. durch Southern-Blott-Verfahren, PCR-Nachweis, Northern-Blott-Verfahren oder Expressionstests identifiziert werden. Zellen, denen ein intaktes Gen, das einen TIE-2-Liganden codiert, fehlt, können dann mit frühen embryonalen Zellen fusioniert werden, um transgene Tiere zu erzeugen, die bezüglich eines solchen Liganden defizient sind. Ein solches Tier kann verwendet werden, um spezifische in vivo-Prozesse zu definieren, normalerweise in Abhängigkeit vom Liganden.

[0055] Die vorliegende Erfindung stellt auch Antikörper gegen die hier beschriebenen Derivate des TIE-2-Liganden bereit, die für den Nachweis der Liganden bei zum Beispiel diagnostischen Anwendungen von Nutzen sind. Für die Herstellung von monoclonalen Antikörpern, die gegen den TIE-2-Liganden gerichtet sind, kann jede Technik verwendet werden, die die Produktion von Antikörpermolekülen mittels kontinuierliche Zelllinien in Kultur bereitstellt. Zum Beispiel sind die Hybridomtechnik, ursprünglich von Köhler und Milstein (1975, Nature 256: 495–497) entwickelt, ebenso wie die Triomtechnik, die menschliche B-Zell-Hybridomtechnik (Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4: 72) und die EBV-Hybridomtechnik zur Produktion von menschlichen monoclonalen Antikörpern (Cole et al., 1985 in "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy," Alan R. Liss, Inc. S. 77–96) und dergleichen im Umfang der vorliegenden Erfindung.

[0056] Die monoclonalen Antikörper können menschliche monoclonale Antikörper oder chimäre Mensch-Maus-(oder andere Arten)monoclonale Antikörper sein. Menschliche monoclonale Antikörper können mittels jedes einer Vielzahl von Verfahren im Stand der Technik hergestellt werden (z. B. Teng et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 7308–7312; Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4: 72–79; Olsson et al., 1982., Meth. Enzymol. 92:

3–16). Chimäre Antikörpermoleküle können so hergestellt werden, daß sie eine Antigen bindende Domäne der Maus mit menschlichen konstanten Regionen enthalten (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 6851, Takeda et al., 1985, Nature 314: 452).

[0057] Verschiedene im Stand der Technik bekannte Verfahren können für die Produktion von polyclonalen Antikörpern gegen Epitope der hier beschriebenen TIE-2-Liganden verwendet werden. Für die Produktion von Antikörper können verschiedene Wirtstiere, einschließlich, aber nicht beschränkt darauf, Kaninchen, Mäuse und Ratten durch Injektion des TIE-2-Liganden oder eines Fragments oder Derivats davon immunisiert werden. Verschiedene Adjuvantien können verwendet werden, um die Immunantwort zu verstärken, in Abhängigkeit von der Art des Wirts, und einschließlich, aber nicht beschränkt darauf, Freundsches Adjuvans (vollständig und unvollständig), Mineralgele wie Aluminiumhydroxid, oberflächenaktive Verbindungen wie Lysolecithin, pluronische Polyole, Polyanionen, Peptide, Ölemulsionen, KLH „keyhole limpet hemocyanins", Dinitrophenol und potentiell nützliche menschliche Adjuvantien wie BCG (Bacille Calmette-Guerin) und Corynebacterium parvum.

[0058] Ein molekularer Clon eines Antikörpers gegen ein ausgewähltes TIE-2-Liganden-Epitop kann unter Verwendung von bekannten Verfahren hergestellt werden. Die rekombinante DNA-Technik (vgl. z. B. Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) kann verwendet werden, um Nucleinsäuresequenzen, die ein monoclonales Antikörpermolekül codieren, oder die Antigen bindende Region davon, zu konstruieren.

[0059] Die vorliegende Erfindung stellt Antikörpermoleküle bereit ebenso wie Fragmente von solchen Antikörpermolekülen. Antikörperfragmente, die den Idiotyp des Moleküls enthalten, können mittels bekannter Verfahren gewonnen werden. Zum Beispiel umfassen solche Fragmente, sind aber nicht beschränkt darauf, das $F(ab')_2$-Fragment, das durch Pepsinverdau des Antikörpermoleküls erzeugt werden kann; die Fab'-Fragmente, die durch Reduktion der Disulfidbrücken des $F(ab')_2$-Fragments erzeugt werden können, und die Fab-Fragmente, die durch Behandlung des Antikörpermoleküls mit Papain und einem reduzierenden Mittel erzeugt werden können. Die Antikörpermoleküle können mit bekannten Verfahren gereinigt werden, z. B. Immunabsorptions- oder Immunaffinitätschromatographie, chromatographische Verfahren wie HPLC (Hochleistungs-Flüssigchromatographie) oder eine Kombination davon.

[0060] Ein Immuntest kann für die Messung der Menge des TIE-2-Liganden in einer biologischen Probe verwendet werden durch

a) Inkontaktbringen der biologischen Probe mit mindestens einem Antikörper, der spezifisch den TIE-2-Liganden bindet, so daß der Antikörper mit jedem in der Probe anwesenden TIE-2-Liganden einen Komplex bildet; und

b) Messung der Menge des Komplexes und dabei Messung der Menge an TIE-2-Ligand in der biologischen Probe.

[0061] Ein Test für die Messung der Menge des TIE-2-Rezeptors in einer biologischen Probe kann umfassen

a) Inkontaktbringen der biologischen Probe mit mindestens einem Liganden der Erfindung, so daß der Ligand mit dem TIE-2-Rezeptor einen Komplex bildet; und

b) Messung der Menge des Komplexes und dabei Messung der Menge an TIE-2-Rezeptor in der biologischen Probe.

[0062] Ein TIE-2-Ligand kann auch zur Unterstützung des Überlegens und/oder Wachstums und/oder der Wanderung und/oder der Differenzierung der den TIE-2-Rezeptor exprimierenden Zellen verwendet werden. Somit kann der Ligand als Ergänzung der Unterstützung von zum Beispiel Endothelzellen in Kultur verwendet werden.

[0063] Des weiteren ermöglicht die Entdeckung eines verwandten Liganden für den TIE-2-Rezeptor durch die Anmelder die Verwendung von Testsystemen, die für die Identifizierung von Agonisten oder Antagonisten des TIE-2-Rezeptors von Nutzen sind. Solche Testsysteme wären bei der Identifikation von Molekülen von Nutzen, die in der Lage sind, die Angiogenese zu fördern oder zu inhibieren. Zum Beispiel können in einer Ausführungsform Antagonisten des TIE-2-Rezeptors als Testmoleküle identifiziert werden, die in der Lage sind, die Wechselwirkung des TIE-2-Rezeptors mit einem biologisch aktiven TIE-2-Liganden zu stören. Solche Antagonisten werden durch ihre Fähigkeit identifiziert, 1) die Bindung eines biologisch aktiven TIE-2-Liganden an den Rezeptor zu blockieren, gemessen zum Beispiel unter Verwendung der BIAcore-Biosensortechnologie (BIAcore; Pharmacia Biosensors, Piscataway, NJ); oder 2) die Fähigkeit eines biologisch aktiven TIE-2-Liganden zu blockieren, eine biologische Antwort hervorzurufen. Solche biologischen Antworten umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, die Phosphorylierung des TIE-2-Rezeptors oder stromabwärts liegender Komponenten des TIE-2-Signalübertragungsweges oder das Überleben, das Wachstum oder die Differenzierung der den TIE-2-Rezeptor tragenden Zellen.

[0064] In einer Ausführungsform können die Zellen, die konstruiert wurden, um den TIE-2-Rezeptor zu exprimieren, bei ihrem Wachstum von der Zugabe von TIE-2-Ligand abhängig sein. Solche Zellen stel-

len nützliche Testsysteme für die Identifizierung zusätzlicher Agonisten des TIE-2-Rezeptors, oder von Antagonisten bereit, die in der Lage sind, die Aktivität des TIE-2-Liganden auf solchen Zellen zu stören. In einer anderen Ausführungsform können autocrine Zellen, die konstruiert wurden, um in der Lage zu sein, den TIE-2-Liganden und -Rezeptor gleichzeitig zu exprimieren, nützliche Systeme für die Testung auf potentielle Agonisten oder Antagonisten bereitstellen.

[0065] Somit kann der TIE-2-Rezeptor in Zellen eingebracht werden, die normalerweise diesen Rezeptor nicht exprimieren, und somit diesen Zellen ermöglicht, deutliche und leicht nachweisbare Antworten auf einen Liganden zu zeigen, der an diesen Rezeptor bindet. Die Art der hervorgerufenen Antwort hängt von der verwendeten Zelle ab und nicht von dem spezifischen Rezeptor, der in die Zelle eingebracht wurde. Geeignete Zelllinien können ausgewählt werden, um eine Antwort mit dem größten Nutzen für das Testen auf Moleküle, ebenso wie die Entdeckung von Molekülen, die auf Tyrosinkinase-Rezeptoren wirken können, zu ergeben. Die Moleküle können jede Art von Molekül sein, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, peptidische und nicht peptidische Moleküle, die in Systemen wirken werden, die in Rezeptor-spezifischer Weise zu beschreiben sind.

[0066] Eines der nützlicheren Systeme, die genutzt werden können, umfaßt die Einbringung des TIE-2-Rezeptors (oder eines chimären Rezeptors, der die extrazelluläre Domäne einer anderen Rezeptor-Tyrosinkinase, wie zum Beispiel trkC, und die intrazelluläre Domäne eines TIE-Rezeptors umfaßt) in eine Fibroblasten-Zelllinie (z. B. NIH3T3-Zellen), so daß ein solcher Rezeptor, der normalerweise keine proliferativen oder andere Antworten vermittelt, nach der Einbringung in Fibroblasten dennoch unter Verwendung einer Reihe von gut etablierten Verfahren getestet werden kann, um die Wirkungen von Fibroblasten-Wachstumsfaktoren zu quantifizieren (z. B. Thymidineinbau oder andere Arten von Proliferationstests; vgl. van Zoelen, 1990, "The Use of Biological Assays For Detection Of Polypeptide Growth Factors" in Progress Factor Research, Bd. 2, S. 131–152; Zhan und M. Goldfarb, 1986, Mol. Cell. Biol., Bd. 6, S. 3541–3544). Diese Tests haben den zusätzlichen Vorteil, daß jede Herstellung sowohl bei der Zelllinie, die den eingebrachten Rezeptor hat, als auch bei der Ausgangszelllinie getestet werden kann, der der Rezeptor fehlt; nur spezifische Wirkungen bei der Zelllinie mit dem Rezeptor würden so eingestuft werden, daß sie durch den eingebrachten Rezeptor vermittelt wurden. Solche Zellen können weiterhin so konstruiert werden, daß sie TIE-2-Liganden exprimieren und somit ein autocrines System erzeugen, das bei der Testung von Molekülen von Nutzen ist, die als Antagonisten/Agonisten dieser Wechselwirkung wirken. Somit stellt die vorliegende Erfindung Wirtszellen bereit, die eine Nucleinsäure, die TIE-2-Liganden codiert, und eine Nucleinsäure, die den TIE-2-Rezeptor codiert, umfassen.

[0067] Die Wechselwirkung von TIE-2-Rezeptor/TIE-2-Ligand stellt außerdem ein nützliches System für die Identifizierung von kleinen Molekülen als Agonisten oder Antagonisten des TIE-2-Rezeptors bereit. Zum Beispiel können Fragmente, Mutanten oder Derivate von TIE-2-Liganden identifiziert werden, die den TIE-2-Rezeptor binden, aber keine andere biologische Aktivität induzieren. Alternativ ermöglicht die Charakterisierung eines TIE-2-Liganden die Bestimmung der aktiven Teile des Moleküls. Weiterhin ermöglicht die Identifizierung eines Liganden die Bestimmung der Röntgenkristallstruktur des Rezeptor/Ligand-Komplexes und ermöglicht somit die Identifizierung der Bindungsstelle auf dem Rezeptor. Die Kenntnis der Bindungsstelle wird einen nützlichen Einblick in die gezielte Planung von neuen Agonisten und Antagonisten ermöglichen.

[0068] Die spezifische Bindung eines Testmoleküls an den TIE-2-Rezeptor kann mittels einer Reihe von Möglichkeiten gemessen werden. Zum Beispiel kann die tatsächliche Bindung eines Testmoleküls an Zellen, die TIE-2 exprimieren, nachgewiesen oder gemessen werden, indem man (i) das an die Oberfläche der intakten Zellen gebundene Testmolekül; (ii) das mit dem TIE-2-Protein verknüpfte Testmolekül in Zelllysaten; oder (iii) das in vitro an TIE-2 gebundene Testmolekül nachweist oder mißt. Die spezifische Wechselwirkung zwischen dem Testmolekül und TIE-2 kann unter Verwendung von Reagentien bewertet werden, die die einzigartigen Eigenschaften dieser Wechselwirkung zeigen.

[0069] Als ein spezifisches, nicht einschränkendes Beispiel können die Verfahren der Erfindung wie folgt genutzt werden. Man stelle sich einen Fall vor, bei dem der TIE-2-Ligand in einer Probe gemessen werden soll. Verschiedene Verdünnungen der Probe (dem Testmolekül) können parallel mit einer negativen Kontrolle (NC), die keine TIE-2-Liganden-Aktivität enthält, und einer positiven Kontrolle (PC), die eine bekannte Menge an TIE-2-Ligand enthält, auf Zellen, die TIE-2 exprimieren, in der Gegenwart eines nachweisbar markierten TIE-2-Liganden (in diesem Beispiel ein radioiodierter Ligand) einwirken. Die Menge an TIE-2-Ligand in der Testprobe kann durch Bestimmung der Menge an mit ^{125}I markiertem TIE-2-Liganden, die bei jeder Verdünnung an die Kontrollen bindet, und dann durch den Vergleich der Probenwerte mit einer Standardkurve bestimmt werden. Je mehr TIE-2-Ligand in der Probe ist, desto weniger ^{125}I-Ligand wird an TIE-2 binden.

[0070] Die Menge an gebundenem ^{125}I-Ligand kann durch Messung der Menge an Radioaktivität pro Zelle, oder durch Verknüpfung des TIE-2-Liganden an

Zelloberflächenproteine unter Verwendung von DSS, wie beschrieben von Meakin und Shooter, 1991, Neuron 6: 153–163, und durch Nachweis der Menge an markiertem Protein in Zellextrakten unter Verwendung von zum Beispiel SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, die ein markiertes Protein offenbaren wird, das eine Größe hat, die dem TIE-2-Rezeptor/TIE-2-Ligand entspricht, bestimmt werden. Die Wechselwirkung zwischen dem spezifischen Testmolekül/TIE-2 kann weiterhin durch die Zugabe verschiedener Verdünnungen eines nicht markierten Kontrollliganden zu den Tests getestet werden, der den TIE-2-Rezeptor nicht bindet und der deshalb keine substantielle Wirkung auf die Kompetition von markiertem TIE-2-Ligand und Testmolekül um die Bindung von TIE-2 haben sollte. In einer anderen Ausführungsform kann man von einem Molekül, von dem man weiß, daß es die Bindung TIE-2-Rezeptor/TIE-2-Ligand zerstört, wie zum Beispiel, aber nicht beschränkt darauf, anti-TIE-2-Antikörper oder TIE-2-Rezeptorkörper, wie hier beschrieben, erwarten, daß es die Kompetition von ^{125}I-TIE-2-Ligand und dem Testmolekül um die Bindung von TIE-2-Rezeptor stört.

[0071] Nachweisbar markierter TIE-2-Ligand umfaßt, ist aber nicht beschränkt auf, TIE-2-Ligand, der kovalent oder nicht kovalent mit einer radioaktiven Verbindung, einer fluoreszierenden Verbindung, einer Verbindung, die eine enzymatische Aktivität hat, einer Verbindung, die als Substrat für ein Enzym dienen kann (es werden Enzyme und Substrate bevorzugt, die mit kolorimetrisch nachweisbaren Reaktionen assoziiert sind) oder einer Verbindung, die von einem Antikörpermolekül erkannt werden kann, welches vorzugsweise ein nachweisbar markiertes Antikörpermolekül ist, verknüpft ist.

[0072] In einer anderen Ausführungsform kann die spezifische Bindung eines Testmoleküls an TIE-2 durch Bewertung der sekundären biologischen Wirkungen der TIE-2-Ligand/TIE-2-Rezeptor-Bindung gemessen werden, einschließlich, aber nicht beschränkt darauf, des Zellwachstums und/oder der Differenzierung oder der sehr frühen Genexpression oder der Phosphorylierung von TIE-2. Zum Beispiel kann die Fähigkeit eines Testmoleküls zur Induktion der Differenzierung in Zellen, denen tie-2 fehlt, und in vergleichbaren Zellen, die tie-2 exprimieren, getestet werden; die Differenzierung in Zellen, die tie-2 exprimieren, aber nicht in vergleichbaren Zellen, denen tie-2 fehlt, wäre ein Indiz einer spezifischen Wechselwirkung zwischen Testmolekül/TIE-2. Eine ähnliche Analyse könnte durch den Nachweis der Induktion eines sehr frühen Gens (z. B. fos oder jun) in tie-2-minus- und tie-2-plus-Zellen, oder durch den Nachweis der Phosphorylierung von TIE-2 unter Verwendung von Standard-Phosphorylierungstests durchgeführt werden, die im Stand der Technik bekannt sind. Eine solche Analyse könnte bei der Identifizierung von Agonisten oder Antagonisten von Nutzen sein, die nicht kompetitiv an TIE-2 binden.

[0073] Ein Molekül, das die biologische Aktivität eines TIE-2-Liganden hat, kann identifiziert werden, indem man (i) ein Testmolekül auf eine Zelle einwirken läßt, die tie-2 exprimiert, und (ii) die spezifische Bindung des Testmoleküls an den TIE-2-Rezeptor nachweist, wobei die spezifische Bindung an TIE-2 positiv mit einer TIE-2-ähnlichen Aktivität korreliert. Die spezifische Bindung kann entweder durch Testung auf die direkte Bindung oder auf die sekundären biologischen Wirkungen der Bindung nachgewiesen werden, wie vorstehend diskutiert. Ein solches Verfahren kann insbesondere bei der Identifizierung von neuen Mitgliedern der TIE-Liganden-Familie oder in der pharmazeutischen Industrie bei der Durchmusterung einer großen Sammlung von peptidischen und nicht peptidischen Molekülen (d. h. Peptidomimetica) auf biologische Aktivität, die mit TIE assoziiert ist, von Nutzen sein. In einer bevorzugten, spezifischen, nicht einschränkenden Ausführungsform der Erfindung kann eine großes Gitter von Kulturmulden hergestellt werden, die in abwechselnden Reihen, PC12(oder Fibroblasten, siehe nachstehend)-Zellen enthalten, die entweder tie-2-minus sind oder so konstruiert wurden, daß sie tie-2-plus sind. Eine Vielzahl von Testmolekülen kann dann zugegeben werden, so daß jede Säule des Gitters oder ein Teil davon ein anderes Testmolekül enthält. Jede Mulde könnte dann auf die Anwesenheit oder Abwesenheit von Wachstum und/oder Differenzierung überprüft werden. Eine extrem große Zahl von Testmolekülen könnte auf diese Weise auf eine solche Aktivität durchmustert werden.

[0074] Eine TIE-Liganden-ähnliche Aktivität kann nachgewiesen oder gemessen werden und Moleküle, die eine solche Aktivität haben, können identifiziert werden, indem man (i) ein Testmolekül auf ein TIE-2-Rezeptorprotein in vitro unter Bedingungen einwirken läßt, die eine Bindung zulassen, und (ii) die Bindung des Testmoleküls an das TIE-2-Rezeptorprotein nachweist, wobei die Bindung des Testmoleküls an den TIE-2-Rezeptor mit einer TIE-Liganden-ähnlichen Aktivität korreliert. Gemäß einem solchen Verfahren kann der TIE-2-Rezeptor substantiell gereinigt sein oder auch nicht, er kann an einen festen Träger gebunden sein (z. B. als Affinitätssäule oder als ELISA-Test) oder er kann in eine künstliche Membran eingebaut sein. Die Bindung des Testmoleküls an den TIE-2-Rezeptor kann mittels jedes im Stand der Technik bekannten Verfahrens bewertet werden. In bevorzugten Ausführungsformen kann die Bindung des Testmoleküls durch Bewertung seiner Fähigkeit zur Kompetition um die Bindung von nachweisbar markierten, bekannten TIE-2-Liganden an den TIE-2-Rezeptor nachgewiesen oder gemessen werden.

[0075] Die Fähigkeit eines Testmoleküls, als ein Antagonist einer TIE-Liganden-ähnlichen Aktivität zu fungieren, kann durch den Nachweis der Fähigkeit des Moleküls zur Inhibition einer Wirkung der Bindung eines TIE-Liganden an den TIE-2-Rezeptor auf einer Zelle nachgewiesen werden, die den Rezeptor exprimiert. Ein solcher Antagonist kann die Bindung von TIE-2-Rezeptor/TIE-2-Ligand stören oder nicht. Wirkungen der Bindung des TIE-2-Liganden an den TIE-2-Rezeptor sind vorzugsweise biologische oder biochemische Wirkungen, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, das Überleben oder die Proliferation der Zelle, die Zelltransformation, die sehr frühe Geninduktion oder die TIE-2-Phosphorylierung.

[0076] Antikörper oder andere Moleküle, die in der Lage sind, den Liganden zu neutralisieren oder die Bindung an den Rezeptor zu blockieren, können ebenfalls identifiziert werden, ebenso wie die Moleküle, die mit dem Verfahren identifiziert werden. In einem nicht einschränkenden Beispiel kann das Verfahren in einem Test durchgeführt werden, der vom Konzept her einem ELISA-Test ähnlich ist. Zum Beispiel kann der TIE-2-Rezeptorkörper an einen festen Träger gebunden werden, wie eine Kunststoffplatte mit vielen Mulden. Als Kontrolle kann dann eine bekannte Menge an TIE-2-Ligand, der mit Myc markiert wurde, in die Mulde eingebracht werden und jeder markierte TIE-2-Ligand, der an den Rezeptorkörper bindet, kann dann mittels eines Reporterantikörpers identifiziert werden, der gegen die Myc-Markierung gerichtet ist. Dieses Testsystem kann dann verwendet werden, um Testproben auf Moleküle zu durchsuchen, die in der Lage sind, i) an den markierten Liganden zu binden oder ii) an den Rezeptorkörper zu binden und damit die Bindung des Rezeptorkörpers an den markierten Liganden zu blockieren. Zum Beispiel kann eine Testprobe, die vermutlich ein interessantes Molekül mit einer bekannten Menge an markiertem Liganden enthält, in die Mulde eingebracht werden und die Menge an markiertem Liganden, die an den Rezeptorkörper bindet, kann gemessen werden. Durch Vergleich der Menge an gebundenem markiertem Liganden in der Testprobe mit der Menge in der Kontrolle können die Proben identifiziert werden, die Moleküle enthalten, die in der Lage sind, die Bindung des Liganden an den Rezeptor zu blockieren. Die so identifizierten Moleküle von Interesse können unter Verwendung von Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet bekannt sind, isoliert werden.

[0077] Nachdem ein Blocker der Bindung eines Liganden gefunden wurde, würde ein Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet wissen, wie er einen zweiten Test durchführen müßte, um zu bestimmen, ob der Blocker an den Rezeptor oder an den Liganden bindet, ebenso wie Tests, um zu bestimmen, ob das blockierende Molekül die biologische Aktivität des Liganden neutralisieren kann. Zum Beispiel wäre ein Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet unter Verwendung eines Bindungstests, der die BIAcore-Biosensortechnologie verwendet (oder ein Äquivalent), bei der entweder der TIE-2-Rezeptorkörper oder der TIE-2-Ligand oder -Ligandenkörper kovalent an einen festen Träger gebunden ist (z. B. Carboxymethyldextran auf einer Goldoberfläche), in der Lage zu bestimmen, ob das blockierende Molekül spezifisch an den Liganden, den Ligandenkörper oder den Rezeptorkörper bindet. Um zu bestimmen, ob das blockierende Molekül die biologische Aktivität des Liganden neutralisieren kann, könnte ein Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet einen Phosphorylierungstest (vgl. Beispiel 5) oder in einer anderen Ausführungsform einen funktionellen Biotest, wie einen Überlebenstest, unter Verwendung von Primärkulturen von zum Beispiel Endothezellen durchführen. In einer anderen Ausführungsform könnte ein blockierendes Molekül, das an den Rezeptorkörper bindet, ein Agonist sein and ein Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet würde wissen, wie er das bestimmt, indem er einen geeigneten Test für die Identifizierung zusätzlicher Agonisten des TIE-2-Rezeptors durchführt.

[0078] Die Erfindung betrifft Zusammensetzungen, bei denen der TIE-2-Ligand die Rezeptor bindende Domäne der hier beschreibenen TIE-2-Liganden ist. Zum Beispiel besteht der TIE-2-Ligand 1 aus einer "superspiralisierten" Domäne (sie beginnt am 5'-Ende und erstreckt sich bis zu dem Nucleotid an etwa Position 1160 von **Fig. 4** und etwa Position 1157 von **Fig. 5**) und einer Fibrinogen-ähnlichen Domäne (die von der Nucleotidsequenz von **Fig. 4** codiert wird, sie beginnt etwa an Position 1161 und etwa an Position 1158 von **Fig. 5**). Man nimmt an, daß die Fibrinogen-ähnliche Domäne des TIE-2-Liganden 2 an oder etwa an derselben Aminosäuresequenz wie in Ligand 1 (FRDCA) beginnt, die von den Nucleotiden codiert wird, die etwa bei 1197 in **Fig. 6** beginnen. Die Multimerisierung der superspiralisierten Domänen während der Produktion des Liganden erschwert die Reinigung. Wie in Beispiel 19 beschrieben, haben die Anmelder jedoch entdeckt, daß die Fibrinogen-ähnliche Domäne die den TIE-2-Rezeptor bindende Domäne umfaßt. Die monomeren Formen der Fibrinogen-ähnlichen Domäne scheinen jedoch nicht den Rezeptor zu binden. Untersuchungen unter Verwendung einer Myc markierten Fibrinogen-ähnlichen Domäne die unter Verwendung eines anti-Myc-Antikörpers "geclustert" wurde, binden den TIE-2-Rezeptor. [Verfahren für die Produktion von "geclusterten" Liganden und Ligandenkörpern sind beschrieben in Davis, et al., Science 266: 816–819 (1994)]. Basierend auf diesen Befunden haben die Anmelder "Ligandenkörper" produziert, die die Fibrinogen-ähnliche Domäne von TIE-2-Liganden gekoppelt mit der Fc-Domäne von IgG ("fFc's") umfassen. Diese Ligandenkörper, die Dimere bilden, binden effizient den TIE-2-Rezeptor. Entsprechend betrifft die vorliegen-

de Erfindung die Produktion von TIE-2-Ligandenkörpern, die bei diagnostischen oder therapeutischen Anwendungen als Zielmittel verwendet werden können, wie als Zielmittel für Tumore und/oder assoziiertes Gefäßsystem, in denen ein TIE-2-Antagonist angezeigt ist.

[0079] Die Erfindung stellt weiterhin die Entwicklung des Liganden, eines Fragments oder Derivats davon oder eines anderen Moleküls, welches ein Rezeptor-Agonist oder -Antagonist ist, als ein Arzneimittel bei der Behandlung von Patienten bereit, die an Krankheiten leiden, die Zellen, Gewebe oder Organe betreffen, die den TIE-2-Rezeptor exprimieren. Solche Moleküle können bei einem Verfahren der Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers oder bei einem Diagnoseverfahren verwendet werden.

[0080] Weil der TIE-2-Rezeptor in Assoziation mit Endothelzellen identifiziert wurde und, wie hier gezeigt, das Blockieren des TIE-2-Liganden 1 die Vaskularisierung zu verhindern scheint, haben die Anmelder gezeigt, daß der TIE-2-Ligand 1 bei der Induktion der Vaskularisierung bei Krankheiten oder Störungen von Nutzen sein wird, wo eine solche Vaskularisierung angezeigt ist. Solche Krankheiten oder Störungen würden die Wundheilung, die Ischämie und Diabetes umfassen. Die Liganden können in Tiermodellen getestet werden und therapeutisch verwendet werden, wie es für andere Mittel beschrieben wird, wie den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor VEGF), einem anderen endothelialen zellspezifischen Faktor, der die Angiogenese fördert. Ferrara, et al., US-Patent Nr. 5,332,671, erteilt am 26. Juli 1994. Die Ferrara-Referenz, ebenso wie andere Untersuchungen, beschreiben in vitro- und in vivo-Untersuchungen, die verwendet werden können, um die Wirkung eines Angiogenesefaktors bei der Erhöhung des Blutflusses beim ischämischen Herz, bei der Verbesserung der Wundheilung und bei anderen therapeutischen Anordnungen zu zeigen, bei denen die Neoangiogenese erwünscht ist [vgl. Sudo, et al., Europäische Patentanmeldung 0 550 296 A2, offengelegt am 7. Juli 1993; Banai, et al., Circulation 89: 2183–2189 (1994); Unger, et al., Am. J. Physiol. 266: H1588–H1595 (1994); Lazarous, et al., Circulation 91: 145–153 (1995)]. Gemäß der Erfindung können die TIE-2-Liganden allein oder in Kombination mit einer oder mehreren pharmazeutisch aktiven Verbindungen verwendet werden, wie zum Beispiel VEGF oder basischer Fibroblastenwachstumfaktor (bFGF) ebenso wie Cytokine, Neutrophine usw.

[0081] Im Gegensatz dazu wären Antagonisten des TIE-2-Rezeptors wie die Rezeptorkörper, die hier in den Beispielen 2 und 3 beschrieben werden, und der TIE-2-Ligand 2, wie in Beispiel 9 beschrieben, von Nutzen, um die Vaskularisierung zu verhindern oder abzuschwächen, um somit zum Beispiel das Tumorwachstum zu verhindern oder abzuschwächen. Diese Mittel können allein oder in Kombination mit anderen Zusammensetzungen verwendet werden, wie den anti-VEGF-Antikörpern, von denen gezeigt wurde, daß sie bei der Behandlung von Zuständen von Nutzen sind, bei denen der therapeutische Zweck die Blockierung der Angiogenese ist. Die hier beschriebenen TIE-2-Liganden können auch in Kombination mit anderen Mitteln wie Cytokin-Antagonisten wie IL-6-Antagonisten verwendet werden, von denen bekannt ist, daß sie Entzündung blockieren.

[0082] Zum Beispiel haben die Anmelder bestimmt, daß die TIE-2-Liganden in Zellen exprimiert werden, die in Tumoren liegen oder eng mit Tumoren assoziiert sind. Der TIE-2-Ligand 2 scheint eng mit Endothelzellen von Tumoren assoziiert zu sein. Dementsprechend können TIE-2-Antagonisten wie der TIE-2-Ligand 2 oder TIE-2-Ligandenkörper, auch bei der Verhinderung oder Abschwächung von zum Beispiel dem Tumorwachstum von Nutzen sein. Außerdem können die TIE-2-Liganden oder -Ligandenkörper für die Verabreichung von Toxinen an einen Rezeptor tragende Zellen von Nutzen sein. In einer anderen Ausführungsform können andere Moleküle wie Wachstumsfaktoren, Cytokine oder Nährstoffe mittels TIE-2-Liganden oder -Ligandenkörper an einen TIE-2-Rezeptor tragende Zellen verabreicht werden. Die TIE-2-Liganden oder -Ligandenkörper können auch als diagnostische Mittel für den TIE-2-Rezeptor verwendet werden, um den Rezeptor in vivo oder in vitro nachzuweisen. Wenn der TIE-2-Rezeptor mit einem Krankheitszustand assoziiert ist, kann die TIE-2-Liganden oder -Ligandenkörper als diagnostische Reagentien zum Nachweis der Krankheit mittels, zum Beispiel, der Anfärbung von Gewebe oder Gesamtkörperbildgebung von Nutzen sein. Solche Reagentien umfassen Radioisotope, fluoreszierende Farbstoffe, Farbstoffe, Enzyme und Biotin. Solche diagnostischen oder zielgerichteten Mittel können, wie bei Alitalo et al. WO 95/26364, offengelegt am 5. Oktober 1995, und bei Burrows, F. und P. Thorpe, PNAS (USA) 90: 8996–9000 beschrieben, hergestellt werden.

[0083] TIE-2-Liganden können als hämatopoietische Faktoren verwendet werden. Eine Reihe von hämatopoietischen Faktoren und ihre Rezeptoren sind in die Proliferation und/oder Differenzierung und/oder Migration der verschiedenen Zellarten involviert, die im Blut enthalten sind. Weil die TIE-2-Rezeptoren in frühen hämatopoietischen Zellen exprimiert werden, ist zu erwarten, daß die TIE-2-Liganden eine vergleichbare Rolle bei der Proliferation oder Differenzierung oder Migration dieser Zellen spielen. So kann zum Beispiel eine TIE-2 enthaltende Zusammensetzung in biologischen in vitro- und in vivo-Systemen hergestellt, getestet und überprüft werden und therapeutisch, wie in irgendeiner der folgenden Referenzen beschrieben, genutzt werden: Sou-

sa, US-Patent Nr. 4,810,643, Lee, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4360–4364 (1985), Wong, et al. Science 228: 810–814 (1985); Yokota, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81: 1070 (1984); Bosselmann, et al. WO 9105795, offengelegt am 2. Mai 1991 mit dem Titel "Stern Cell Factor" und Kirkness, et al. WO 95/19985, offengelegt am 27. Juli 1995 mit dem Titel "Haemopoietic Maturation Factor". Dementsprechend können die Liganden für die Diagnose oder Behandlung von Zuständen verwendet werden, bei denen die normale Hämatopoiese unterdrückt ist, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, Anämie, Thromocytopenie, Leukopenie und Granulocytopenie. In einer bevorzugten Ausführungsform können die TIE-2-Liganden zur Stimulierung der Differenzierung von Blutzellenvorläufern in Situationen, bei denen der Patient eine Krankheit hat, wie das erworbene Immunschwächesyndrom (AIDS), die eine Verminderung der normalen Niveaus von Blutzellen verursacht hat, oder bei klinischen Zuständen, bei denen eine Verstärkung der hämatopoietischen Populationen erwünscht ist, wie in Verbindung mit Knochenmarkstransplantation oder bei der Behandlung der Aplasie oder Myelosuppression, die durch Bestrahlung, chemische Behandlung oder Chemotherapie verursacht ist, verwendet werden.

[0084] Die TIE-2-Liganden können allein oder in Kombination mit einem anderen pharmazeutisch aktiven Mittel wie zum Beispiel Cytokinen, Neutrophinen, Interleukinen usw. verwendet werden.

[0085] Alternativ können die TIE-2-Rezeptorantagonisten wie TL2 zur Diagnose oder Behandlung von Patienten verwendet werden, bei denen das gewünschte Ergebnis die Inhibierung des hämatopoietischen Weges ist, wie bei der Behandlung von myeloproliferativen oder anderen proliferativen Störungen der blutbildenden Organe wie Thrombocythämien, Polycythämien und Leukämien.

[0086] Die vorliegende Erfindung stellt auch Arzneimittel bereit, die die TIE-2-Liganden oder -Ligandenkörper der Erfindung in einem pharmakologisch verträglichen Träger umfassen. Die TIE-2-Ligandenproteine, -peptidfragmente oder -derivate können systemisch oder lokal verabreicht werden. Jede geeignete Art der Verabreichung, die im Stand der Technik bekannt ist, kann verwendet werden, einschließlich, aber nicht beschränkt darauf, intravenöser, intrathecaler, intraarterieller, intranasaler, oraler, subkutaner, intraperitonealer Verabreichung oder durch lokale Injektion oder chirurgische Implantation. Es werden auch Formulierungen mit anhaltender Freisetzung bereitgestellt.

[0087] Die vorliegende Erfindung stellt auch einen Antikörper bereit, der spezifisch solch eine therapeutisches Molekül bindet. Der Antikörper kann monoclonal oder polyclonal sein. Die Erfindung stellt auch ein Verfahren der Verwendung solcher monoclonaler oder polyclonaler Antikörper bereit, um die Menge des therapeutischen Moleküls in einer Probe zu messen, die einem Patienten zum Zwecke der Beobachtung des Verlaufs der Therapie entnommen wurde.

[0088] Die Erfindung stellt weiterhin ein Arzneimittel bereit, das einen menschlichen TIE-2-Liganden oder -Ligandenkörper der Erfindung und ein damit verknüpftes cytotoxisches Mittel umfaßt. In einer Ausführungsform kann das cytotoxische Mittel ein Radioisotop oder ein Toxin sein.

[0089] Die Erfindung stellt auch einen Antikörper bereit, der spezifisch einen menschlichen TIE-2-Liganden der Erfindung bindet. Der Antikörper kann monoclonal oder polyclonal sein.

[0090] Die Erfindung stellt weiterhin ein Verfahren für die Reinigung eines menschlichen TIE-2-Liganden bereit, welches umfaßt:

a) Kopplung von mindestens einem TIE-2 bindenden Substrat an eine feste Matrix;

b) Inkubation des Substrats von a) mit einem Zelllysat, so daß das Substrat einen Komplex mit einem menschlichen TIE-2-Liganden in dem Zelllysat bildet;

c) Waschen der festen Matrix; und

d) Elution des menschlichen TIE-2-Liganden von dem gekoppelten Substrat.

[0091] Das Substrat kann jede Verbindung sein, die den menschlichen TIE-2-Liganden spezifisch bindet. In einer Ausführungsform ist die Verbindung ausgewählt aus der Gruppe, die aus dem anti-TIE-2-Liganden-Antikörper, dem TIE-2-Rezeptor und dem TIE-2-Rezeptorkörper besteht. Die Erfindung stellt weiterhin einen Rezeptorkörper, der spezifisch einen menschlichen TIE-2-Liganden bindet, ebenso wie ein Arzneimittel, das den Rezeptorkörper in einem pharmazeutisch verträglichen Träger umfaßt, und ein Verfahren zur Blockierung des Wachstums von Blutgefäßen in einem Menschen bereit, welches die Verabreichung einer wirksamen Menge des Arzneimittels umfaßt.

BEISPIEL 1 – IDENTIFIZIERUNG DER ABAE-ZELLLINIE ALS REPORTERZELLEN FÜR DEN TIE-2-REZEPTOR

[0092] Erwachsene BAE-Zellen sind bei dem European Cell Culture Repository unter ECACC#92010601 hinterlegt. (Vgl. PNAS 75: 2621 (1978)). Die Northern(RNA)-Analyse zeigte mäßige Niveaus von tie-2-Transkripten in der ABAE(Adult Bovine Arterial Endothelial, arterielle Endothezelllinie ausgewachsener Rinder)-Zellinie, konsistent mit Ergebnissen der in situ-Hybridisierung, die die fast ausschließliche Lokalisierung der tie-2-RNA bei vaskulären Endothezellen zeigte. Wir untersuchten daher

ABAE-Zelllysate auf die Anwesenheit von TIE-2-Protein ebenso wie auf das Ausmaß, zu dem das TIE-2-Protein unter normalen Wachstumsbedingungen gegenüber Wachstumsbedingungen ohne Serum am Tyrosin phosphoryliert ist. ABAE-Zelllysate wurden geerntet und der Immunpräzipitation unterworfen, gefolgt von der Western-Blot-Analyse der immunpräzipitierten Proteine mit TIE-2-spezifischen und Phosphotyrosin-spezifischen Antiseren. Das Weglassen oder der Einschluß von TIE-2-Peptiden als spezifisch blockierende Moleküle während der Immunpräzipitation von TIE-2 erlaubte die eindeutige Identifizierung von TIE-2 als ein mäßig nachweisbares Protein von ~150 kD, deren stabile Phosphotyrosin-Niveaus sich durch vorherigen Serumentzug bei den Zellen auf nahe der Nachweisgrenze verminderten.

[0093] Die Züchtung von ABAE-Zellen und die Ernte der Zelllysate wurde wie folgt durchgeführt. ABAE-Zellen mit wenigen Passagen wurde als Einzelschicht mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen/150 mm Plastik-Petrischale (Falcon) ausplattiert und in Dulbecco modifiziertem Eagle-Medium (DMEM) gezüchtet, das 10% fötales Kälberserum (10% BCS), 2 mM L-Glutamin (Q) und jeweils 1% Penicillin und Streptomycin (P-S) in einer Atmosphäre mit 5% CO_2 enthielt. Vor der Ernte der Zelllysate wurden die Zellen 24 Stunden ohne Serum in DMEM/Q/P-S gezüchtet, gefolgt vom Absaugen des Mediums und Spülen der Platten mit eiskalter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), die ergänzt war mit Natriumorthovanadat, Natriumfluorid und Natriumbenzamidin. Die Zellen wurden in einem kleinen Volumen dieses Waschpuffers lysiert, der mit 1% NP40-Detergens und den Proteaseinhibitoren PMSF und Aprotinin ergänzt war. Unlösliche Trümmer wurde durch 10 Minuten Zentrifugation bei 14.000 × G und 4°C von den Zelllysaten entfernt und die Überstände wurden der Immunpräzipitation mit Antiseren unterzogen, die spezifisch für den TIE-2-Rezeptor waren, mit oder ohne Anwesenheit von blockierenden Peptiden, die zu ~20 µg/ml Lysat zugegeben wurden. Die immunpräzipitierten Proteine wurde mittels PAGE (7,5%-iges Laemmli-Gel) aufgetrennt und dann auf PVDF-Membranen elektrotransferiert und entweder mit verschiedenen TIE-2- oder Phosphotyrosin-spezifischen Antiseren inkubiert. Das TIE-2-Protein wurde durch Inkubation der Membran mit HRP verknüpften sekundären Antiseren, gefolgt von Behandlung mit ECL-Reagens (Amersham), sichtbar gemacht.

BEISPIEL 2 – CLONIERUNG UND EXPRESSION DES TIE-2-REZEPTORKÖRPERS FÜR DIE UNTERSUCHUNG DER WECHSELWIRKUNGEN DES TIE-2-LIGANDEN AUF GRUNDLAGE DER AFFINITÄT

[0094] Es wurde ein Expressionskonstrukt hergestellt, das ein sezerniertes Protein ergeben würde, das aus dem gesamten extrazellulären Teil des TIE-2-Rezeptors der Ratte besteht, fusioniert mit der konstanten Region des menschlichen Immunglobulin gamma-1 (IgG1 Fc). Das Fusionsprotein wird als TIE-2-"Rezeptorkörper" (RB) bezeichnet und man würde normalerweise erwarten, daß es aufgrund der Bildung von Disulfidbindungen zwischen einzelnen IgG1 Fc-Schwänzen in Lösung als Dimer existieren würde. Der Fc-Teil des TIE-2-RB wurde wie folgt hergestellt. Ein DNA-Fragment, das den Fc-Teil von menschlichem IgG1 codiert und das sich von der Hinge-Region bis zum Carboxy-Terminus des Proteins erstreckt, wurde aus cDNA von menschlicher Plazenta mittels PCR mit Oligonucleotiden amplifiziert, die den publizierten Sequenzen von menschlichem IgG1 entsprechen; das resultierende DNA-Fragment wurde in einen Plamidvektor cloniert. Geeignete DNA-Restriktionsfragmente aus einem Plasmid, das den TIE-2-Rezeptor voller Länge codiert, und aus dem menschlichen IgG1 Fc-Plasmid wurden auf jeder Seite eines kurzen PCR abgeleiteten Fragments ligiert, das so entworfen wurde, daß es im Rahmen die codierenden Sequenzen des TIE-2-Proteins und des menschlichen IgG1 Fc-Proteins fusionierte. Somit substituierte das resultierende TIE-2-Ectodomäne-Fc-Fusionsprotein exakt das IgG1 Fc an der Region, die die Transmembran- und cytoplasmischen Domänen von TIE-2 überspannt. Ein alternatives Verfahren zur Herstellung von RBs wird bei Goodwin, et al. Cell 73: 447–456 (1993) beschrieben.

[0095] Milligrammmengen an TIE-2 RB wurden durch Clonierung des TIE-2-RB-DNA-Fragments in den Baculovirus-Vektor pVL1393 und anschließende Infektion der Spodoptera frugiperda SF-21AE-Insektenzelllinie erhalten. Alternativ kann die Zelllinie SF-9 (ATCC Zugangs-Nr. CRL-1711) oder die Zelllinie BTI-TN-5b1-4 verwendet werden. Die DNA, die den TIE-2 RB codierte, wurde als ein EcoRI-NotI-Fragment in das Baculovirus-Transferplasmid pVL1393 cloniert. Die durch Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation gereinigte Plasmid-DNA wurde durch Mischen von 3 µg Plasmid-DNA mit 0,5 µg Baculo-Gold-DNA (Pharminigen) in virale DNA rekombiniert, gefolgt von der Einbringung in Liposomen unter Verwendung von 30 µg Lipofectin (GIBCO-BRL). Die DNA-Liposomen-Gemische wurden 5 Stunden bei 27°C zu SF-21AE-Zellen (2×10^6 Zellen/60 mm-Platte) in TMN-FH-Medium (Modified Grace's Insect Cell Medium, Modifiziertes Grace-Insektenzellmedium (GIBCO-BRL) zugegeben, gefolgt von 5 Tagen Inkubation bei 27°C in TMN-FH-Medium, das mit 5% fötalem Kälberserum ergänzt war. Das Gewebekulturmedium wurde für die Plaque-Reinigung von rekombinanten Viren geerntet, die unter Verwendung von zuvor beschriebenen Verfahren durchgeführt wurde (O'Reilly, D. R., L. K. Miller und V. A. Luckow, Baculovirus Expression Vectors – A Laboratory Manual. 1992, New York: W. H. Freeman), außer daß die Agarose-Oberschicht 125 µg/ml X-Gal enthielt

(5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid; GIBCO-BRL). Nach 5 Tagen Inkubation bei 27°C wurden nicht rekombinante Plaques durch ihre positive chromogene Reaktion mit dem X-Gal-Substrat bestimmt und ihre Positionen markiert. Die rekombinanten Plaques wurden dann durch Zugabe einer zweiten Überschicht sichtbar gemacht, die 100 µg/ml MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]2,5,diphenyltetrazoliumbromid; Sigma) enthielt. Vermutlich rekombinante Virusplaques wurden dann durch Aufsaugen mit einem Tampon gesammelt und durch mehrere Runden an Plaqueisolierung gereinigt, um sich der Homogenität zu versichern. Virusstammlösungen wurden durch serielle Passagen mit niedriger Multiplizität von Plaque gereinigtem Virus hergestellt. Es wurden Stammlösungen mit niedrigen Passagen von einem Virusclon (vTIE-2-Rezeptorkörper) produziert.

[0096] Die SF-21AE-Zellen wurden in serumfreiem Medium (SF-900 II, Gibco BRL) gezüchtet, das eine 1 × antibiotische/antimykotische Lösung (Gibco BRL) und 25 mg/l Gentamycin (Gibco BRL) enthielt. Es wurde Pluronic F-68 mit einer Endkonzentration von 1 g/l als grenzflächenaktives Mittel zugegeben. Vor der Infektion wurden mindestens drei Tage Kulturen (41) in einem Bioreaktor (Artisan Cell Station System) gezüchtet. Die Zellen wurden bei 27°C mit Gaszufuhr von zu 50% gelöstem Sauerstoff mit einer Gasflußrate von 80 ml/min (Belüftung an einem Einblasring) gezüchtet. Es wurde mittels eines Schiffspropellers mit einer Rate von 100 UpM gerührt. Die Zellen wurden in einer mittel-logarithmischen Wachstumsphase (–2 × 10^6 Zellen/ml) geerntet, durch Zentrifugation konzentriert und mit 5 plaquebildenden Einheiten des vTIE-2-Rezeptorkörpers pro Zelle infiziert. Die Zellen und das Inokulum wurden mit frischem Medium auf 400 ml gebracht und das Virus wurde 2 Stunden bei 27°C in einem Spinnerkolben adsorbiert. Die Kultur wurde dann mit frischem serumfreiem Medium in einem Endvolumen von 8 l resuspendiert und die Zellen wurden in dem Bioreaktor unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Bedingungen inkubiert.

[0097] Das Zellkulturmedium von mit vTIE-2-Rezeptorkörpern infizierten SF-21AE-Zellen wurde durch Zentrifugation (500 × g, 10 Minuten) 72 Stunden nach der Infektion gesammelt. Die Zellüberstände wurden mit NaOH auf einen pH-Wert von 8 gebracht. Es wurde EDTA mit einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben und der pH-Wert des Überstands wieder auf 8 eingestellt. Die Überstände wurden filtriert (0,45 µm, Millipore) und auf eine Protein A-Säule (Protein A-Sepharose 4 fast flow oder Hi-Trap Protein A, beide von Pharmacia) geladen. Die Säule wurde mit PBS gewaschen, das 0,5 M NaCl enthielt, bis die Absorption bei 280 nm auf die Grundlinie zurückging. Die Säule wurde mit PBS gewaschen und mit 0,5 M Essigsäure eluiert. Die Säulenfraktionen wurden durch Elution in Röhrchen, die 1 M Tris mit einem pH-Wert von 9 enthielten, unmittelbar neutralisiert. Die Peakfraktionen, die den TIE-2-Rezeptorkörper enthielten, wurden vereint und gegen PBS dialysiert.

BEISPIEL 3 – BEWEIS. DASS TIE-2 BEI DER ENTWICKLUNG DES GEFÄSSYSTEMS EINE KRITISCHE ROLLE SPIELT

[0098] Durch Einbringung von "überschüssigem" löslichem TIE-2-Rezeptorkörper (TIE-2 RB) in ein sich entwickelndes System wurde Einblick in die Funktion von TIE-2 gewonnen. Die potentielle Fähigkeit von TIE-2 RB zur Bindung, und damit Neutralisation, von verfügbaren TIE-2-Liganden könnte in einer beobachtbaren Unterbrechung der normalen vaskulären Entwicklung und Charakterisierung des Liganden resultieren. Um zu überprüfen, ob TIE-2 RB verwendet werden könnte, um die vaskuläre Entwicklung in frühen Hühnerembryos zu unterbrechen, wurden kleine Stücke von biologisch resorbierbarem Schaum mit TIE-2 RB getränkt und unmittelbar unterhalb der Chorioallantois-Membran an Positionen genau lateral des primitiven Embryos inseriert.

[0099] Frühe Hühnerembryos entwickeln sich oberhalb des Dotters aus einer kleinen Scheibe von Zellen, die von der Chorioallantois-Membran (CAM) bedeckt ist. Die Endothelzellen, die kommen werden, um das Gefäßsystem im Embryo auszukleiden, entstehen aus extra- und intraembryonalen Zellquellen. Extraembryonal abgeleitete Endothelzellen, die die Hauptquelle für Endothelzellen im Embryo bereitstellen, stammen aus Ablagerungen von Mesenchym, die lateral um den Embryo angeordnet sind – ganz genau unterhalb der CAM. Wenn diese Mesenchymzellen reifen, entstehen aus ihnen gemeinsame Vorläuferzellen von Endothel- und hämatopoietischen Zelllinien, die als Hämangioblasten bezeichnet werden. Aus den Hemangioblasten wiederum entsteht eine gemischte Population von Angioblasten (die Vorläufer der Endothelzellen) und Hämatoblasten (die pluripotenten hämatopoietischen Vorläufer). Die Bildung eines rudimentären Kreislaufsystems beginnt, wenn die Nachkommen der Endothelzellen segregieren, um ein Vesikel von der Dicke einer Zelle zu bilden, die die primitiven Blutzellen umgibt. Die Proliferation und Migration dieser zellulären Komponenten produziert daraufhin ein breites Netzwerk von mit Blut gefüllten Mikrogefäßen unter der CAM, das letztlich in den Embryo eindringt, um sich mit den eingeschränkten, intraembryonal abgeleiteten vaskulären Elementen zu verbinden.

[0100] Frisch befruchtete Hühnereier wurden von Spafas, Inc. (Boston, MA) erhalten und bei 99,5°F und 55% relativer Feuchtigkeit inkubiert. Nach 24 Std. Entwicklung wurde die Eierschale mit 70% Ethanol abgerieben und es wurde ein Zahnarztbohrer verwendet, um ein Loch von 1,5 cm in das stumpfe Ende von jedem Ei zu machen. Die Schalenmembran wur-

de entfernt, um einen Luftraum direkt oberhalb des Embryos zu ergeben. Kleine rechteckige Teile von sterilem Gelfoam (Upjohn) wurden mit einem Skalpell geschnitten und mit gleichen Konzentrationen von TIE-2- oder EHK-1-Rezeptorkörper getränkt. Der EHK-1-Rezeptorkörper wurde, wie in Beispiel 2 dargestellt, unter Verwendung der extrazellulären Domäne von EHK-1 anstelle der extrazellulären Domäne von TIE-2 hergestellt (Maisonpierre et al., Oncogene 8: 3277–3288 (1993)). Jedes Gelfoam-Stück absorbierte etwa 6 µg Protein in 30 µl. Eine sterile Uhrmacherzange wurde verwendet, um in die CAM an einer Position mehrere Millimeter lateral von dem primitiven Embryo einen kleinen Riß zu machen. Der Hauptanteil des Stückes von mit RB getränktem Gelfoam wurde unter die CAM inseriert und die Schale darüber wurde mit einem Stück Klebeband verschlossen. Andere Eier in ähnlichem Stadium wurden parallel mit RB der nicht verwandten, neuronal exprimierten Rezeptortyrosinkinase EHK-1 (Maisonpierre et al., Oncogene 8: 3277–3288 (1993)) behandelt. Die weitere Entwicklung wurde 4 Tage zugelassen und dann wurden die Embryos durch visuelle Inspektion überprüft. Durch sorgfältiges Zerbrechen der Schale in Gefäßen mit gewärmtem PBS und sorgfältiges Wegschneiden des Embryos mit der umgebenden CAM wurden die Embryos entfernt. Von 12 Eiern, die jeweils mit RB behandelt worden waren, hatten sich 6 mit TIE-2 RB und 5 mit EHK-1 RB behandelte Embryos über das Stadium hinaus entwickelt, das zu Beginn des Experiments beobachtet worden war. Zwischen diesen entwickelten Embryos war ein dramatischer Unterschied zu sehen, wie in den **Fig. 1A** und **Fig. 1B** gezeigt. Diejenigen, die mit EHK-1 RB behandelt worden waren, schienen sich relativ normal entwickelt zu haben. Vier der fünf EHK-1-Embryos waren lebensfähig, beurteilt nach der Anwesenheit eines schlagenden Herzens. Darüber hinaus war das extraembryonale Gefäßsystem, das wegen der Anwesenheit von roten Blutzellen visuell in Erscheinung tritt, ausgeprägt und erstreckte sich mehrere Zentimeter lateral unter der CAM. Im Gegensatz dazu waren von den mit TIE-2 RB behandelten Embryos mehrere zurückgeblieben, mit einem Durchmesser im Bereich von 2–5 mm im Vergleich mit den mehr als 10 mm Durchmesser für die EHK-1 RB-Embryos. Alle mit TIE-2 RB behandelten Embryos waren tot und ihre CAMs waren ohne Blutgefäße. Die Fähigkeit von TIE-2 RB zur Blockade der Gefäßentwicklung im Huhn zeigt, daß der TIE-2-Ligand für die Entwicklung des Gefäßsystems notwendig ist.

BEISPIEL 4 – IDENTIFIZIERUNG EINER TIE-2-SPEZIFISCHEN BINDUNGSAKTIVITÄT IN KONDITIONIERTEM MEDIUM VON EINER MIT DEM ras-ONKOGEN TRANSFORMIERTEN C2C12-MYOBLASTENZELLLINIE DER MAUS

[0101] Die Durchmusterung von zehnfach konzentrierten Zell konditionierten Medien (10 × CCM) von verschiedenen Zellinien auf die Anwesenheit von löslicher, TIE-2-sepzifischer Bindungsaktivität (BIAcore; Pharmacia Biosensors, Piscataway, NJ) ergab eine Bindungsaktivität in serumfreiem Medium von mit onkogenem ras transformierten C2C12-Zellen (C2C12-ras), RAT 2-ras (was eine ras transformierte Fibroblastenzelllinie ist), dem menschlichen Glioblastom T98G und der menschlichen Neuroblastom-Zellinie, die als SHEP-1 bekannt ist.

[0102] Das 10 × C2C12-ras-CCM stammte von einer stabil transfizierten Linie von C2C12-Myoblasten, die durch Transfektion mit Standardverfahren auf der Basis von Calciumphosphat mit der T-24-Mutante von H-ras oncogen transformiert worden waren. Ein Expressionsplasmid mit Neomycin-Resistenz auf der Basis von SV40 wurde physikalisch mit dem ras-Expressionsplasmid verknüpft, um die Selektion von transfizierten Clonen zuzulassen. Die resultierenden G418-resistenten ras-C2C12-Zellen wurden routinemäßig als Einzelschicht auf Plastikgefäßen in DMEM/Glutamin/PenicillinStreptomycin gehalten, das mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) ergänzt war. Serumfreies 10 × C2C12-ras-CCM wurde durch 12 Stunden Ausplattieren der Zellen bei 60% Konfluenz in einem serumfreien definierten Medium gemacht. [Zhan und Goldfarb, Mol. Cell. Biol. 6: 3541–3544 (1986); Zhan et al. Oncogene 1: 369–376 (1987)]. Das Medium wurde verworfen und 24 Stunden durch frisches DMEM/Q/P-S ersetzt. Dieses Medium wurde geerntet und die Zellen wurden erneut mit frischem DMEM/Q/P-S versetzt, welches nach weiteren 24 Stunden auch geerntet wurde. Diese CCM wurden mit den Proteaseinhibitoren PMSF (1 mM) und Aprotinin (10 µg/ml) ergänzt und mit sterilen Größenausschlußmembranen (Amicon) zehnfach konzentriert. Die TIE-2-Bindungsaktivität konnte vor der BIAcore-Analyse durch Inkubation des Mediums mit einem Überschuß an TIE-2 RB neutralisiert werden, aber nicht durch Inkubation mit EHK-1 RB.

[0103] Die Bindungsaktivität des 10 × CCM wurde unter Verwendung der Biosensor-Technologie (BIAcore; Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ) gemessen, die biomolekulare Wechselwirkungen in Echtzeit über Oberflächenplasmonenresonanz feststellt. Gereinigter TIE-2 RB wurde über primäre Amine an die Carboxymethyldextranschicht eines CM5 Sensorchips in Forschungsqualität (Pharmacia Biosensors, Piscataway, NJ) gekoppelt. Die Oberfläche des Sensorchips wurde unter Verwendung eines Gemisches aus N-Hydroxysuccinimid (NHS) und N-Ethyl-N'-(3-dimethyaminopropyl)carbodiimid (EDC) aktiviert, gefolgt von Immobilisierung des TIE-2 RB (25 µg/ml, pH 4,5) und Desaktivierung der nicht umgesetzten Stellen mit 1,0 M Ethanolamin (pH 8,5). Eine negative Kontrolloberfläche mit dem EHK-1-Rezeptorkörper wurde auf ähnliche Weise hergestellt.

[0104] Der in dem System verwendete Laufpuffer war HBS (10 mM Hepes, 3,4 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,005% grenzflächenaktives Mittel P20, pH 7,4). Die 10 × CCM-Proben wurden 15 min bei 4°C zentrifugiert und unter Verwendung eines sterilen Filters von 0,45 µm mit niedriger Proteinbindung (Millipore, Bedford, MA) weiter geklärt. Es wurden Dextran (2 ng/ml) und grenzflächenaktives Mittel P20 (0,005%) zu jeder CCM-Probe zugegeben. Teilmengen von 40 µl wurden über die immobilisierte Oberfläche (TIE-2 oder EHK-1) mit einer Flußrate von 5 µl/min injiziert und die Rezeptorbindung wurde 8 min aufgezeichnet. Die Bindungsaktivität (Resonanzeinheiten, RU) wurde als die Differenz zwischen einem Grundlinienwert bestimmt, der 30 s vor der Probeninjektion bestimmt wurde, und der Messung, die 30 s nach der Injektion gemessen wurde. Die Regenerierung der Oberfläche wurde mit einem Puls von 12 µl 3 M $MgCl_2$ erreicht.

[0105] Das Geräuschniveau des Instruments ist 20 RU; somit kann jede Bindungsaktivität mit einem Signal von mehr als 20 RU als echte Wechselwirkung mit dem Rezeptor interpretiert werden. Für die mit C2C12-ras konditionierten Medien waren die Bindungsaktivitäten im Bereich von 60–90 RU für die immobilisierte Oberfläche mit TIE-2 RB. Für dieselben Proben, die auf der immobilisierte Oberfläche mit EHK-1 RB getestet wurden, waren die gemessenen Aktivitäten weniger als 35 RU. Die spezifische Bindung an den TIE-2-Rezeptorkörper wurde durch Inkubation der Proben mit einem Überschuß von löslichem TIE-2 RB oder EHK-1 RB vor dem Testen der Bindungsaktivität bewertet. Die Zugabe von löslichem EHK-1 RB hatte bei keiner der Proben eine Wirkung auf die Bindungsaktivität von TIE-2, während bei der Anwesenheit von löslichem TIE-2 die Bindung an die Oberfläche um zwei Drittel niedriger ist als diejenige, die in der Abwesenheit von TIE-2 gemessen wird. Ein Wiederholungstest unter Verwendung von > 50 × konzentriertem C2C12-ras CCM resultierte in einer vierfachen Verstärkung des TIE-2-spezifischen Bindungssignals über dem Untergrund.

BEISPIEL 5 – C2C12-ras-CCM ENTHÄLT EINE AKTIVITÄT, DIE DIE TYROSIN-PHOSPHORYLIERUNG DES TIE-2-REZEPTORS INDUZIERT

[0106] 10 × C2C12-ras-CCM wurde auf seine Fähigkeit untersucht, die Tyrosin-Phosphorylierung von TIE-2 in ABAE-Zellen zu induzieren. ABAE-Zellen ohne Serum wurden kurz mit C2C12-ras CCM inkubiert, lysiert und der Immunpräzipitation und der Western-Analyse unterzogen, wie vorstehend beschrieben. Die Stimulierung von ABAE-Zellen ohne Serum mit serumfreiem 10 × C2C12-ras-CCM wurde wie folgt durchgeführt. Das Medium von ABAE-Zellen ohne Serum, wie vorstehend beschrieben, wurde entfernt und entweder durch definiertes Medium oder 10 × CCM ersetzt, die vorher auf 37°C erwärmt worden waren. Nach 10 Minuten wurden die Medien entfernt und die Zellen wurden zweimal auf Eis mit einem Überschuß an gekühltem PBS gewaschen, das mit Orthovanadat/NaF/Benzamidin ergänzt war. Die Zelllyse und die TIE-2-spezifische Immunpräzipitation wurden, wie vorstehend beschrieben, durchgeführt.

[0107] ABAE-Zellen, die 10 Minuten mit definiertem Medium inkubiert worden waren, zeigten keine Induktion der Tyrosin-Phosphorylierung von TIE-2, währen die Inkubation mit C2C12-ras-CCM einen mindestens 100-fachen Anstieg bei der Phosphorylierung von TIE-2 stimulierte. Diese Aktivität wurde durch 90 Minuten prä-Inkubation bei Raumtemperatur von 10 × C2C12-ras-CCM mit 13 µg an TIE-2 RB, der an Protein G-Sepharosekügelchen gekoppelt war, fast vollständig vernichtet. Bei Medium, das mit Protein G-Sepharose allein inkubiert worden war, wurde die Phosphorylierungsaktivität nicht vernichtet.

BEISPIEL 6 – EXPRESSIONSCLONIERUNG VON TIE-2-LIGAND

[0108] COS-7-Zellen wurden in Dulbecco modifiziertem Eagle-Medium (DMEM), das 10% fötales Rinderserum (FBS), je 1% Penicillin und Streptomycin (P/S) und 2 mM Glutamin enthielt, in einer Atmosphäre von 5% CO_2 gezüchtet. Die Myoblastenzellinie C2C12-ras der Maus wurde in minimalem essentiellem Eagle-Medium (EMEM) mit 10% FBS, (P/S) und 2 mM Glutamin gezüchtet. Durch Durchmusterung einer C2C12-ras-cDNA-Bibliothek im pJFE14-Vektor, der in COS-Zellen exprimiert wurde, wurden cDNA-Clone voller Länge vom TIE-2-Ligand der Maus erhalten. Dieser Vektor, wie in **Fig. 2** gezeigt, ist eine modifizierte Version des Vektors pSR_α (Takebe et al. 1988, Mol. Cell. Biol. 8: 466–472). Die Bibliothek wurde unter Verwendung der beiden BSTX1-Restriktionsstellen im pJFE14-Vektor erzeugt.

[0109] Die COS-7-Zellen wurden mittels des DEAE-Dextran-Transfektionsprotokolls transient mit der pJFE14-Bibliothek oder Kontrollvektor transfiziert. Kurz gesagt wurden COS-7-Zellen 24 Stunden vor der Transfektion mit einer Dichte von $1,0 \times 10^6$ Zellen/100 mm-Platte ausplattiert. Für die Transfektion wurden die Zellen 3–4 Stunden bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO_2 in serumfreiem DMEM gezüchtet, das 400 µg/ml DEAE-Dextran, 1 µM Chloroquin, 2 mM Glutamin und 1 µg der geeigneten DNA enthielt. Das Transfektionsmedium wurde abgesaugt und 2–3 min durch PBS ersetzt, das 10% DMSO enthielt. Nach dem DMSO-"Schock" wurden die COS-7-Zellen 48 Stunden in DMEM mit 10% FBS, je 1% Penicillin und Streptomycin und 2 mM Glutamin gegeben.

[0110] Weil der TIE-2-Ligand sezerniert wird, war es erforderlich, die Zellen durchlässig zu machen, um die Bindung der Rezeptorkörpersonde an den Ligand nachzuweisen. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gespült und dann 15–30 min bei Raumtemperatur in PBS inkubiert, das 1,8% Formaldehyd enthielt. Die Zellen wurden dann mit PBS gewaschen und 15 min in PBS inkubiert, das 0,1% Triton X-100 und 10% Rinderkälberserum enthielt, um die Zellen durchlässig zu machen und nicht spezifische Bindungsstellen zu blockieren.

[0111] Die Durchmusterung wurde unter Verwendung eines TIE-2-Rezeptorkörpers (RB), der aus der extrazellulären Domäne von TIE-2 bestand, fusioniert mit der konstanten Region von IgG1, durch direkte Lokalisierung der Anfärbung durchgeführt. Dieser Rezeptorkörper wurde, wie in Beispiel 2 dargestellt, hergestellt. Ein Gefäß von 100 mm mit transfizierten, fixierten und durchlässig gemachten COS-Zellen wurde durch 30 min Inkubation mit TIE-2 RB abgesucht. Die Zellen wurden dann zweimal mit PBS gewaschen und zusätzliche 30 min mit PBS/10% Rinderkälberserum/Konjugat aus anti-Mensch IgG-alkalische Phosphatase inkubiert. Nach dreimal Waschen mit PBS wurden die Zellen 30–60 min in alkalischem Phosphatase-Substrat inkubiert. Die Platte wurde dann mikrosokopisch auf die Anwesenheit von gefärbten Zellen inspiziert. Bei jeder gefärbten Zelle wurde unter Verwendung einer Plastikpipettenspitze eine kleine Fläche von Zellen einschließlich der gefärbten Zelle von der Platte abgekratzt und Plasmid-DNA wurde dann gewonnen und verwendet, um sie mit Elektroporation in Bakterienzellen einzubringen. Einzelne Bakterienkolonien, die von der Elektroporation resultierten, wurden aufgenommen und aus diesen Kolonien hergestellte Plasmid-DNA wurde verwendet, um COS-7-Zellen zu transfizieren, die auf die Expression von TIE-2-Ligand überprüft wurden, gezeigt durch die Bindung an TIE-2-Rezeptorkörper. Dies erlaubte die Identifizierung von einzelnen Clonen, die den TIE-2-Ligand codieren. Eine Bestätigung der Expression von TIE-2-Ligand wurde unter Verwendung des in Beispiel 5 dargestellten Verfahrens durch die Phosphorylierung des TIE-2-Rezeptors erhalten. Ein Plasmidclon, der den TIE-2-Ligand codiert, wurde am 7. Oktober 1994 unter der ATCC-Hinterlegungs-Nr. 75910 bei der ATCC hinterlegt uns als "pJFE14, das TIE-2-Ligand codiert" bezeichnet.

BEISPIEL 7 – ISOLIERUNG UND SEQUENZIERUNG DES cDNA-CLONS VOLLER LÄNGE, DER DEN MENSCHLICHEN TIE-2-LIGAND CODIERT

[0112] Eine cDNA-Bibliothek menschlicher fötaler Lunge in lambda gt-10 (vgl. Fig. 3) wurde von Clontech Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA) erhalten. Plaques wurden mit einer Dichte von 1,25 × 10^6/20 × 20 cm-Platte ausplattiert und gemäß Standardverfahren wurden Replica-Filter erhalten (Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2te Ausg., Seite 8.46, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York).

[0113] Die Isolierung von menschlichen tie-2-Ligandenclonen wurde wie folgt durchgeführt. Ein XhoI-Fragment von 2,2 kb von dem hinterlegten tie-2-Ligandclon (ATCC NR. 75910 – vgl. vorstehend Beispiel 6) wurde durch Zufallspriming mit einer spezifischen Aktivität von etwa 5 × 10^8 CpM/ng markiert. Die Hybridisierung wurde bei 65°C in Hybridisierungslösung durchgeführt, die 0,5 mg/ml Lachssamen-DNA enthielt. Die Filter wurden bei 65°C mit 2 × SSC, 0,1% SDS gewaschen und übernacht bei –70°C einem XAR-5 Kodak-Film ausgesetzt. Positive Phagen wurden Plaque-gereinigt. Phagenlysate mit hohem Titer von reinem Phagen wurden unter Verwendung von Standardverfahren mittels einer Qiagen-Säule (Qiagen, Inc., Chatsworth, CA, Katalog 1995, Seite 36) für die Isolierung von DNA verwendet. Die Phagen-DNA wurde mit EcoRI verdaut, um das clonierte cDNA-Fragment für die anschließende Subclonierung freizusetzen. Ein lambda-Phagenvektor, der die menschliche tie-2-Liganden-DNA enthielt, wurde am 26. Oktober 1994 mit der Bezeichnung λgt10 encoding htie-2 ligand 1 (ATCC-Hinterlegungs-Nr. 75928) bei der ATCC hinterlegt. Die Phagen-DNA kann mittels des Didesoxy-Kettenabbruchverfahrens (Sanger, et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 5463–5467) direkt der DNA-Sequenzanalyse unterzogen werden.

[0114] Die Subclonierung der menschlichen tie-2-Liganden-DNA in einen Säuger-Expressionsvektor kann wie folgt durchgeführt werden. Der Clon λgt10, der htie-2 Ligand 1 codiert, enthält eine EcoRI-Stelle, die 490 Basenpaare stromabwärts vom Anfang der codierenden Sequenz für den menschlichen TIE-2-Liganden liegt. Die codierende Region kann unter Verwendung der einmaligen Restriktionsstellen stromaufwärts und stromabwärts der jeweiligen Initiator- und Stopp-Codons ausgeschnitten werden. Zum Beispiel kann eine SpeI-Stelle, die 70 bp 5' vom Initiator-Codon liegt, und eine Bpu1102i(auch bekannt als B1pI)-Stelle, die 265 bp 3' vom Stopp-Codon liegt, verwendet werden, um die vollständige codierende Region auszuschneiden. Diese kann dann unter Verwendung der XbaI-(kompatibel mit dem SpeI-Überhang) und der PstI-Stelle(die PstI- und die Bpu1102i-Stelle werden beide stumpfendig gemacht) in den pJFE14-Clonierungsvektor subcloniert werden.

[0115] Die codierende Region von Clon λgt10, die den htie-2 Ligand 1 codiert, wurde unter Verwendung des ABI 373A DNA-Sequenziergeräts und des Taq Dideoxy Terminator Cycle-Sequenzierungskits (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) sequenziert. Die Nucleotid- und die abgeleitete Aminosäurese-

quenz des menschlichen TIE-2-Liganden vom Clon λgt10, der den htie-2 Ligand 1 codiert, ist in Fig. 4 gezeigt.

[0116] Außerdem wurden cDNA-Clone voller Länge des menschlichen TIE-2-Liganden durch Durchmusterung einer menschlichen Glioblastom T98G-cDNA-Bibliothek in dem Vektor pJFE14 erhalten. Clone, die den menschlichen TIE-2-Ligand codierten, wurden durch DNA-Hybridisierung unter Verwendung eines XhoI-Fragments von 2,2 kb von dem hinterlegten tie-2-Ligandenclon (ATCC-NR. 75910) als Sonde identifiziert (vgl. vorstehend Beispiel 6). Die codierende Region wurde unter Verwendung des ABI 373A-DNA-Sequenziergeräts und des Taq Dideoxy Terminator Cycle-Sequenzierungskits (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) sequenziert. Diese Sequenz war nahezu identisch zu der von Clon λgt10, die den htie-2 Ligand 1 codiert. Wie in Fig. 4 gezeigt, enthält der Clon λgt10, der den htie-2 Ligand 1 codiert, einen zusätzlichen Glycinrest, der von den Nucleotiden 1114–1116 codiert wird. Die codierende Sequenz des T98G-Clons enthält diesen Glycinrest nicht, ist aber ansonsten identisch mit der codierenden Sequenz des Clons λgt10, der den htie-2 Ligand 1 codiert. Die Fig. 5 stellt die Nucleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz des menschlichen TIE-2-Liganden vom T98G-Clon dar.

BEISPIEL 8 – ISOLIERUNG UND SEQUENZIERUNG EINES ZWEITEN cDNA-CLONS VOLLER LÄNGE, DER DEN MENSCHLICHEN TIE-2-LIGAND CODIERT

[0117] Eine cDNA-Bibliothek menschlicher fötaler Lunge in lambda gt-10 (vgl. Fig. 3) wurde von Clontech Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA) erhalten. Plaques wurden mit einer Dichte von $1{,}25 \times 10^6$/20 × 20 cm-Platte ausplattiert und gemäß Standardverfahren wurden Replica-Filter erhalten (Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2te Ausg., Seite 8.46, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Duplizierte Filter wurden bei niedriger Stringenz (2 × SSC, 55°C) mit Sonden durchmustert, die für die menschliche TIE-2-Ligand 1-Sequenz gemacht worden waren. Einer der duplizierten Filter wurde mit einer 5'-Sonde hybridisiert, die die Aminosäuren 25–265 der menschlichen TIE-2-Ligand 1-Sequenz codiert, wie in Fig. 4 dargestellt. Der zweite duplizierte Filter wurde mit einer 3'-Sonde abgesucht, die die Aminosäuren 282–498 der menschlichen TIE-2-Ligand 1-Sequenz codiert (vgl. Fig. 4). Beide Sonden wurden bei 55°C in einer Hybridisierungslösung hybridisiert, die 0,5 mg/ml Lachssamen-DNA enthielt. Die Filter wurden bei 55°C in 2 × SSC gewaschen und übernacht einem Röntgenfilm ausgesetzt. Außerdem wurden duplizierte Filter auch bei normaler Stringenz (2 × SSC, 65°C) mit der codierenden Sonde voller Länge des TIE-2-Liganden 1 der Maus hybridisiert (F3-15, XhoI-Insertion). Es wurden drei positive Clone aufgenommen, die folgenden Kriterien erfüllten: i. bei normaler Stringenz wurde keine Hybridisierung mit der Sonde voller Länge (Maus) gesehen, und ii. bei niedriger Stringenz wurde eine Hybridisierung mit den 5'- und 3'-Sonden gesehen. Der EcoRI-Verdau von Phagen-DNA, die aus diesen Clonen erhalten wurde, zeigte zwei unabhängige Clone mit einer Größe der Insertionen von etwa 2,2 kb und etwa 1,8 kb. Die EcoRI-Insertion von 2,2 kb wurde in die EcoRI-Stellen sowohl von pBluescript KS (Stratagene) als auch in einen Säugerexpressionsvektor zur Verwendung in COS-Zellen subcloniert. Für den Säugerexpressionsvektor wurden zwei Orientierungen identifiziert. Die Insertion von 2,2 kb in pBluescript KS wurde am 9. Dezember 1994 bei der ATCC hinterlegt und als pBluescript KS encoding human TIE 2 Ligand 2 bezeichnet. Die Startstelle der codierenden Sequenz für den TIE-2-Ligand ist etwa 355 Basenpaare stromabwärts der EcoRI-Stelle von pBluescript.

[0118] Die COS-Zellen wurden gemäß dem DEAE-Dextran-Transfektionsprotokoll transient entweder mit dem Expressionsvektor oder dem Kontrollvektor transfiziert. Kurz gesagt wurden COS-7-Zellen 24 Stunden vor der Transfektion mit einer Dichte von $1{,}0 \times 10^6$ Zellen/100 mm-Platte ausplattiert. Für die Transfektion wurden die Zellen 3–4 Stunden bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO_2 in serumfreiem DMEM gezüchtet, das 400 µg/ml DEAE-Dextran, 1 µM Chloroquin, 2 mM Glutamin und 1 µg der geeigneten DNA enthielt. Das Transfektionsmedium wurde abgesaugt und 2–3 min durch phosphatgepufferte Salzlösung mit 10% DMSO ersetzt. Nach diesem DMSO-"Schock" wurden die COS-7-Zellen 48 Stunden in DMEM mit 10% FBS, je 1% Penicillin und Streptomycin und 2 mM Glutamin gegeben.

[0119] Weil der TIE-2-Ligand sezerniert wird, war es erforderlich, die Zellen durchlässig zu machen, um die Bindung der Rezeptorkörpersonde an den Ligand nachzuweisen. Transfizierte COS-7-Zellen wurden mit einer Dichte von $1{,}0 \times 10^6$ Zellen/100 mm-Platte ausplattiert. Die Zellen wurden mit PBS gespült und dann 15–30 min bei Raumtemperatur in PBS inkubiert, das 1,8% Formaldehyd enthielt. Die Zellen wurden dann mit PBS gewaschen und 15 min in PBS inkubiert, das 0,1% Triton X-100 und 10% Rinderkälberserum enthielt, um die Zellen durchlässig zu machen und nicht spezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Durchmusterung wurde unter Verwendung eines TIE-2-Rezeptorkörpers, der aus der extrazellulären Domäne von TIE-2 bestand, fusioniert mit der konstanten Region von IgG1, durch direkte Lokalisierung der Anfärbung durchgeführt. Dieser Rezeptorkörper wurde, wie in Beispiel 2 dargestellt, hergestellt. Die transfizierten COS-Zellen wurden durch 30 min Inkubation mit dem TIE-2-Rezeptorkörper hybridisiert. Die Zellen wurden dann zweimal mit PBS gewaschen, mit Methanol fixiert und dann zu-

sätzliche 30 min mit PBS/10% Rinderkälberserum/Konjugat aus anti-Mensch IgG-alkalische Phosphatase inkubiert. Nach dreimal Waschen mit PBS wurden die Zellen 30–60 min in alkalischem Phosphatase-Substrat inkubiert. Die Platte wurde dann mikrosokopisch auf die Anwesenheit von gefärbten Zellen inspiziert. Bei Zellen, die eine Orientierung des Clons exprimierten, aber nicht die andere Orientierung, wurde die Bindung des TIE-2-Rezeptorkörpers gesehen.

[0120] Ein Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet wird leicht einsehen, daß die beschriebenen Verfahren auch zur weiteren Identifizierung von anderen verwandten Mitgliedern der TIE-2-Ligand-Familie verwendet werden können.

[0121] Die codierende Region aus dem Clon pBluescript KS, die den menschlichen TIE-2-Ligand 2 codiert, wurde unter Verwendung des ABI 373A-DNA-Sequenziergeräts und des Taq Dideoxy Terminator Cycle-Sequenzierungskitst (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) sequenziert. Die Nucleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz des menschlichen TIE-2-Liganden vom Clon pBluescript KS, der den menschlichen TIE-2-Ligand 2 codiert, ist in **Fig. 6** gezeigt.

BEISPIEL 9 – DER TIE-2-LIGAND 2 IST EIN REZEPTORANTAGONIST

[0122] Die konditionierten Medien von COS-Zellen, die entweder den TIE-2-Ligand 2 (TL2) oder den TIE-2-Ligand 1 (TL1) exprimierten, wurden bezüglich ihrer Fähigkeit verglichen, TIE-2-Rezeptoren zu aktivieren, die natürlicherweise in menschlichen Endothezellinien anwesend sind.

[0123] Es wurden das Lipofectamin-Reagens (GIBCO-BRL, Inc.) und empfohlene Protokolle verwendet, um COS-7-Zellen mit entweder dem pJFE14-Expressionsvektor allein, dem pJFE14-Vektor, der die cDNA des menschlichen TIE-2-Liganden 1 enthält, oder einem pMT21-Expressionsvektor (Kaufmann, R. J., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 689–693), der die cDNA des menschlichen TIE-2-Liganden 2 enthält, zu transfizieren. Die COS-Medien, die die sezernierten Liganden enthielten, wurden nach drei Tagen geerntet und mittels Diafiltration (DIAFLO-Ultrafiltrationsmembranen, Amicon, Inc.) 20-fach konzentriert. Die Menge an aktivem TIE-2-Ligand 1 und TIE-2-Ligand 2, die in diesen Medien vorhanden war, wurde als die mittels eines BIAcore-Bindungstests gemessene Menge (in Resonanzeinheiten, R.U.) an spezifischer Bindungsaktivität des TIE-2-Rezeptors bestimmt und ausgedrückt.

[0124] Die Northern(RNA)-Analyse zeigte signifikante Niveaus an TIE-2-Transkripten in menschlichen primären HAEC-(Human Aortic Endothelial Cell, menschliche Aona-Endothelzellen)Endothelzellen (Clonetics, Inc.). Deshalb wurden diese Zellen verwendet, um zu überprüfen, ob der TIE-2-Rezeptor am Tyrosin phosphoryliert wird, wenn er COS-Medien ausgesetzt wird, die die TIE-2-Liganden enthalten. Die HAEC-Zellen wurden in einem kompletten Endothelzell-Wachstumsmedium (Clonetics, Inc.) gehalten, das 5% fötales Rinderserum, löslichen Rinderhirnextrakt, 10 ng/ml menschlichen EGF, 1 mg/ml Hydrocortison, 50 mg/ml Gentamicin und 50 ng/ml Amphotericin-B enthielt. Die Beurteilung, ob TL1 und TL2 den TIE-2-Rezeptor in den HAEC-Zellen aktivieren konnten, wurde wie folgt vorgenommen. Semikonfluente HAEC-Zellen wurden zwei Stunden bei 37°C in Hochglucose-Dulbecco-MEM mit zugegebenem L-Glutamin und Penicillin-Streptomycin ohne Serum gehalten, wonach das Mangel-Medium 7 Minuten bei 37°C in einem Inkubator mit 5% CO_2 durch ein Ligand enthaltendes konditioniertes COS-Medium ersetzt wurde. Die Zellen wurden anschließend lysiert und das TIE-2-Rezeptorprotein wurde durch Immunpräzipitation der Lysate mit einem TIE-2-Peptid-Antiserum gewonnen, gefolgt von Western-Blotting mit Antiphosphotyrosin-Antiserum, genau wie in Beispiel 1 beschrieben. Die Resultate sind in **Fig. 7** gezeigt. Die Phosphotyrosin-Niveaus auf dem TIE-2-Rezeptor (TIE-2-R) wurde durch die Behandlung von HAEC-Zellen mit konditionierten COS-Medien des TIE-2-Liganden 1 induziert (Spur L1), aber nicht des TIE-2-Liganden 2 (Spur L2). MOCK ist konditioniertes Medium von COS, die mit leerem JFE14-Vektor transfiziert wurden.

[0125] Der Nachweis, daß sowohl TL1 als auch TL2 spezifisch an den TIE-2-Rezeptor binden, wurde unter Verwendung eines BIAcore, um die TIE-2-Rezeptor-spezifischen Bindungsaktivitäten in transfizierten COS-Medien zu testen, und durch Immunfärbung von TL1 und TL2 exprimierenden COS-Zellen mit TIE-2-Rezeptorkörpern geführt.

[0126] Weil TL2 den TIE-2-Rezeptor nicht aktivierte, nahmen sich die Anmelder vor zu bestimmen, ob TL2 in der Lage sein könnte, als Antagonist der Aktivität von TL1 zu dienen. Es wurden HAEC-Phosphorylierungtests durchgeführt, bei denen Zellen zunächst mit einem "Überschuß" an TL2 inkubiert wurden, gefolgt von der Zugabe von verdünntem TL1. Es wurde argumentiert, daß die vorherige Besetzung des TIE-2-Rezeptors wegen hoher Niveaus an TL2 die anschließende Stimulierung des Rezeptors nach Einwirken von TL1 verhindern könnte, das mit limitierter Konzentration anwesend ist.

[0127] Semikonfluente HAEC-Zellen wurden ohne Serum gezüchtet, wie vorstehend beschrieben, und dann 3 min bei 37°C mit 1–2 ml konditioniertem Medium von 20 × COS/JFE14-TL2 inkubiert. Kontrollplatten wurden mit 20 × COS/JFE14-allein-Medium (MOCK) behandelt. Die Platten wurden aus dem In-

kubator entfernt und verschiedene Verdünnungen von COS/JFE14-TL1-Medium wurden dann zugegeben, gefolgt von weiteren 5–7 min Inkubation der Platten bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen gespült, lysiert und die TIE-2-spezifische Tyrosinphosphorylierung in den Lysaten wurde, wie vorstehend beschrieben, mittels Immunpräzipitation des Rezeptors und Western-Blotting untersucht. Die TL1-Verdünnungen wurden unter Verwendung von 20 × COS/JFE14-TL1-Medium gemacht, die durch Zugabe von 20 × COS/JFE14-allein-Medium auf 2 ×, 0,5 ×, 0,1 × oder 0,02 × verdünnt waren. Ein Test mit den ursprünglichen 20 × TL1- und 20 × TL2-COS-Medien unter Verwendung der BIAcore-Biosensortechnologie zeigte, daß sie ähnliche Mengen an TIE-2-spezifischen Bindungsaktivitäten enthielten, d. h. 445 R.U. und 511 R.U. für TL1 bzw. TL2. Die in Fig. 8 gezeigten Resultate für den Antiphosphotyrosin-Western-Blot zeigen, daß im Vergleich mit der vorherigen Behandlung von HAEC-Zellen mit MOCK-Medium (Spur 1) die vorherige Behandlung von HAEC-Zellen mit einem Überschuß an TIE-2-Ligand 2 (Spur 2) die anschließende Fähigkeit von verdünntem TIE-2-Ligand 1 zur Aktivierung des TIE-2-Rezeptors (TIE-2-R) antagonisiert.

[0128] Die Fähigkeit von TL2 zur kompetitiven Inhibition der TL1-Aktivierung von TIE-2-R wurde weiterhin unter Verwendung der menschlichen Zellhybridlinie EA.hy926 gezeigt (vgl. Beispiel 21 für eine detaillierte Beschreibung dieser Zellinie und ihrer Erhaltung). Es wurden Experimente durchgeführt, bei denen nicht konzentrierte COS-Zell-Medien, die TL1 enthielten, mit verschiedenen Verdünnungen von MOCK- oder TL2-konditionierten Medien gemischt wurden und 5 Minuten bei 37°C auf Zelleinzelschichten von EA.hy926, ohne Serum ausgehungert waren, gegeben wurden. Die Medien wurden dann entfernt, die Zellen wurden durch Lyse geerntet und die TIE-2-spezifische Tyrosinphosphorylierung wurde durch Western-Blots untersucht, wie vorstehend beschrieben. Die Fig. 9 zeigt ein Experiment, das drei Gruppen von Behandlungen enthält, von links nach rechts gesehen. Wie in den vier Spuren links gezeigt, aktivierte die Behandlung der EA.hy926-Zellen mit 1 × COS-TL1 allein kräftig den endogenen TIE-2-R in diesen Zellen während 1 × TL2 COS-Medium inaktiv war. Gemische von TL1 jedoch mit entweder MOCK oder TL2 zeigten, daß TL2 die Aktivität von TL1 in dosisabhängiger Weise blockieren kann. Bei den zentralen drei Paaren an Spuren wurde das Verhältnis von TL2 (oder MOCK) herabgesetzt, während die Menge an TL1 in dem Gemisch entsprechend von 0,1 × auf 0,3 × erhöht wurde. Bei jedem dieser Mischungsverhältnisse zeigte die TL1 : TL2-Spuren ein reduziertes Niveau von TIE-2-R-Phosphorylierung, verglichen mit der der entsprechenden TL1 : MOCK-Spuren. Wenn jedoch die Menge an TL1 stabil gehalten wurde und die Menge an TL2 (oder MOCK) vermindert wurde (gezeigt in den drei rechten Paaren von Spuren), war ein Punkt erreicht, an dem TL2 in der Probe zu verdünnt war, um effektiv die TL1-Aktivität zu inhibieren. Die relative Menge an jedem Ligand, der in diesen konditionierten COS-Medien vorhanden war, konnte von ihren Bindungseinheiten abgeschätzt werden, gemessen mittels des BIAcore-Tests, und von den Western-Blots der COS-Medien mit Liganden-spezifischen Antikörpern. Folglich können wir schließen, daß nur ein wenigfacher molarer Überschuß an TL2 erforderlich ist, um die Aktivität von TL1 in vitro effektiv zu blockieren. Dies ist wichtig, weil wir in vivo deutliche Beispiele (vgl. Beispiel 17 und Fig. 16) beobachtet haben, bei denen TL2-mRNAs einen beträchtlichen Überschuß im Vergleich zu denen von TL1 erreichen. Somit könnte TL2 eine wichtige physiologische Rolle bei der effektiven Blockade der Signalübertragung durch den TIE-2-R an diesen Stellen spielen.

[0129] Zusammengenommen bestätigen diese Daten, daß TL2, anders als TL1, nicht in der Lage ist, endogen exprimierten TIE-2-R auf Endothelzellen zu stimulieren. Darüber hinaus kann ein wenigfacher molarer Überschuß an TL2 die TL1-Stimulierung des TIE-2-Rezeptors blockieren, was anzeigt, daß TL2 ein natürlicherweise vorkommender TIE-2-Rezeptorantagonist ist.

BEISPIEL 10 – IDENTIFIZIERUNG DER TIE-2-SPEZIFISCHEN BINDUNGSAKTIVITÄT IN KONDITIONIERTEM MEDIUM UND COS-ZELLÜBERSTÄNDEN

[0130] Die Bindungsaktivität von 10 × CCM von den Zellinien C2C12-ras, Rat2-ras, SHEP und T98G oder COS-Zellüberständen nach der Transfektion mit entweder menschlichem TIE-2-Ligand 1 (hTL1) oder menschlichem TIE-2-Ligand 2 (hTL2) wurde unter Verwendung der Biosensortechnologie gemessen (BIAcore; Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ), die die biomolekularen Wechselwirkungen in Echtzeit über die Oberflächenplasmon-Resonanz (SPR) verfolgt. Gereinigter TIE-2 RB der Ratte oder des Menschen wurde über primäre Amine kovalent an die Carboxymethyldextranschicht eines CM5 Sensorchips in Forschungsqualität (Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ) gekoppelt. Die Oberfläche des Sensorchips wurde unter Verwendung eines Gemisches aus N-Hydroxysuccinimid (NHS) und N-Ethyl-N'-(3-dimethyaminopropyl)carbodiimid (EDC) aktiviert, gefolgt von Immobilisierung des TIE-2 RB (25 µg/ml, pH 4,5) und Desaktivierung der nicht reagierten Stellen mit 1,0 M Ethanolamin (pH 8,5). Im Allgemeinen wurden 9000–10000 RU von jedem Rezeptorkörper an den Sensorchip gekoppelt.

[0131] Der in dem System verwendete Laufpuffer war HBS (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,005% grenzflächenaktives Mittel P20, pH 7,4). Die Proben wurden 15 min bei 4°C zentrifugiert und unter Ver-

wendung eines sterilen Filters von 0,45 µm mit niedriger Proteinbindung (Millipore, Bedford, MA) weiter geklärt. Es wurden Dextran (2 mg/ml) und grenzflächenaktives Mittel P20 (0,005%) zu jeder Probe zugegeben. Teilmengen von 40 µl wurden über die immobilisierte Oberfläche (TIE-2 von der Ratte oder vom Menschen) mit einer Flußrate von 5 µl/min injiziert und die Rezeptorbindung wurde 8 min aufgezeichnet. Die Bindungsaktivität (Resonanzeinheiten, RU) wurde als die Differenz zwischen einem Grundlinienwert, der 30 s vor der Probeninjektion bestimmt wurde, und einer Messung, die 30 s nach der Injektion gemessen wurde, bestimmt. Die Regenerierung der Oberfläche wurde mit einem Puls von 15 µl 3 M $MgCl_2$ erreicht.

[0132] Die CCM-Proben (C2C12-ras, Rat2-ras, SHEP und T98G) wurden auf der immobilisierten Oberfläche des TIE-2 RB der Ratte getestet, während rekombinanter hTL1 und hTL2 auf der immobilisierten Oberfläche des TIE-2 RB des Menschen getestet wurden. In jedem Fall wurde die spezifische Bindung des TIE-2-Rezeptorkörpers vor dem Testen auf die Bindungsaktivität durch Inkubation der Proben mit 25 µg/ml von entweder löslichem TIE-2 (Ratte oder Mensch) RB oder trkB RB bewertet. Wie in den Fig. 10 und Fig. 11 gezeigt, verursacht die Zugabe von löslichem trkB RB eine leichte Abschwächung bei der TIE-2-Bindungsaktivität, während die Zugabe von löslichem TIE-2 RB die Bindungsaktivität verglichen mit der, die bei Abwesenheit von TIE-2 RB gemessen wurde, signifikant reduziert.

BEISPIEL 11 – TIE-2 RB BLOCKIERT SPEZIFISCH DIE AKTIVIERUNG DES TIE-2-REZEPTORS DURCH DEN TIE-2-LIGAND 1

[0133] Die Anmelder versuchten zu bestimmen, ob löslicher TIE-2 RB als kompetitiver Inhibitor für die Blockierung der Aktivierung des TIE-2-Rezeptors durch den TIE-2-Ligand 1 (TL1) dienen kann. Dazu wurden TL1 enthaltende COS-Medien entweder mit TIE-2- oder trkB-RB präinkubiert und dann bezüglich ihrer Fähigkeit zur Aktivierung des TIE-2-Rezeptors verglichen, der natürlicherweise in einer menschlichen Endothezellinie vorhanden ist.

[0134] Konditionierte COS-Medien wurden von COS-7-Zellen erzeugt, die entweder mit dem pJFE14-Expressionsvektor allein (MOCK) oder mit dem pJFE14-Vektor, der die cDNA des menschlichen TIE-2-Liganden 1 (TL1) enthielt, transfiziert worden waren, und geerntet, wie hier vorstehend in Beispiel 9 beschrieben, mit der Ausnahme, daß die Medien steril filtriert, aber nicht konzentriert wurden. Die Menge an TL1 wurde bestimmt und als die Menge (in Resonanzeinheiten, R.U.) an TIE-2-Rezeptor-spezifischer Bindungsaktivität ausgedrückt, die mittels des BIAcore-Bindungstests gemessen wurde.

[0135] Die Northern(RNA)-Analyse ergab signifikante Niveaus an tie-2-Transkripten in menschlichen primären HUVEC-(Human Umbilical Vein Endothelial Cell, menschliche Nabelvenen-Endothelzelle)Endothelzellen (Clonetics, Inc.). Deshalb wurden diese Zellen verwendet, um zu bestimmen, ob der TIE-2-Rezeptor am Tyrosin phosphoryliert werden kann, wenn er in der Anwesenheit von TIE-2- oder TrkB-RBs mit COS-Medien in Berührug kommt, die TL1 enthalten. Die HUVEC-Zellen wurden bei 37°C, 5% CO_2 in einem vollständigen Endothelzell-Wachstumsmedium (Clonetics, Inc.) gehalten, das 5% fötales Rinderserum, löslichen Rinderhirnextrakt mit 10 µg/ml Heparin, 10 ng/ml menschlichen EGF, 1 µg/ml Hydrocortison, 50 µg/ml Gentamicin und 50 ng/ml Amphotericin-B enthielt. Die Bewertung, ob TL1 in den HUVEC-Zellen den TIE-2-Rezeptor aktivieren konnte, wurde wie folgt vorgenommen. Konfluente Platten mit HUVEC-Zellen wurden für zwei bis vier Stunden bei 37°C, 5% CO_2, in Dulbecco-MEM mit niedrigem Glucosegehalt ohne Serum ausgehungert, gefolgt von 10 Minuten Inkubation in Hunger-Medium, das 0,1 mM Natriumorthovanadat enthielt, einen potenten Inhibitor von Phosphotyrosin-Phophatasen. Unterdessen wurden konditionierte COS-Medien 30 min bei Raumtemperatur mit entweder TIE-2- oder TrkB-RB präinkubiert, die mit 50 µg/ml zugegeben wurden. Das Hunger-Medium wurde dann von den HUVEC-Platten entfernt und mit den RB enthaltenden COS-Medien 7 Minuten bei 37°C inkubiert. Die HUVEC-Zellen wurden anschließend lysiert und das TIE-2-Rezeptorprotein wurde mittels Immunpräzipitation mit TIE-2-Peptidantiserum gewonnen, gefolgt von Western-Blotting mit einem Antiphosphotyrosin-Antikörper, wie in Beispiel 1 beschrieben. Die Resultate sind in Fig. 12 gezeigt. Die Phosphotyrosinniveaus an dem TIE-2-Rezeptor wurden durch die Behandlung von HUVEC-Zellen mit TIE-2-Ligand 1 (TL1) im Verhältnis zu denjenigen induziert, die bei Kontrollmedium (MOCK) gesehen wurden, und diese Induktion wird spezifisch durch vorherige Inkubation mit TIE-2-RB (TIE-2-Fc), aber nicht durch Inkubation mit TrkB-RB (TrkB-Fc) blockiert. Diese Daten zeigen, daß löslicher TIE-2-RB als ein selektiver Inhibitor für die Blockade der TIE-2-Rezeptor-Aktivierung durch den TIE-2-Ligand 1 dienen kann.

BEISPIEL 12 – KONSTRUKTION VON TIE-2-LIGANDENKÖRPER

[0136] Es wurde ein Expressionskonstrukt geschaffen, das ein sezerniertes Protein ergeben würde, das aus der gesamten codierenden Sequenz des menschlichen TIE-2-Liganden 1 (TL1) oder TIE-2-Liganden 2 (TL2), fusioniert mit der konstanten Region des menschlichen Immunglobulin gamma-1 (IgG1 Fc), besteht. Diese Fusionproteine werden TIE-2-"Ligandenkörper" (TL1-Fc oder TL2-Fc) genannt. Der Fc-Teil von TL1-Fc und TL2-Fc wurde wie folgt hergestellt. Ein DNA-Fragment, das den Fc-Teil von

menschlichem IgG1 codiert und das sich von der Gelenk-Region bis zum Carboxy-Terminus des Proteins erstreckt, wurde aus cDNA von menschlicher Plazenta mittels PCR mit Oligonucleotiden amplifiziert, die den publizierten Sequenzen von menschlichem IgG1 entsprechen; das resultierende DNA-Fragment wurde in einen Plamidvektor cloniert. Geeignete DNA-Restriktionsfragmente aus einem Plasmid, das TL1 oder TL2 voller Länge codiert, und aus dem menschlichen IgG1 Fc-Plasmid wurden auf jeder Seite eines kurzen PCR abgeleiteten Fragments ligiert, das so entworfen wurde, daß es im Rahmen TL1 oder TL2 mit den codierenden Sequenzen des menschlichen IgG1 Fc-Proteins fusionierte.

[0137] Milligrammengen an TL2-Fc wurden durch Clonierung des TL2-Fc-DNA-Fragments in den Baculovirus-Vektor pVL1393 und anschließende Infektion der Spodoptera frugiperda SF-21AE-Insektenzelllinie erhalten. Alternativ kann die Zelllinie SF-9 (ATCC-Zugangs-Nr. CRL-1711) oder die Zelllinie BTI-TN-5b1-4 verwendet werden. Die DNA, die TL2-Fc codierte, wurde als ein Eco RI-NotI-Fragment in das Baculovirus-Transferplasmid pLV1393 cloniert. Plasmid-DNA wurde durch Mischen von 3 µg Plasmid-DNA mit 0,5 µg Baculo-Gold-DNA (Pharminigen) in virale DNA rekombiniert, gefolgt von der Einbringung in Liposomen unter Verwendung von 30 µg Lipofectin (GIBCO-BRL). Die DNA-Liposomen-Gemische wurden 5 Stunden bei 27°C zu SF-21AE-Zellen (2×10^6 Zellen/60 mm-Platte) in TMN-FH-Medium (Modifiziertes Grace-Insektenzellmedium (GIBCO-BRL) zugegeben, gefolgt von 5 Tagen Inkubation bei 27°C in TMN-FH-Medium, das mit 5% fötalem Kälberserum ergänzt war. Das Gewebekulturmedium wurde für die Plaque-Reinigung von rekombinanten Viren geerntet, die unter Verwendung von zuvor beschriebenen Verfahren durchgeführt wurde (O'Reilly, D. R., L. K. Miller und V. A. Luckow, Baculovirus Expression Vectors – A Laboratory Manual. 1992, New York: W. H. Freeman), außer daß die Agarose-Oberschicht 125 mg/ml X-Gal enthielt (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-b-D-Galactopyranosid; GIBCO-BRL). Nach 5 Tagen Inkubation bei 27°C wurden nicht rekombinante Plaques durch ihre positive chromogene Reaktion mit dem X-Gal-Substrat bestimmt und ihre Positionen markiert. Die rekombinanten Plaques wurden dann durch Zugabe einer zweiten Überschicht sichtbar gemacht, die 100 mg/ml MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]2,5,diphenyltetrazoliumbromid; Sigma) enthielt. Vermutlich rekombinante Virusplaques wurden dann durch Aufsaugen mit einem Tampon gesammelt und durch mehrere Runden an Plaqueisolierung gereinigt, um sich der Homogenität zu versichern. Virusstammlösungen wurden durch serielle Passagen mit niedriger Multiplizität von Plaque-gereinigtem Virus hergestellt. Es wurden Stammlösungen mit niedrigen Passagen von einem Virusclon (vTL2-Fc Clon #7) produziert.

[0138] SF-21AE-Zellen wurden in serumfreiem Medium (SF-900 II, Gibco BRL) gezüchtet, das 1 × antibiotische/antimycotische Lösung (Gibco BRL) und 25 mg/ml Gentamycin (Gibco BRL) enthielt. Als grenzflächenaktiver Stoff wurde Pluronic F-68 mit einer Endkonzentration von 1 g/l zugegeben. Die Kulturen (41) wurden vor der Infektion mindestens drei Tage in einem Bioreaktor (Artisan Cell Station System) gezüchtet. Die Zellen wurden unter Begasung von zu 50% gelöstem Sauerstoff mit einer Gasflußrate von 80 ml/min (Belüftung an einem Einblasring) bei 27°C wachsen gelassen. Es wurde mittels eines Schiffspropellers mit einer Rate von 100 UpM gerührt. Die Zellen wurden in einer mittel-logarithmischen Wachstumsphase (~2×10^6 Zellen/ml) geerntet, durch Zentrifugation konzentriert und mit 5 plaquebildenden Einheiten von vTL2-Fc pro Zelle infiziert. Die Zellen und das Inokulum wurden mit frischem Medium auf 400 ml gebracht und das Virus wurde 2 Stunden bei 27°C in einem Spinnerkolben adsorbiert. Die Kultur wurde dann mit frischem serumfreiem Medium in einem Endvolumen von 8 l resuspendiert und die Zellen wurden in dem Bioreaktor unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Bedingungen inkubiert.

[0139] Das Kulturmedium von mit vTL2-Fc infizierten SF21AE-Zellen wurde durch Zentrifugation (500 × g, 10 Minuten) 72 Stunden nach der Infektion gesammelt. Die Zellüberstände wurden mit NaOH auf einen pH-Wert von 8 gebracht. Es wurde EDTA mit einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben und der pH-Wert des Überstands wieder auf 8 eingestellt. Die Überstände wurden filtriert (0,45 µm, Millipore) und auf eine Protein A-Säule (Protein A-Sepharose 4 fast flow oder HiTrap Protein A, beide von Pharmacia) geladen. Die Säule wurde mit PBS gewaschen, das 0,5 M NaCl enthielt, bis die Absorption bei 280 nm auf die Grundlinie zurückging. Die Säule wurde mit PBS gewaschen und mit 0,5 M Essigsäure eluiert. Die Säulenfraktionen wurden durch Elution in Röhrchen, die 1 M Tris mit einem pH-Wert von 9 enthielten, unmittelbar neutralisiert. Die Peakfraktionen, die den TL2-Fc enthielten, wurden vereint und gegen PBS dialysiert.

BEISPIEL 13 – EXPRESSION VON TIE-1, TIE-2, TL1 UND TL2 IN NIERENZELLCARCINOM

[0140] In situ-Hybridisierungsexperimente wurden mit einem menschlichen Nierenzellcarcinom-Tumorgewebe unter Verwendung von TIE-1-, TIE-2-, TL1- und TL2-cDNA-Sonden durchgeführt. Die TIE-2-, TIE-1-, TL1- und TL2-Expression waren im Gefäßsystem des Tumors alle hochreguliert. Die Ligandenexpression schien entweder auf vaskuläre Endothelzellen (TL2) oder sehr nahe bei den vaskulären Endothelzellen im Mesenchym (TL1) lokalisiert zu sein. Von VEGF ist gezeigt worden, daß es in diesem Tumorgewebe dramatisch hochreguliert ist. Brown, et al., Am. J. Pathol. 143: 1255–1262 (1993).

BEISPIEL 14 – EXPRESSION VON TIE-1, TIE-2, TL1 UND TL2 BEI DER WUNDHEILUNG

[0141] In situ-Hybridisierungsexperimente wurden mit quergeschnittenen Gewebestücken von einem kutanen Wundenmodell der Ratte unter Verwendung von TIE-1-, TIE-2-, TL1- und TL2-cDNA-Sonden durchgeführt. Das Wundheilungsmodell umfaßt das Pressen eines kleinen Korkenziehers auf die Haut einer Ratte und das Entfernen eines kleinen, zylindrischen Hautpropfens. Wenn die Heilung am Grund der Wunde beginnt, wird ein vertikales Stück Gewebe entnommen und für die in situ-Hybridisierung verwendet. In der getesteten Gewebeprobe schienen TL1 und TL2 vier Tage nach der Verletzung leicht hochreguliert zu sein. Im Gegensatz zu der leicht hochregulierten Expression von TL1 und TL2 in diesem Gewebe, ist die Expression von VEGF, die der Expression von TL1 und TL2 vorausgehen kann, dramatisch hochreguliert.

BEISPIEL 15 – EXPRESSION VON TIE-LIGANDEN IN FÖTALER LEBER UND FÖTALEM THYMUS

[0142] Es wurde reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR) mit fötaler E14.5-Leber der Maus und fötalem E17.5-Thymus der Maus durchgeführt. Die Agarosegel-Elektrophorese der RT-PCR-Produkte offenbarte, daß in der fötalen Leber der Maus die RNA vom TIE-2-Ligand 1 (TL1) in der stromalen Region angereichert ist, in den hämatopoietischen c-kit$^+$TER119-Vorläuferzellen aber nicht vorhanden ist. In demselben Gewebe ist die RNA vom TIE-2-Ligand 2 (TL2) in den stromalen Zellen angereichert, in den hämatopoietischen Vorläuferzellen aber nicht vorhanden (**Fig. 13**). Im fötalen Thymus der Maus ist TL2 in den stromalen Zellen angereichert (**Fig. 14**).

BEISPIEL 16 – DAS TIE-REZEPTOR/LIGANDEN-SYSTEM BEI DER ANGIOGENESE

[0143] Obwohl das TIE-2/TIE-Liganden-System bei der Biologie von Endothelzellen eine wichtige Rolle zu spielen scheint, ist nicht gezeigt worden, daß es in den frühen bis mittleren Stadien der Vaskularisierung (z. B. Proliferation und Migration von Angioblasten oder Endothelzellen, Bildung von Tubulus und andere Vorkommnisse von frühen Stadien bei der Gefäßbildung) eine signifikante Rolle spielt. Im Gegensatz zu den Rezeptoren und Faktoren, von denen bekannt ist, daß sie diese Aspekte der vaskulären Entwicklung vermitteln, legt das zeitlich späte Muster der Expression von TIE-2 und TL1 im Verlauf der Vaskularisierung nahe, daß dieses System eindeutig eine Rolle in den späteren Stadien der vaskulären Entwicklung spielt, einschließlich der strukturellen und funktionellen Differenzierung und der Stabilisierung von neuen Blutgefäßen. Das Muster der Expression von TIE-2/TL1 ist auch konsistent mit einer kontinuierlichen Rolle bei der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität und/oder der physiologischen Charakteristika eines etablierten Gefäßsystems.

[0144] Der TIE-Ligand 2 (TL2) scheint ein kompetitiver Inhibitor von TL1 zu sein. Die zeitlichen und räumlichen Charakteristika der TL2-Expression legen nahe, daß dieses einzelne inhibitorische Molekül mehrere, vom Kontext abhängige Rollen spielen kann, die für die richtige vaskuläre Entwicklung oder Umwandlung (d. h. Destabilisierung/Dedifferenzierung von reifen Endothelzellen, was die Bildung von neuen Gefäßen aus dem existierenden Gefäßsystem zuläßt, die Inhibition von nicht angemessener Blutgefäßbildung und Rückbildung/Involution von reifen Blutgefäßen) wesentlich sind. Die **Fig. 15** ist eine schematische Darstellung der hypothetischen Rolle von TIE-2/TIE-Liganden bei der Angiogenese. In dieser Figur ist TL1 durch (•) dargestellt, TL2 ist durch (*) dargestellt, TIE-2 ist durch (T) dargestellt, VEGF ist durch ([]) dargestellt und flk-1 (ein VEGF-Rezeptor) ist durch (Y) dargestellt.

BEISPIEL 17 – EXPRESSION VON TIE-LIGANDEN IM WEIBLICHEN REPRODUKTIONSSYTEM: EXPRESSION IM EIERSTOCK

[0145] Vorläufige Beobachtungen, die bei Experimenten gemacht wurden, die die Expression von TIE-Rezeptoren und -Liganden im weiblichen Reproduktionssytem untersuchten, sind konsistent mit der Hypothese, daß TL1 bei der Neovaskularisierung eine Rolle spielt, die zeitlich der von VEGF folgt. Das Muster der TL2-Expression ist auch konsistent mit einem Antagonismus der Wirkung von TL1 und einer spezifischen Rolle bei der vaskulären Rückbildung. Um dies zu verifizieren, kann die Expression von relevanten mRNAs nach der experimentellen Induktion der follikulären und Gelbkörperentwicklung untersucht werden, so daß ihre zeitliche Relation zu verschiedenen Aspekten der Neovaskularisierung/vaskulären Rückbildung klarer definiert werden kann (z. B. in Verbindung mit Endothelzellfärbung, vaskulären Füllungen). Die Angiogenese, die mit der follikulären Entwicklung und der Gelbkörperbildung in Eierstöcken in bestimmten Stadien von erwachsenen, weiblichen Ratten assoziiert ist oder die der induzierten Ovulation in vorpubertären Tieren folgt, wurde unter Verwendung der in situ-Hybridisierung verfolgt. Die **Fig. 16** enthält Photographien von in situ-Hybridisierungobjektträgern, die das zeitliche Expressionsmuster von TIE-2, TL1, TL2 und VEGF während des Eierstockzyklus zeigen [Säule 1: früher prä-ovulatorischer Follikel; Säule 2: prä-ovulatorischer Follikel; Säule 3: früher Gelbkörper; und Säule 4: atretischer Follikel; Reihe A: helles Feld; Reihe B: VEGF; Reihe C: TL2; Reihe D: TL1 und Reihe E: TIE-2-Rezeptor]. Diese Untersuchungen ergaben, daß VEGF, TL1 und TL2 bezüglich der Entwicklung und Rückbildung des Gefäßsystems im Eierstock in zeitlich und räumlich koordinierter Weise exprimiert werden, spezifisch be-

züglich der Etablierung des Gefäßsystems, das im Verlauf der Umwandlung des Eierstockfollikels zum Gelbkörper (CL) gebildet wird.

[0146] Kurz gesagt nimmt die Expression von VEGF in der follikulären Granulumschicht vor ihrer Vaskularisierung während des Prozesses der Luteinisierung zu. Im Verlauf der CL-Bildung sind im Zentrum des sich entwickelnden CL in der Nachbarschaft der luteinisierenden Zellen, die noch nicht vaskularisiert sind, die höchsten Niveaus der Expression von VEGF offensichtlich. Die Niveaus an VEGF bleiben mäßig hoch und sind im entwickelten CL diffus verteilt. Im Gegensatz dazu tritt eine merklich erhöhte Expression an TIE-2-Ligand 1 nur spät im Prozeß der CL-Bildung auf, nachdem sich ein primärer vaskulärer Plexus etabliert hat. Später ist die Expression von TL1 durch den CL offensichtlich, wobei sich zu diesem Zeitpunkt das definitive Kapillarnetzwerk des CL etabliert hat.

[0147] TL2 zeigt ein komplexeres Muster der Expression als VEGF oder TL1. Im sich entwickelnden CL wird TL2 mit den höchsten Niveaus an der Front des sich entwickelnden kapillären Plexus exprimiert, zwischen der zentralen avaskulären Region des CL, wo die Expression an VEGF am höchsten ist, und dem am meisten peripheren Teil des CL, wo die Expression an TL1 dominant ist und wo der Prozeß der Luteinisierung vollständig ist und das vaskuläre System am reifsten ist. TL2 scheint auch mit hohen Niveaus in der follikulären Schicht von großen Follikeln, die eine Atresie durchmachen, exprimiert zu werden. Während TL1 auch in atretischen Follikeln auftritt, wird VEGF nicht exprimiert.

[0148] Das vorstehend beschriebene Muster der Expression ist am meisten konsistent mit einer Rolle von VEGF bei der Initiierung der Angiogenese, wobei TL1 spät in diesem Prozeß wirkt – zum Beispiel bei der Modellierung und/oder der Stabilisierung des definierten vaskulären Netzwerks. Im Gegensatz dazu ist TL2 sowohl in Bereichen der aktiven Expansion von sich neu bildendem Netzwerk (während der CL-Bildung) vorhanden als auch in Regionen, die kein neues Gefäßsystem etablieren und in denen die vaskuläre Rückbildung im Fortschreiten ist (atretische Follikel). Dies legt eine dynamischere und komplexere Rolle für TL2 nahe, möglicherweise unter Einschluß der Destabilisierung von existierendem Gefäßsystem (was für die Rückbildung notwendig ist) oder von sich entwickelndem Gefäßsystem (was für die dynamische Modellierung von sich neu bildenden Gefäßen notwendig ist).

BEISPIEL 18 – KONSTRUKTION UND CHARAKTERISIERUNG DER CYS-TL1-MUTANTE

[0149] Die TIE-2-Liganden haben zwei strukturelle Hauptdomänen, eine, die als eine "superspiralisierte" Domäne beschrieben wird, die etwa das C-terminale Drittel des Proteins umfaßt, und die andere "Fibrinogen-ähnliche" Domäne, die etwa die N-terminalen zwei Drittel des Proteins umfaßt. Obwohl die TIE-2-Liganden, als TL1 und TL2 bezeichnet, eine ähnliche strukturelle Homologie teilen, zeigen sie unterschiedliche physikalische und biologische Eigenschaften. Unter nicht reduzierenden elektrophoretischen Bedingungen zeigen beide Proteine kovalente multimere Strukturen, wobei TL1 primär als ein Trimer existiert und TL2 primär als ein Dimer existiert. Fig. 17 ist eine schematische Darstellung, wie die TIE-2-Liganden wechselwirken könnten, um Multimere zu bilden. Bezüglich der biologischen Aktivität wurde von TL1 gezeigt, daß es ein Agonist des TIE-2-Rezeptors ist, wie gezeigt durch die Induktion der Phosphorylierung in TIE-2 exprimierenden Zellen. TL2 scheint andererseits ein kompetitiver Inhibitor von TL1 zu sein. Untersuchungen bezüglich der Faktoren, die zu den verschiedenen physikalischen und biologischen Eigenschaften der beiden Moleküle beitragen könnten, zeigten die Anwesenheit eines Cysteinrests (CYS265), der der Fibrinogen-ähnlichen Domäne in TL1 vorangeht, in TL2 aber fehlt. Dieser Rest CYS265 in TL1 wird durch TCG codiert und liegt etwa bei den Nucleotiden 1102–1104, ungefähr an der Verbindung zwischen der superspiralisierten und der Fibrinogen-ähnlichen Domäne. Weil Cysteinreste im Allgemeinen in die Bildung von Disulfidbindungen involviert sind, deren Vorhandensein sowohl zu der Tertiärstruktur als auch zu den biologischen Eigenschaften eines Moleküls beitragen kann, wurde angenommen, daß vielleicht die Anwesenheit von CYS265 in TL1 zumindest teilweise für die verschiedenen Eigenschaften der beiden Moleküle verantwortlich sein könnte. Um diese Hypothese zu testen, wurde ein Expressionsplasmid konstruiert, das in TL1 eine Mutation enthielt, bei der das CYS durch eine Aminosäure ersetzt war, die keine Disulfidbindungen bildet. Zusätzlich zu dieser TL1/CYS-Mutante wurde ein zweites Expressionsplasmid konstruiert, bei dem die entsprechende Position in TL2 mutiert war, so daß dieser Rest jetzt ein Cystein war. Sowohl die nicht mutierten als auch die mutierten Expressionsplasmide von TL1 und TL2 wurden transient in COS-Zellen transfiziert. Die Zellüberstände, die die rekombinanten Proteine enthielten, wurden geerntet und Proben wurden einer reduzierenden und der nicht reduzierenden SDS/PAGE-Elektrophorese und einem anschließenden Western-Blotting unterzogen. Die Fig. 18 enthält die Western-Blots der nicht mutierten und der mutierten TL1- und TL2-Proteine und offenbart, daß die TL1/CYS$^-$-Mutante sich eher wie TL2 verhält, indem sie als Dimer läuft, und daß die TL2/CYS+-Mutante sich eher wie TL1 verhält, indem sie in der Lage ist, ein Trimer ebenso wie Multimere höherer Ordnung zu bilden. Wenn die beiden mutierten Proteine auf ihre Fähigkeit getestet werden, die Phosphorylierung in den TIE-2 exprimierenden Zellen zu induzieren, war die TL1/CYS$^-$-Mutante interes-

santerweise in der Lage, den TIE-2-Rezeptor zu aktivieren, während die TL2/CYS$^+$-Mutante keinerlei aktivierende Aktivität erhielt.

BEISPIEL 19 – KONSTRUKTION UND CHARAKTERISIERUNG VON MUTANTEN MIT NUR FIBRINOGEN-ÄHNLICHER DOMÄNE

[0150] Um zu testen, ob die Fibrinogen-ähnliche Domäne (F-Domäne) der TIE-2-Liganden eine TIE-2 aktivierende Aktivität enthielt, wurden Expressionsplasmide konstruiert, bei denen die superspiralisierte Domäne deletiert war und nur der Teil der DNA-Sequenz übrig blieb, der die F-Domäne codiert (beginnend bei etwa Nucleotid 1159, Aminosäurerest ARG284). Dieses mutante Konstrukt wurde transient in COS-Zellen transfiziert. Der Überstand, der das rekombinante Protein enthielt, wurde geerntet. Die Mutante der TL1/F-Domäne wurde auf ihre Fähigkeit getestet, den TIE-2-Rezeptor zu binden. Die Ergebnisse zeigten, daß die TL1/F-Domäne als Monomer nicht in der Lage war, mit einem nachweisbaren Niveau TIE-2 zu binden. Wenn jedoch das Monomer der TL1/F-Domäne mit myc markiert wurde und anschließend mit einem Antikörper gruppiert wurde, der gegen die myc-Markierung gerichtet war, zeigte es eine nachweisbare Bindung an TIE-2. Die mit Antikörper gruppierte Mutante der TL1/F-Domäne war jedoch nicht in der Lage, die Phosphorylierung in einer TIE-2 exprimierenden Zellinie zu induzieren. Die Fig. 17 zeigt eine schematische Darstellung des Konstrukts mit der F-Domäne und ihre Fähigkeit zur Bindung mit und ohne Antikörper-Gruppierung.

BEISPIEL 20 – EIN TEST FÜR DIE BINDUNG VON REZEPTORKÖRPER UND EIN TEST FÜR LIGANDENBINDUNG UND LIGANDENKOMPETITION

[0151] Ein quantitativer zellfreier Bindungstest mit zwei alternativen Formaten wurde für den Nachweis von entweder der Bindung von TIE-2-Rezeptorkörper oder der Ligandenbindung und Kompetitiion entwickelt. Bei der Testversion der Bindung von Rezeptorkörper wird eine ELISA-Platte mit TIE-2-Liganden (gereinigt oder teilweise gereinigt; entweder TL1 oder TL2) beschichtet. Dann wird Rezeptorkörper mit verschiedenen Konzentration zugegeben, der in dosisabhängiger Weise an den immobilisierten Ligand bindet. Nach zwei Stunden wird überschüssiger Rezeptorkörper abgewaschen, dann wird unter Verwendung eines spezifischen anti-Mensch-Fc-Antikörpers, der mit alkalischer Phosphatase markiert ist, die Menge bestimmt, die an die Platte gebunden ist. Überschüssiger Reporterantikörper wird abgewaschen, dann wird die AP-Reaktion unter Verwendung eines gefärbten Substrats entwickelt. Dieser Test wurde unter Verwendung eines Spektrophotometers quantifiziert. Fig. 19 zeigt eine typische TIE-2-IgG-Bindungskurve. Dieser Test wurde verwendet, um die Integrität von TIE-2-IgG nach Injektion in Ratten und Mäuse zu bewerten. Der Test kann in diesem Format auch als ein Ligandenkompetitionstest verwendet werden, bei dem gereinigte oder teilweise gereinigte TIE-2-Liganden mit immobilisierten Liganden um den Rezeptorkörper konkurrieren. Bei der Bindungstestversion der Ligandbindung und der Ligandkompetition wird eine ELISA-Platte mit der TIE-2-Ectodomäne beschichtet. Die mit Fc markierten Fibrinogen-ähnlichen Domänenfragmente der TIE-Liganden (TL1-fFc und TL2-fFc) binden dann an die Ectodomäne und können, wie vorstehend beschrieben, unter Verwendung desselben anti-Mensch-Fc-Antikörpers nachgewiesen werden. Die Fig. 20 zeigt ein Beispiel der Bindung von TL1-fFc an die TIE-2-Ectodomäne. Diese Version des Tests kann auch verwendet werden, um die Niveaus von TL1-fFc in Serum oder anderen Proben zu quantifizieren. Wenn nicht markierter Ligand (wiederum gereinigt oder nicht gereinigt) gleichzeitig mit dem TL1-fFc zugegeben wird, dann beginnt eine Kompetition zwischen markiertem Ligandenfragment und Ligand voller Länge. Der Ligand voller Länge kann das mit Fc markierte Fragment ersetzen und es wird eine Kompetitionskurve erzeugt.

BEISPIEL 21 – DIE EA.hy926-ZELLINIE KANN ALS EINE REPORTERZELLINIE FÜR DIE AKTIVITÄT VON TIE-LIGAND VERWENDET WERDEN

[0152] EA.hy926 ist eine hybride Zellinie, die durch Fusion von HUVEC mit der von menschlichem Lungenkarzinom abgeleiteten Zellinie A549 [Edgell et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 80, 3734–3737 (1983)] etabliert wurde. Es wurde gefunden, daß EA.hy926-Zellen signifikante Niveaus an TIE-2-Rezeptorprotein mit niedrigen Grundniveaus an Phosphotyrosin exprimieren. Die Dichte, mit der EA.hy926-Zellen vor ihrer Verwendung für Rezeptortests Passagen unterworfen werden, ebenso wie ihr Maß an Konfluenz zum Zeitpunkt des Tests können die Menge an TIE-2-Rezeptor und die relative Induzierbarkeit als Reaktion auf die Behandlung mit Ligand beeinflussen. Durch Befolgen der folgenden Vorschrift für das Wachstum dieser Zellen kann die EA.hy926-Zellinie als abhängiges System zum Testen der Aktivitäten des TIE-2-Liganden verwendet werden.

[0153] EA.hy926-Zellen werden mit 1,5 × 10^6 Zellen in T-75-Kolben (Falconware) ausgesät und jeden zweiten Tag erneut mit Hochglucose-Dulbecco-MEM, 10% fötalem Rinderserum, L-Glutamin, Penicillin-Streptomycin und 1 × Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin (HAT, Gibco/BRL) gefüttert. Nach drei bis vier Tagen Wachstum werden die Zellen noch einmal mit 1,5 × 10^6 Zellen pro T-75-Kolben einer Passage unterworfen und zusätzliche drei bis vier Tagen gezüchtet. Für die Phosphorylierungstests wurden die, wie vorstehend beschrieben, gewonnenen Zellen durch Ersatz des Kulturmediums durch Hochglu-

cose-DMEM ohne Serum ausgehungert und für 2–3 Stunden bei 37°C inkubiert. Dieses Medium wurde aus den Kolben abgesaugt und es wurden Proben von konditioniertem Medium oder gereinigtem Ligand in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml in den Kolben gegeben, gefolgt von 5 Minuten Inkubation bei 37°C. Die Kolben wurden aus dem Inkubator genommen und auf ein Eisbett gestellt. Das Medium wurde entfernt und durch 1,25 ml Lysierungspuffer ersetzt, der 1% Nonidet P-40, 0,5% Natriumdesoxycholat, 0,1% SDS in 20 mM Tris, pH 7,6, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 mM Natriumorthovanadat, 5 mM Benzamidin und 1 mM EDTA enthielt, das die Proteaseinhibitoren PMSF, Aprotinin und Leupeptin enthielt. Nach 10 Minuten auf Eis, um die Solubilisierung der Membran zuzulassen, wurden die Platten abgeschabt und die Zellysate wurden durch 10 Minuten Mikrozentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit bei 4°C geklärt. Der TIE-2-Rezeptor wurde durch Inkubation in der Kälte mit einem polyclonalen anti-TIE-2-Antiserum und mit mit Protein G konjugierten Separosekügelchen aus dem geklärten Überstand einer Immunpräzipitation unterworfen. Die Kügelchen wurden dreimal mit kaltem Zelllysierungspuffer gewaschen und 5 Minuten in Laemmli-Probenpuffer gekocht, der dann auf 7,5%-ige SDS-Polyacrylamidgele aufgebracht wurde. Die aufgelösten Proteine wurden auf eine PVDF(Lamblia-P)-Membran elektrotransferiert und dann unter Verwendung eines anti-Phosphotyrosin-Antikörpers und des ECL-Reagens einer Western-Blot-Analyse unterworfen. Der anschließende Vergleich der Gesamtniveaus an TIE-2-Protein bei denselben Blots wurde durch Entfernen des anti-Phosphotyrosin-Antikörpers und Reinkubation mit einem polyclonalen Antiserum durchgeführt, das für die Ectodomäne von TIE-2 spezifisch war.

HINTERLEGUNGEN

[0154] Folgendes wurde bei der American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 unter dem Budapester Vertrag hinterlegt. Ein Plasmidclon, der den TIE-2-Ligand codiert, wurde am 7. Oktober 1994 unter der ATCC-Zugangs-Nr. 75910 bei der ATCC hinterlegt und als "pJFE14 encoding TIE-2-ligand" bezeichnet. Ein rekombinantes Autographa californica-Baculovirus, das den TIE-2-Rezeptorkörper codiert, wurde am 7. Oktober 1994 unter der ATCC-Zugangs-Nr. VR2484 bei der ATCC hinterlegt und als "vTIE-2 receptorbody" bezeichnet. Ein lambda-Phagenvektor, der die DNA des menschlichen tie-2-Liganden enthielt, wurde am 26. Oktober 1994 unter der ATCC-Zugangs-Nr. 75928 bei der ATCC hinterlegt und als λgt10, das den htie-2 Ligand 1 codiert, bezeichnet. Ein Plasmidclon, der einen zweiten TIE-2-Ligand codiert, wurde am 9. Dezember 1994 unter der ATCC-Zugangs-Nr. 75963 bei der ATCC hinterlegt und als "pBluescript KS encoding human TIE-2-ligand 2" bezeichnet.

[0155] Die vorliegende Erfindung wird durch die hier beschriebenen spezifischen Ausführungsformen in ihrem Umfang nicht eingeschränkt. Dem Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet werden aufgrund der vorstehenden Beschreibung und der begleitenden Figuren in der Tat verschiedene Modifikationen der Erfindung zusätzlich zu den hier beschriebenen offensichtlich werden. Solche Modifikationen sollen in den Umfang der beigefügten Ansprüche fallen.

Patentansprüche

1. Isoliertes Nucleinsäuremolekül, welches die Fibrinogen-ähnliche Domäne eines TIE-2-Liganden und nicht die superspiralisierte α-Helix-Domäne codiert, bestehend aus einer Nucleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
(a) der Nucleotidsequenz, die die Fibrinogen-ähnliche Domäne des in Fig. 4, Fig. 5 oder Fig. 6 dargestellten menschlichen TIE-2-Liganden codiert; und
(b) einer Nucleotidsequenz, welche sich von (a) aufgrund der Degeneration des genetischen Codes unterscheidet.

2. Vektor, umfassend ein Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1.

3. Vektor nach Anspruch 2, wobei das Nucleinsäuremolekül funktionell verbunden ist mit einer Expressionskontrollsequenz, die dessen Expression in einer Wirtszelle steuern kann.

4. Vektor nach Anspruch 2 oder 3, welcher ein Plasmid ein.

5. Polypeptid, codiert von dem Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1.

6. Wirtsvektorsystem zur Herstellung eines Polypeptides nach Anspruch 5, welches einen Vektor nach einem der Ansprüche 2 bis 4 in einer Wirtszelle umfaßt.

7. Wirtsvektorsystem nach Anspruch 6, wobei die Wirtszelle eine Bakterien-, Hefe-, Insekten- oder Säugerzelle ist.

8. Wirtsvektorsystem nach Anspruch 6 oder 7, zusätzlich umfassend eine Nucleinsäure, welche den TIE-2-Rezeptor codiert.

9. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptides, umfassend die Anzucht von Zellen eines Wirtsvektorsystems nach einem der Ansprüche 6 bis 8 unter Bedingungen, welche die Herstellung des Polypeptids erlauben, und die Gewinnung des so hergestellten Polypeptids.

10. Antikörper, welcher spezifisch das Polypeptid

nach Anspruch 5 bindet.

11. Antikörper nach Anspruch 10, welcher ein monoclonaler Antikörper ist.

12. Konjugat, umfassend ein Polypeptid nach Anspruch 5 und daran konjugiert einen cytotoxischen Wirkstoff.

13. Konjugat nach Anspruch 12, wobei der cytotoxische Wirkstoff ein Radioisotop oder ein Toxin ist.

14. Arzneimittel, umfassend das Polypeptid nach Anspruch 5 oder das Konjugat nach Anspruch 12 oder 13 sowie einen pharmazeutisch verträglichen Träger.

15. Arzneimittel, umfassend einen Antikörper nach Anspruch 10 oder 11 sowie einen pharmazeutisch verträglichen Träger.

16. Polypeptid nach Anspruch 5, Konjugat nach einem der Ansprüche 12 oder 13, Antikörper nach einem der Ansprüche 10 oder 11 oder Arzneimittel nach einem der Ansprüche 14 oder 15 zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers oder in einem Diagnoseverfahren.

17. Polypeptid nach Anspruch 5 oder Konjugat nach einem der Ansprüche 12 oder 13 zur Verwendung in einem Verfahren zur Blockierung des Blutgefäßwachstums in einem Säuger.

18. Polypeptid nach Anspruch 5 oder Konjugat nach einem der Ansprüche 12 oder 13 zur Verwendung als ein TIE-2-Antagonist in einem Verfahren zur Hemmung von TIE-2-Aktivität in einem Säuger.

19. Polypeptid oder Konjugat nach Anspruch 18 zur Verwendung in einem Verfahren, wobei der Säuger ein Mensch ist.

20. Polypeptid oder Konjugat nach einem der Ansprüche 18 oder 19 zur Verwendung in einem Verfahren zur Verminderung oder Abwendung von Tumorwachstum beim Menschen.

21. Verfahren zur Identifizierung eines TIE-2-Rezeptorantagonisten, umfassend das Inkontaktbringen des TIE-2-Rezeptors mit einer Testverbindung in Gegenwart eines Polypeptides nach Anspruch 5 unter Bedingungen, welche die Bindung des Polypeptides an den Rezeptor erlauben, und Bestimmung, ob die Testverbindung in der Lage ist, die Bindung des Polypeptides an den Rezeptor zu beeinträchtigen.

22. Ligandenkörper, welcher im wesentlichen aus der Fibrinogen-ähnlichen Domäne des in **Fig. 4**, **Fig. 5** oder **Fig. 6** dargestellten menschlichen TIE-2-Liganden besteht, oder dessen Konjugat mit einem cytotoxischen Wirkstoff, der an die konstante Region eines Immunglobulins fusioniert ist.

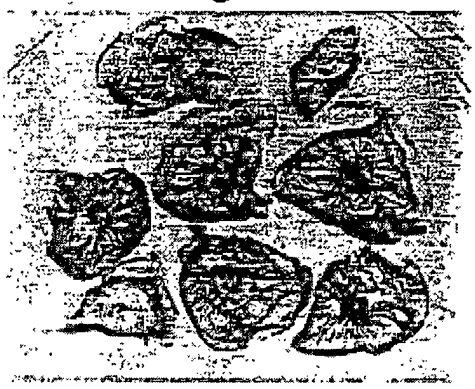
23. Ligandenkörper nach Anspruch 22, wobei die konstante Region des Immunglobulins der Fc-Teil des menschlichen IgG1 ist.

24. Ligandenkörper nach einem der Ansprüche 22 oder 23 zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers oder in einem Diagnoseverfahren.

Es folgen 21 Blatt Zeichnungen

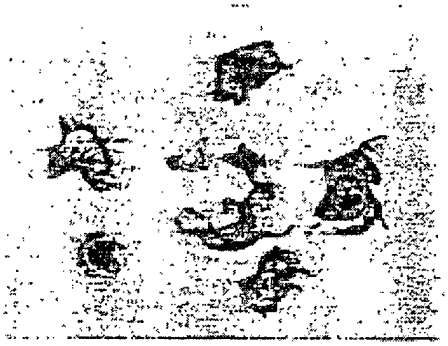
Anhängende Zeichnungen

Fig.1A.



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

Fig.1B.



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

Fig.2.

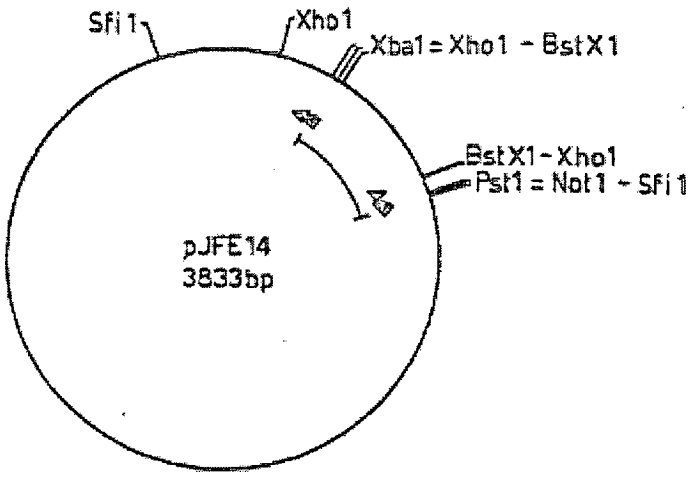

Sfi 1
Xho1
Xba1 = Xho1 - BstX1
BstX1 - Xho1
Pst1 = Not1 - Sfi 1
pJFE14
3833bp

Fig.3.

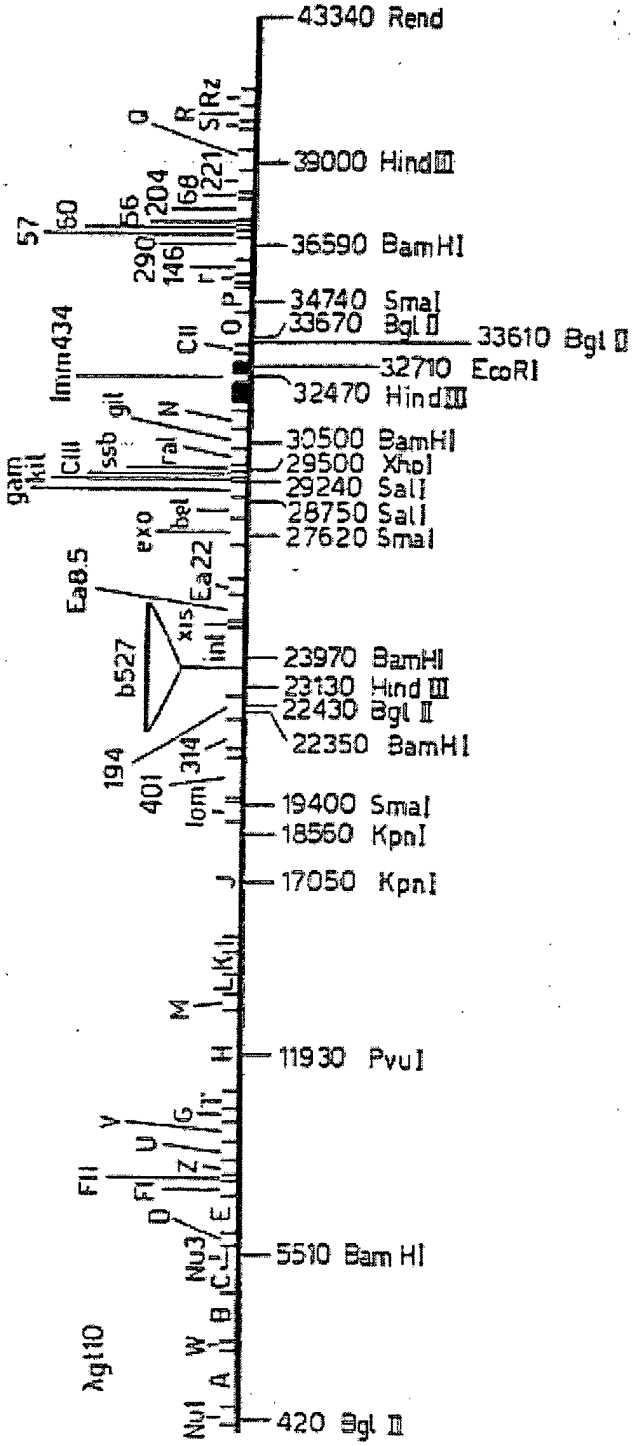

43340 Rend
39000 HindIII
36590 BamHI
34740 SmaI
33670 Bgl II
33610 Bgl II
32710 EcoRI
32470 HindIII
30500 BamHI
29500 XhoI
29240 SalI
28750 SalI
27620 SmaI
23970 BamHI
23130 Hind III
22430 Bgl II
22350 BamHI
19400 SmaI
18560 KpnI
17050 KpnI
11930 PvuI
5510 Bam HI
420 Bgl II
λgt10
Nu1
Nu3
Fl1
Fl
Z
U
V
G
T
D
E
C
B
W
A
H
M
L
K
J
lom
401
314
194
b527
Ea8.5
xis
int
Ea22
exo
bel
gam
kil
CIII
ssb
ral
N
gil
lmm434
CII
O
P
r
146
290
57
60
56
204
68
221
Q
R
S
Rz

Fig.4.

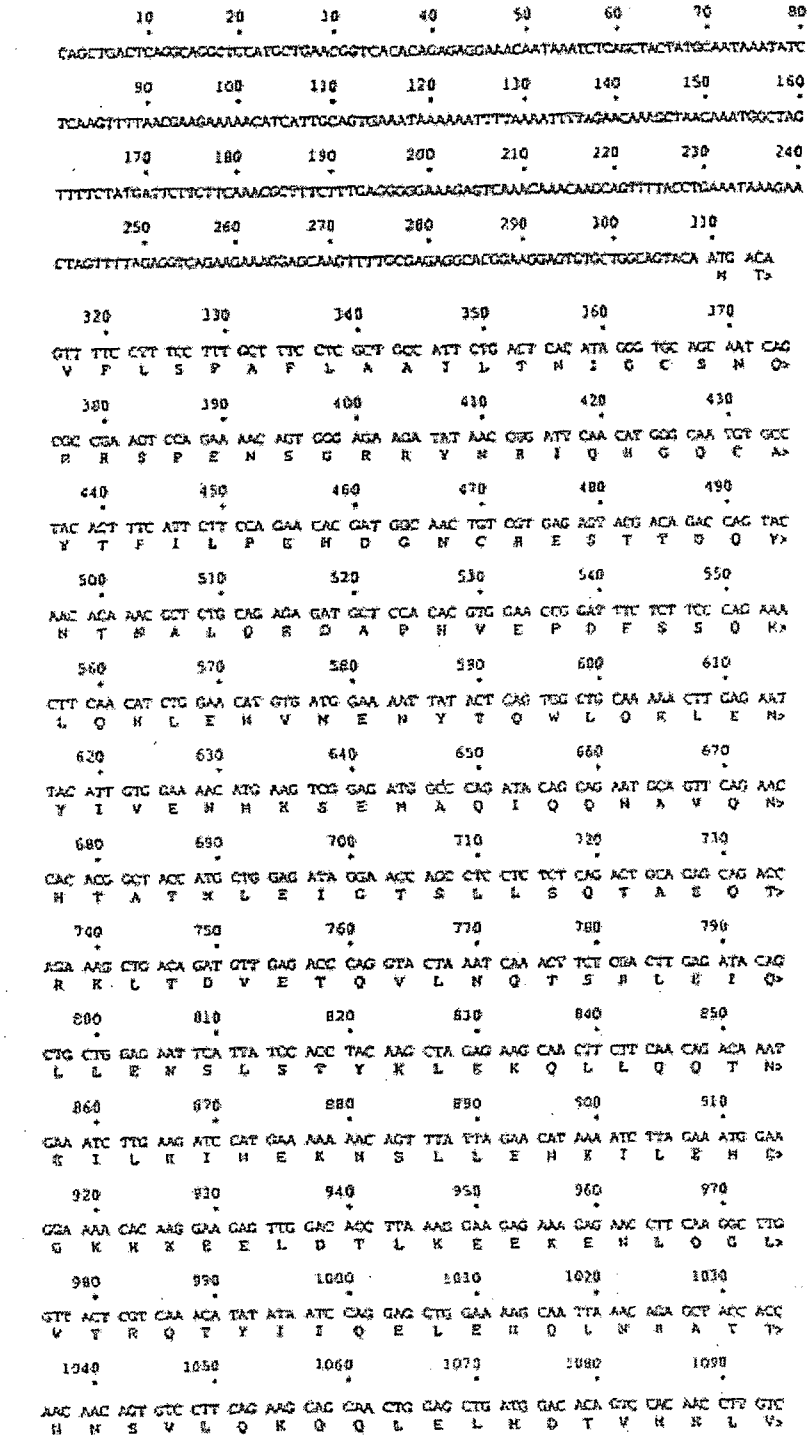


Fig.4. (Forts.)

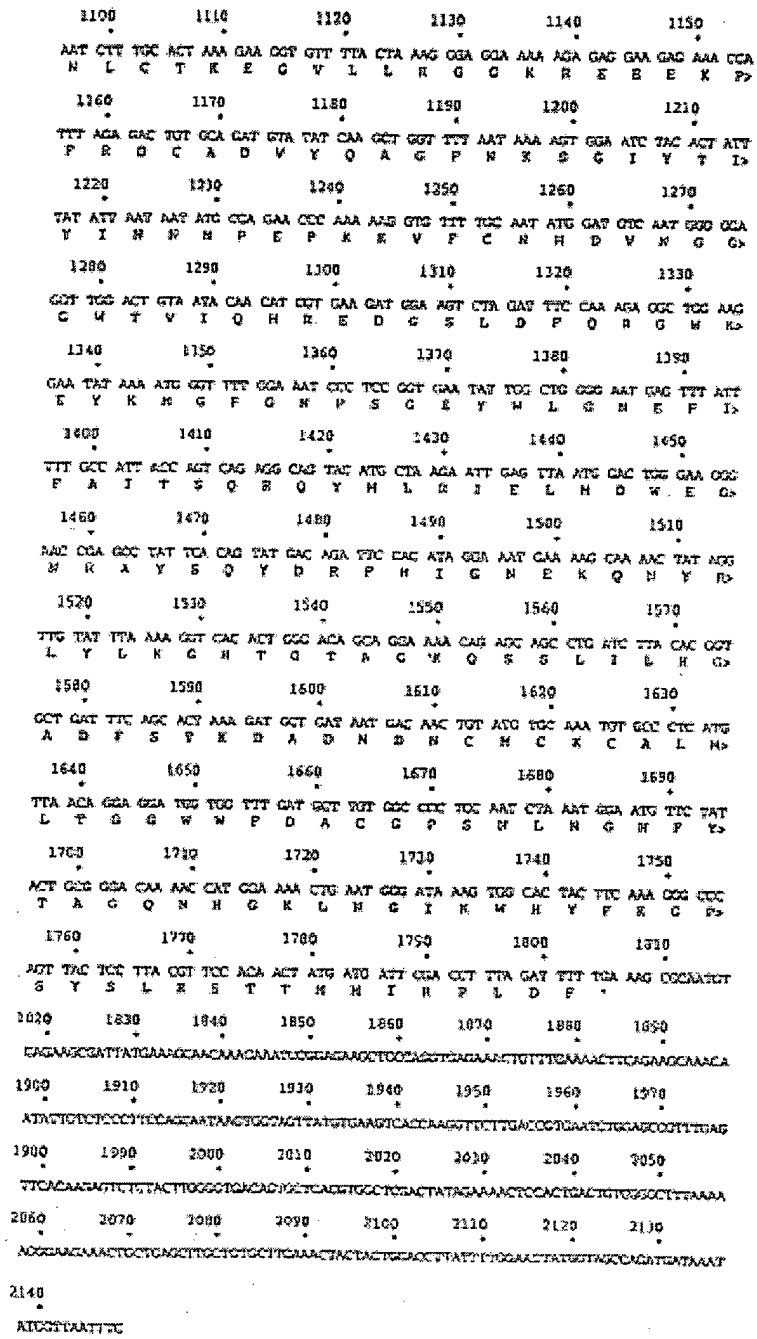


Fig.5.

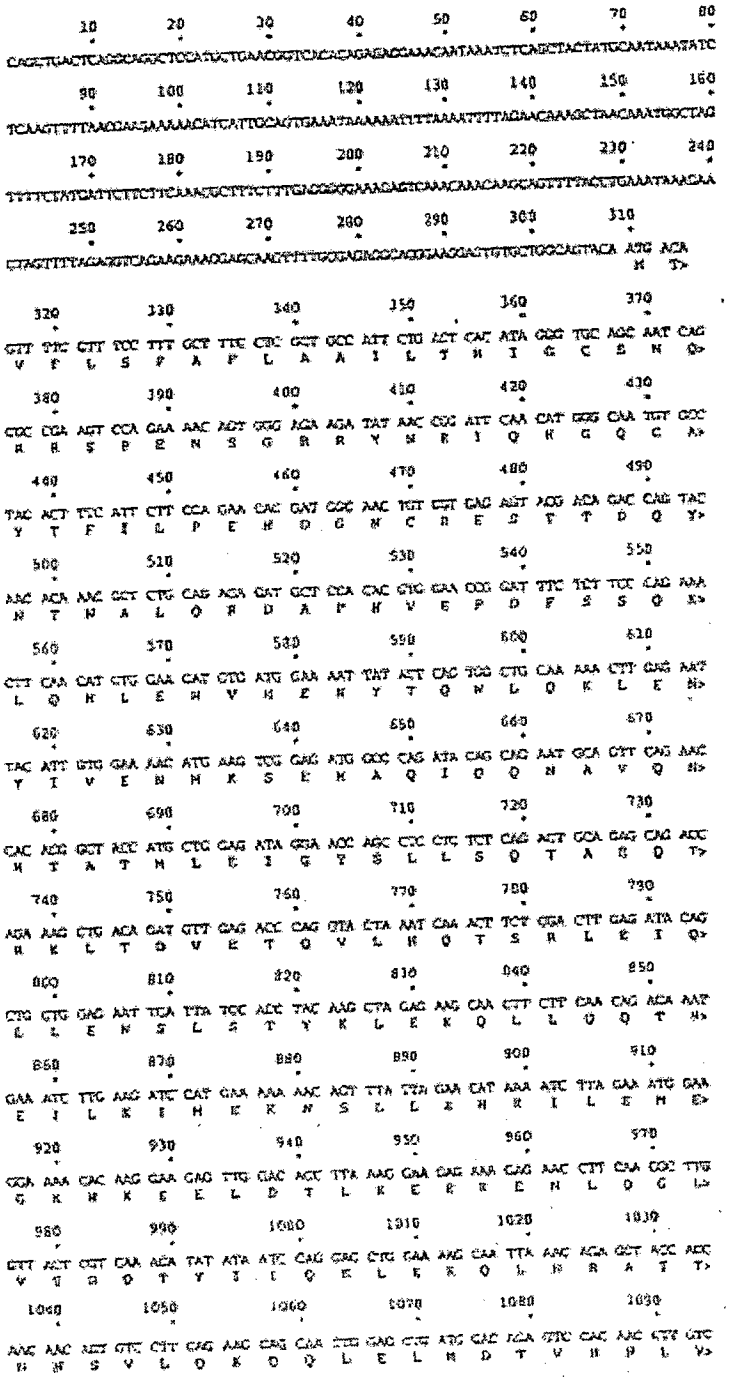


Fig.5. (Forts.)

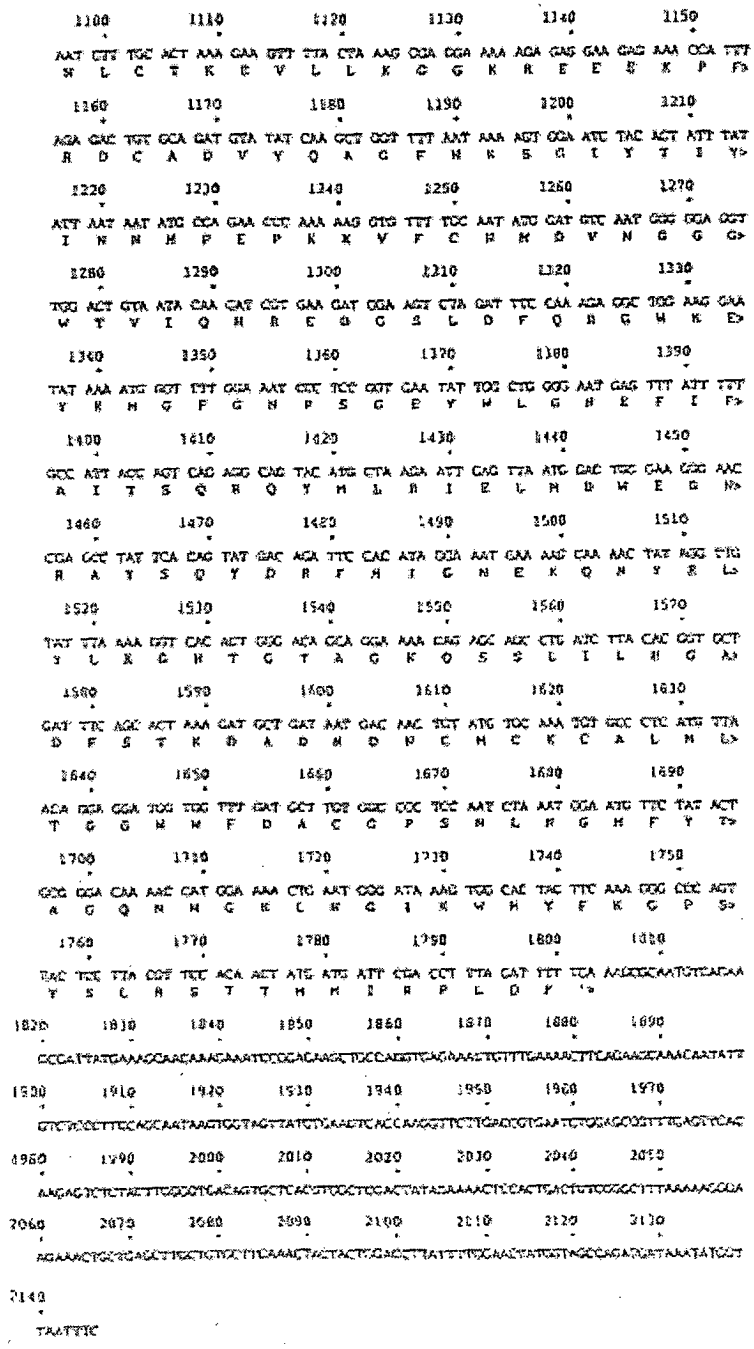


Fig.6.

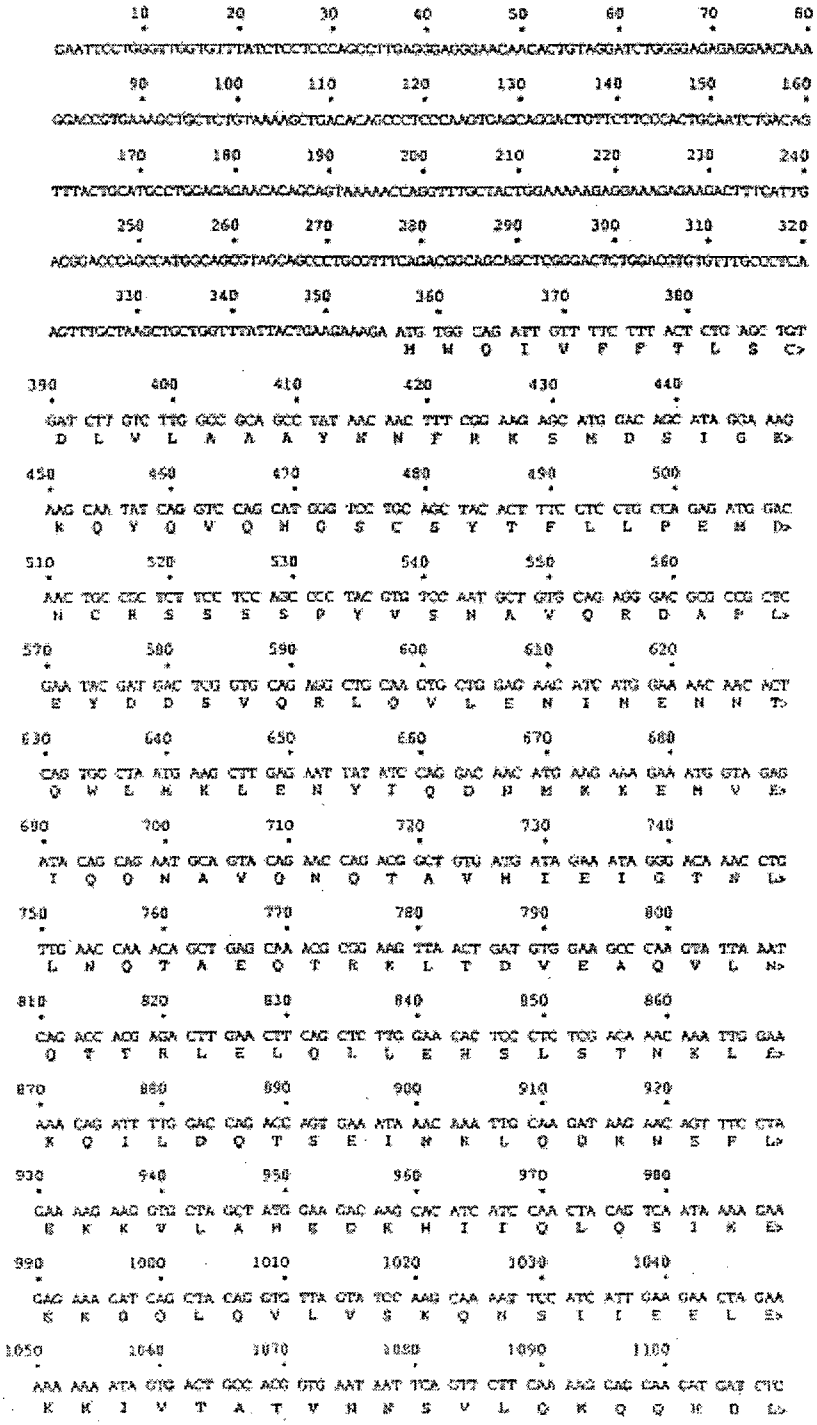


Fig.6. (Forts.)

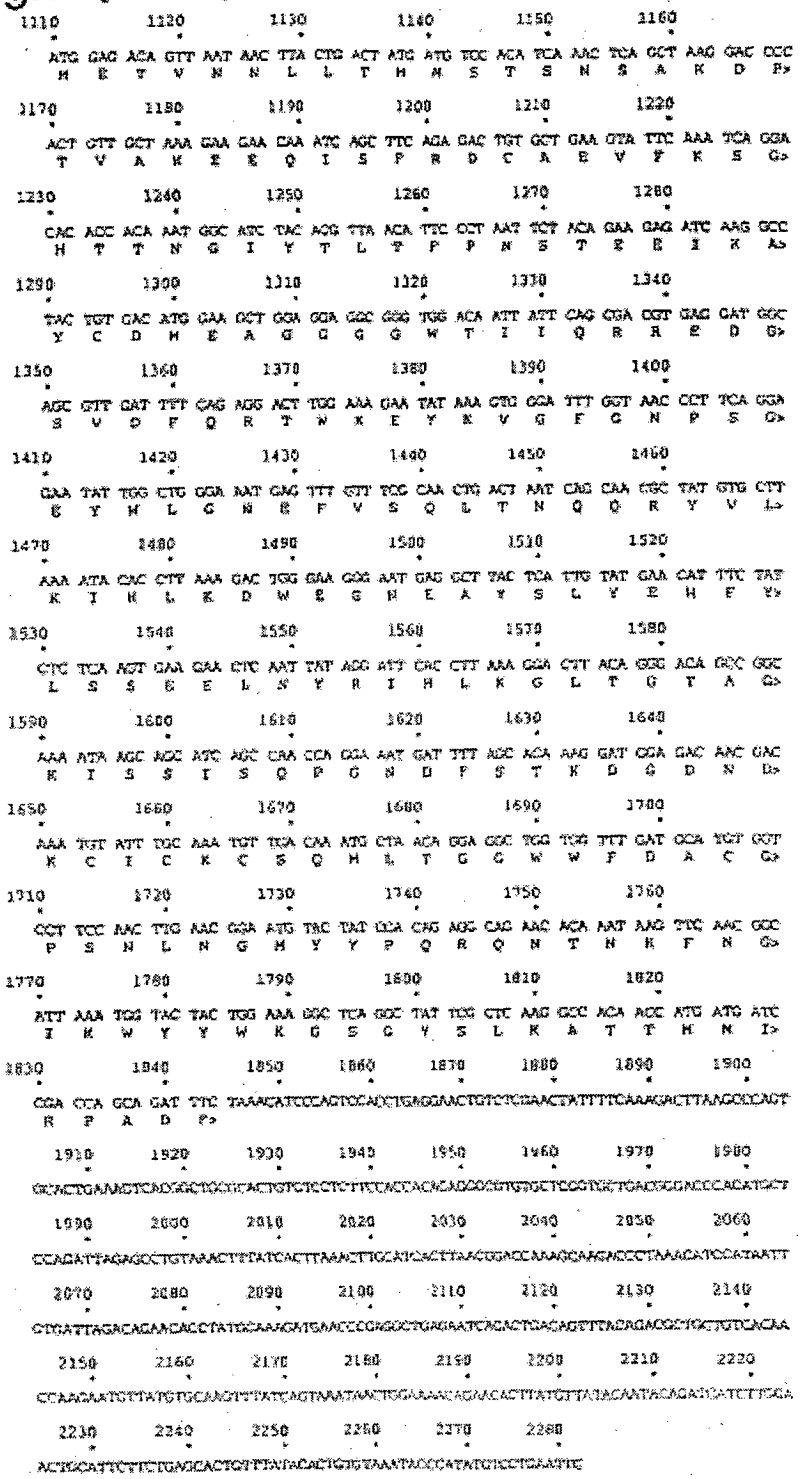


Fig.7.

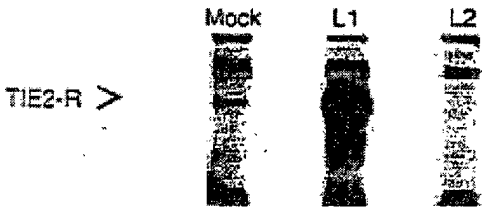


Fig.8.

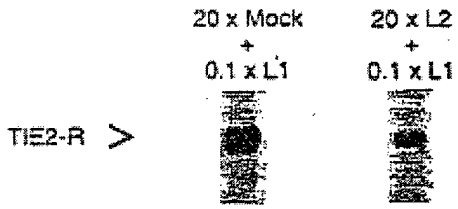


Fig.9.

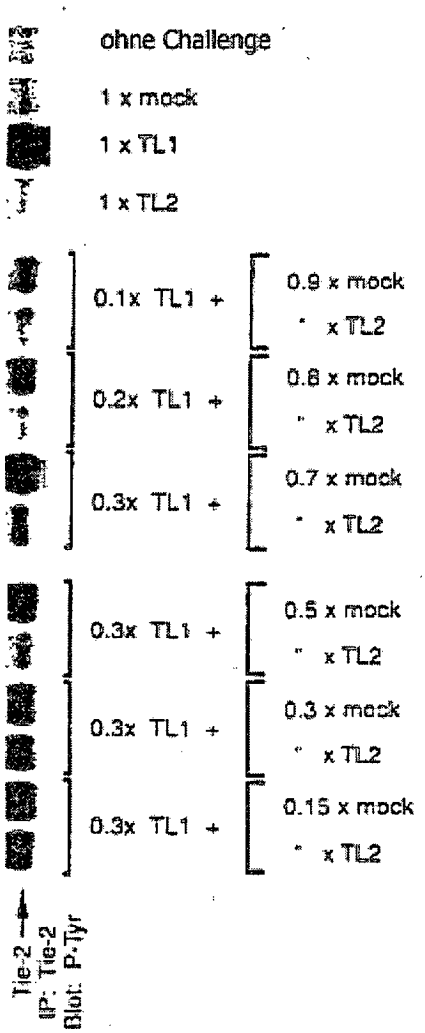

ohne Challenge
1 x mock
1 x TL1
1 x TL2
0.1x TL1 +
0.9 x mock
" x TL2
0.2x TL1 +
0.8 x mock
" x TL2
0.3x TL1 +
0.7 x mock
" x TL2
0.3x TL1 +
0.5 x mock
" x TL2
0.3x TL1 +
0.3 x mock
" x TL2
0.3x TL1 +
0.15 x mock
" x TL2
Tie-2
IP: Tie-2
Blot: P-Tyr

Fig.10.

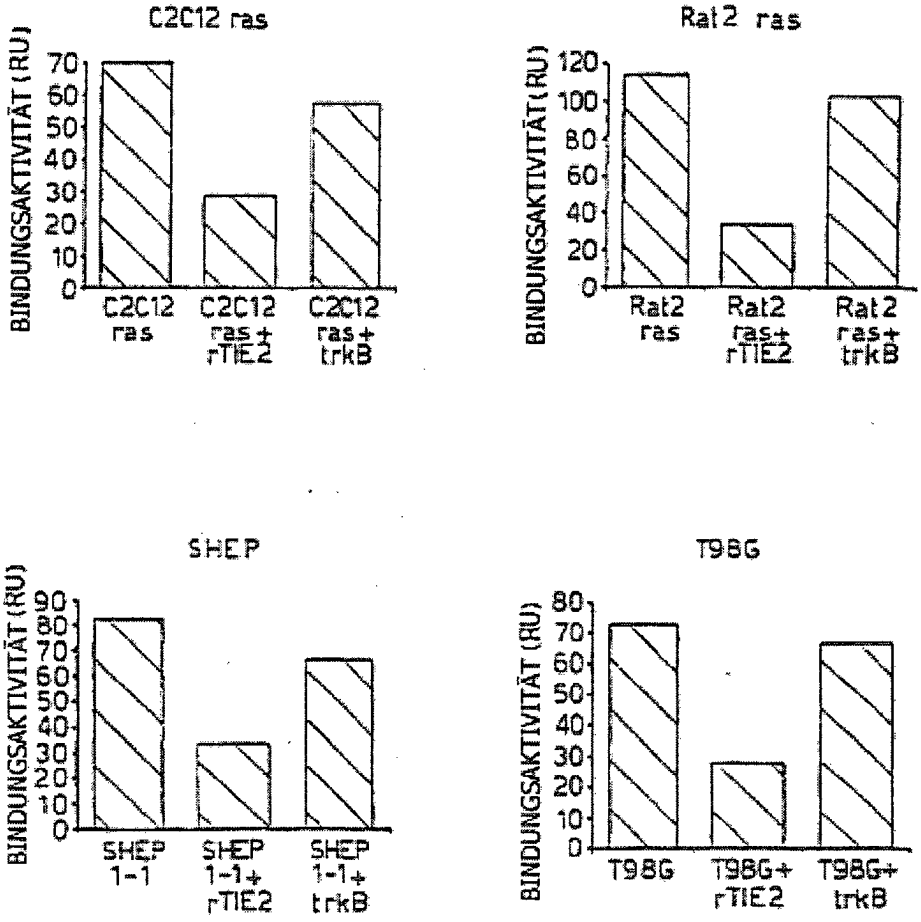
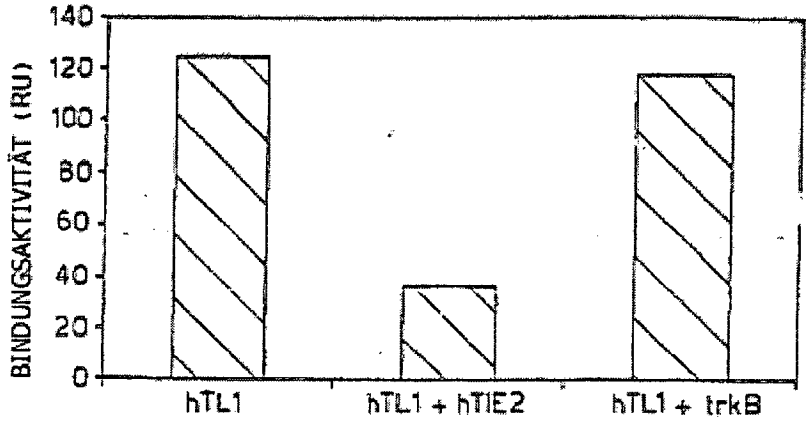

C2C12 ras
BINDUNGSAKTIVITÄT (RU)
0
10
20
30
40
50
60
70
C2C12 ras
C2C12 ras + rTIE2
C2C12 ras + trkB
Rat2 ras
BINDUNGSAKTIVITÄT (RU)
0
20
40
60
80
100
120
Rat2 ras
Rat2 ras + rTIE2
Rat2 ras + trkB
SHEP
BINDUNGSAKTIVITÄT (RU)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
SHEP 1-1
SHEP 1-1 + rTIE2
SHEP 1-1 + trkB
T98G
BINDUNGSAKTIVITÄT (RU)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
T98G
T98G + rTIE2
T98G + trkB

Fig.11.


BINDUNGSAKTIVITÄT (RU)
140
120
100
80
60
40
20
0
hTL1
hTL1 + hTIE2
hTL1 + trkB

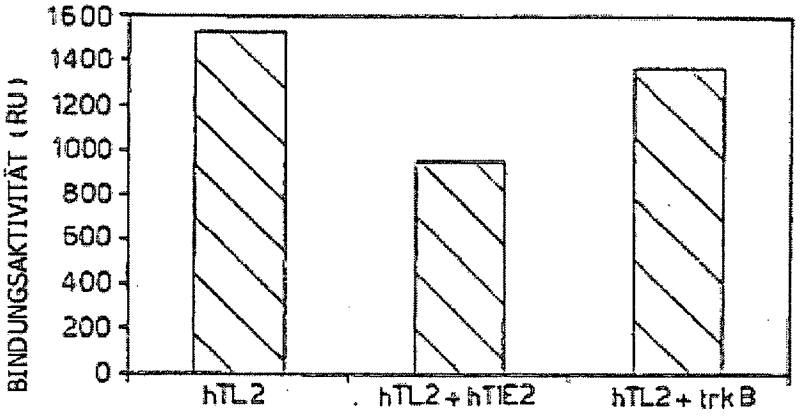

BINDUNGSAKTIVITÄT (RU)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
hTL2
hTL2 + hTIE2
hTL2 + trkB

Fig.12.

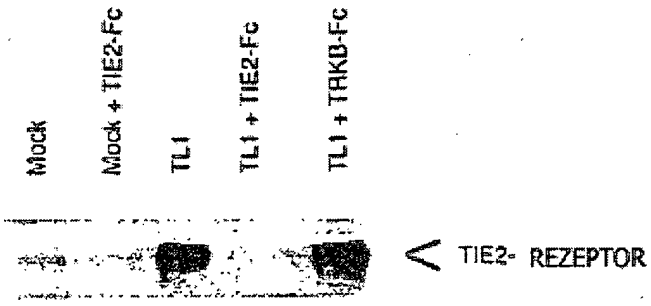
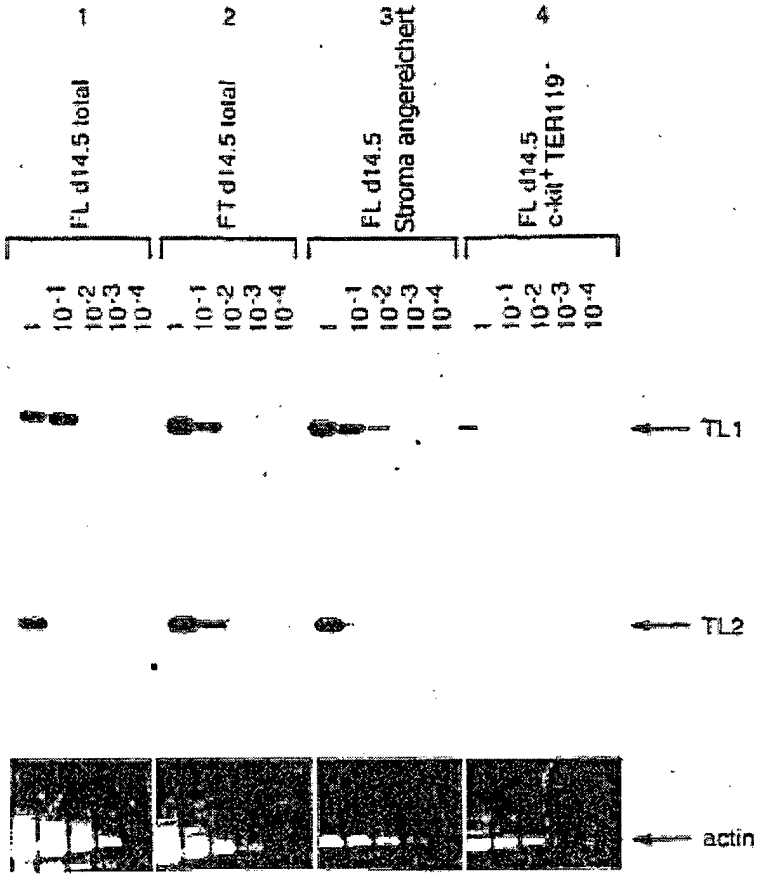
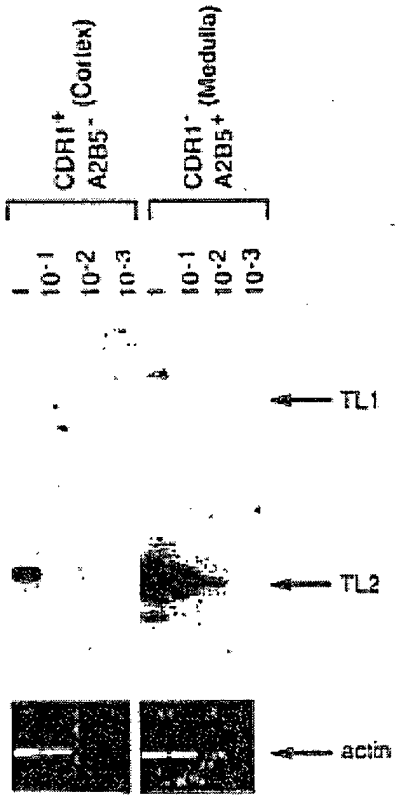


Fig.13.



FL: Fötale Leber

Fig.14.



Fötaler Thymus E17.5

$CDR1^+$: Corticale Stromazellen

$A2B5^+$: Medulla Stromazellen

Fig.15.

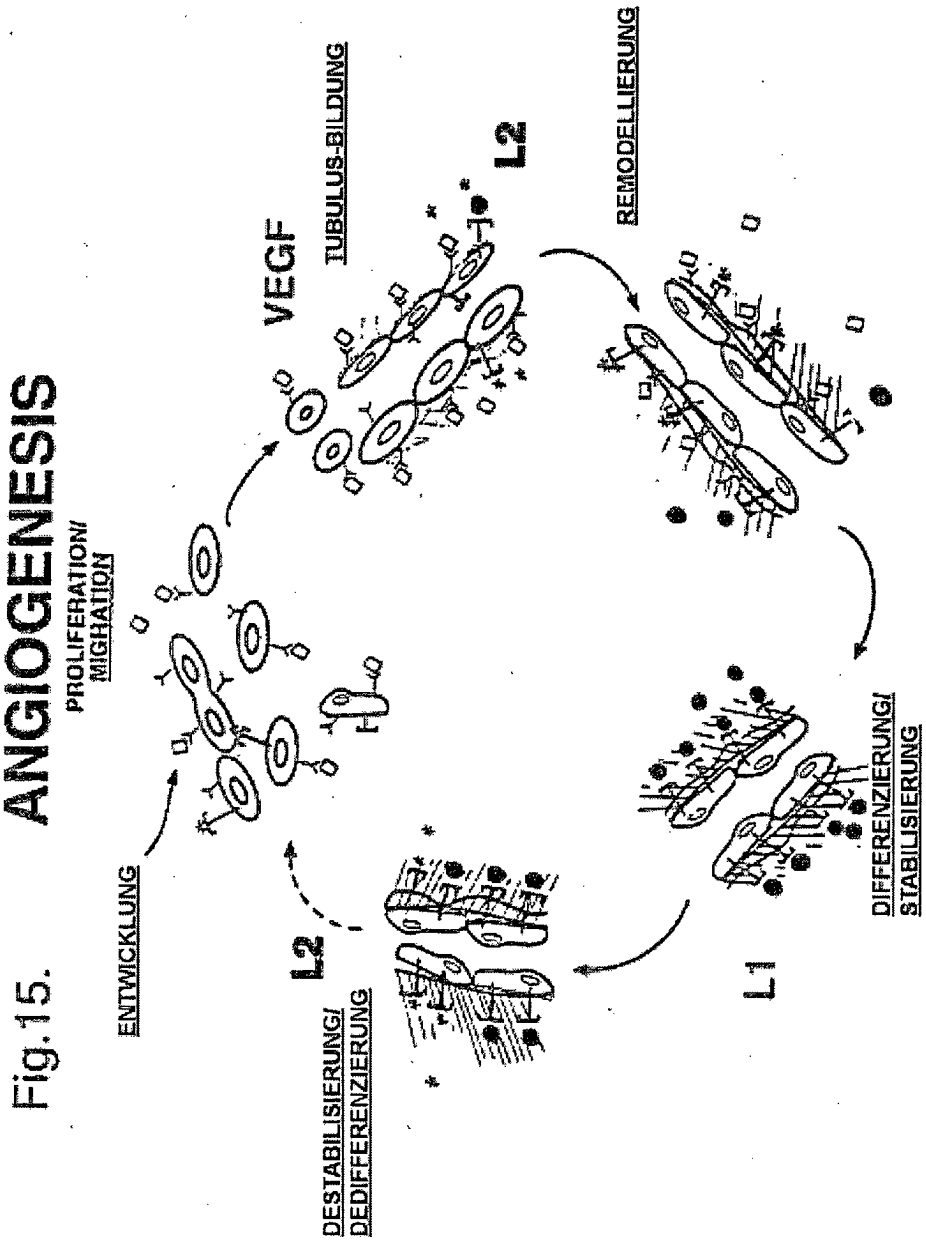

ANGIOGENESIS
PROLIFERATION/
MIGRATION
ENTWICKLUNG
VEGF
TUBULUS-BILDUNG
L2
REMODELLIERUNG
L2
DESTABILISIERUNG/
DEDIFFERENZIERUNG
L1
DIFFERENZIERUNG/
STABILISIERUNG

Fig.16.

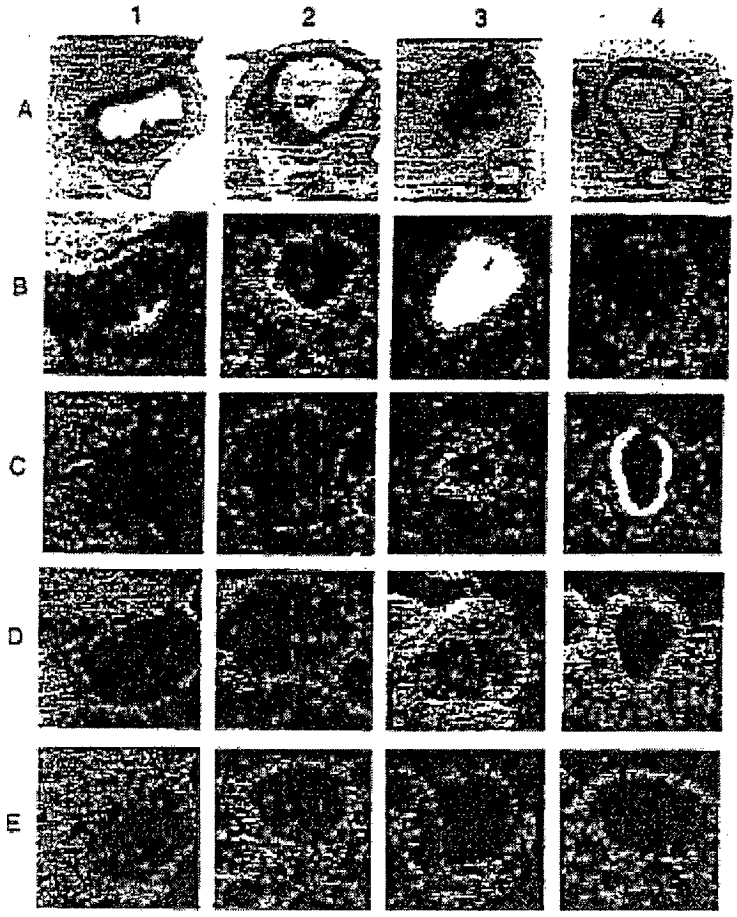


Fig.17.
HERSTELLUNG VON TIE2 "LIEGANDEN-KÖRPERN"

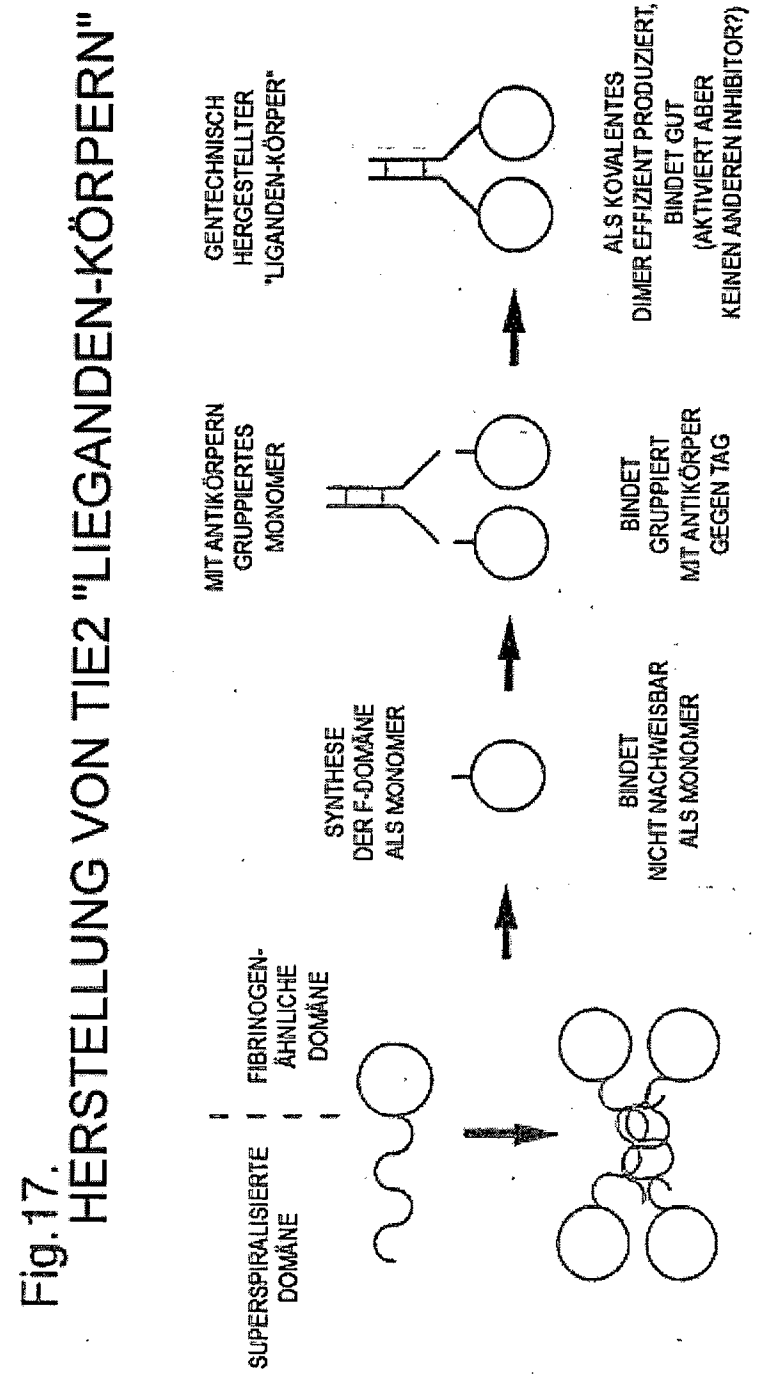


Fig.18.

KOVALENTE MULTIMERE STRUKTUR VON TL1 UND TL2 UND IHRE UMWANDLUNG DURCH MUTATION VON EINEM CYSTEIN

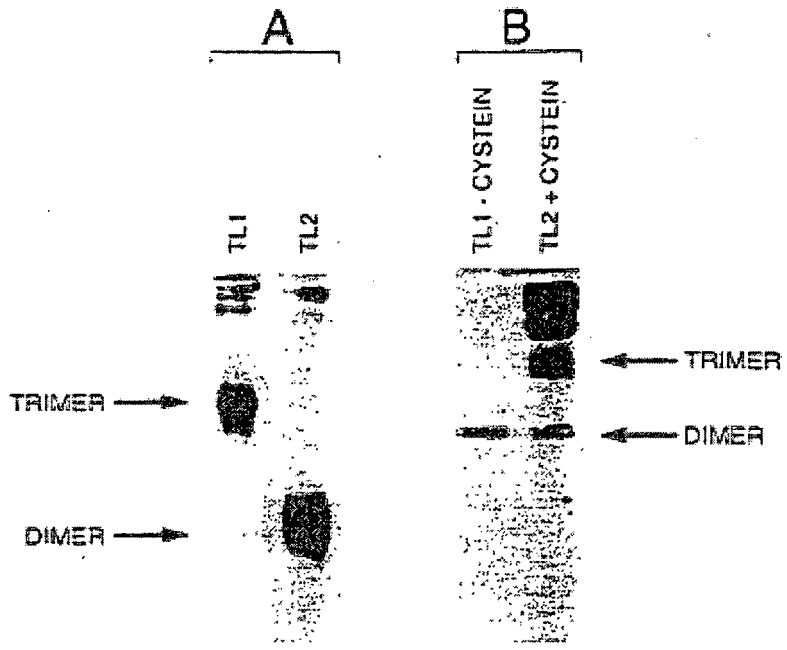


Fig.19. TIE2-IgG- Bindung an immobilisierten TL1

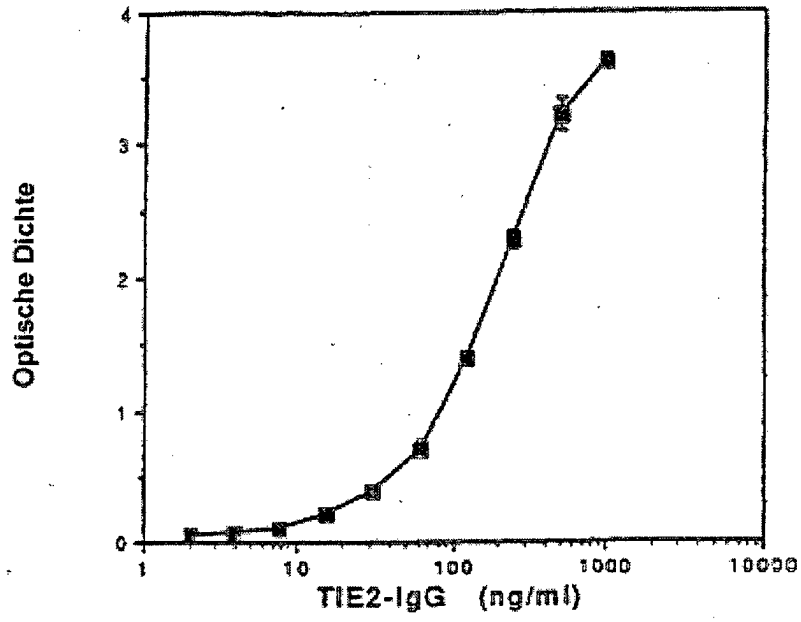


Fig.20. TL1-f-Fc Bindung an immobilisierte TIE2-Ectodomäne

