

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480006934.0

[51] Int. Cl.

C07K 7/08 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2006年4月19日

[11] 公开号 CN 1761679A

[22] 申请日 2004.3.11

[21] 申请号 200480006934.0

[30] 优先权

[32] 2003.3.14 [33] JP [31] 070568/2003

[86] 国际申请 PCT/JP2004/003231 2004.3.11

[87] 国际公布 WO2004/081035 日 2004.9.23

[85] 进入国家阶段日期 2005.9.14

[71] 申请人 帝国脏器制药株式会社

地址 日本国东京都

[72] 发明人 伊藤金次 石井寿晴 深泽由里

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司
代理人 李香兰

权利要求书 2 页 说明书 14 页 序列表 2 页
附图 4 页

[54] 发明名称

LYVE-1 的肽片段以及抗该肽片段的抗体

[57] 摘要

本发明的目的在于提供一种可以作为淋巴管特异性抗体的抗原决定簇的 LYVE-1 的特定的肽片段以及识别该肽片段的抗体。是一种由氨基酸序列：
Ser - Lys - Lys - Thr - Asp - Lys - Asn - Pro - Glu -
Glu - Ser - Lys 构成的肽片段或在其 C 末端或者 N 末端上附加 1 个氨基酸作为连接序列的肽片段。

1. 一种肽片段，其特征在于，
5 是由在序列号 1 中记载的氨基酸序列构成的肽片段、或者在其 C 末端或 N 末端上附加 1 个氨基酸作为连接序列的肽片段。
2. 一种抗体，其特征在于，
抗权利要求 1 所述的肽片段。
3. 根据权利要求 2 所述的抗体，其特征在于，
10 对人淋巴管特异性乙酰透明质酸受体-1 (LYVE-1) 具有特异性。
4. 一种肽片段，其特征在于，
是在序列号 1 所记载的氨基酸序列中，由缺失、取代或附加 1 或者几个氨基酸的氨基酸序列构成而且通过权利要求 2 或 3 所述的抗体进行识别的肽片段，或者在其 C 末端或 N 末端上附加 1 个氨基酸作为连接序列的
15 肽片段。
5. 一种权利要求 1 或者 4 所述的肽片段的使用，其特征在于，
用于调制权利要求 2 或 3 所述的抗体。
6. 一种人淋巴管免疫染色用组合物，其特征在于，
含有权利要求 2 或 3 所述的抗体。
- 20 7. 一种人淋巴管免疫染色用试剂盒，其特征在于，
含有权利要求 2 或 3 所述的抗体。
8. 使用权利要求 2 或 3 所述的抗体，对采集的人组织中的淋巴管进行特异性免疫染色的方法。
9. 一种恶性肿瘤的恶性度的鉴别方法，其特征在于，包括如下步骤：
25 a) 使用权利要求 2 或 3 所述的抗体，对采集的人组织中的淋巴管进行特异性免疫染色的步骤；
b) 对在步骤 a) 中染色的染色像中的恶性肿瘤的浸润度进行测量的步骤；
c) 以步骤 b) 为基础，鉴别恶性肿瘤的恶性度的步骤。
- 30 10. 使用权利要求 2 或 3 所述的抗体分离和/或纯化人淋巴细胞的方

法。

11. 在人淋巴管的新生治疗中权利要求 2 或 3 所述的抗体的使用。

LYVE-1 的肽片段以及抗该肽片段的抗体

5

技术领域

本发明涉及作为在炎症时的创伤治愈时大量出现的细胞外基质的粘多糖乙酰透明质酸的受体的 LYVE-1（淋巴管特异性透明质酸受体-1）中的特定肽片段、抗该肽片段的抗体和它们的用途。特别是本发明的肽片段以及抗该肽片段的抗体，在淋巴管的组织学证明和针对恶性肿瘤向淋巴管浸润的免疫组织化学检查方面有用。

10

背景技术

作为细胞外基质之一的透明质酸是与细胞游走、创伤治愈、肿瘤转移等相关的重要因子，存在于生物体组织中几乎所有的细胞。借助透明质酸和细胞表面的透明质酸结合受体的细胞间应答，是细胞间相互作用的重要手段之一。另外，最近，有报道认为透明质酸不仅作为细胞游走因子发挥功能，还作为核内转录因子之一的 NF（nuclear factor）- κ B 的活化或血管形成的促进因子发挥功能。

15

关于在细胞膜上局部存在的几个透明质酸结合受体，如今已经确定例如 CD44（淋巴细胞抗原簇 Clusters of Differentiation 中的一个）、LYVE-1（lymphatic vessel endothelial HA receptor）、RHAMM（Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility）、LEC（Liver Endothelial Cell clearance）受体等，在这些透明质酸结合受体中，LYVE-1 是作为由 322 个氨基酸构成的受体被发现的（参照 J. Cell Biol. 144, 789-801（1999））。

20

25

LYVE-1 的 mRNA 在脾脏、淋巴结、胎儿肝脏、心脏、肺等全身广泛可见，现已查明 LYVE-1 的受体在这些组织内的淋巴管内皮中局部存在。从这些可以看出 LYVE-1 可以用于鉴定在形态上与毛细血管难以区分的淋巴管。

30

例如，在恶性肿瘤的淋巴行性转移中，肿瘤向周围组织浸润之后，破

坏性浸润淋巴管壁而侵入淋巴管，被淋巴行性搬运，经过转移到远离原发病巢的部位的行程，而在该浸润过程中，也会造成对包括淋巴管的宿主组织的破坏。

因而，如果能够得到在病理组织中的淋巴管的详细观察结果，就会成为该肿瘤破坏性浸润性增殖的有用的病理像。

到目前为止，有几个关于捕捉肿瘤破坏性浸润淋巴管壁而浸润淋巴管的状态的报道（参照高沢博：“实验性淋巴行性转移形成中的移植部淋巴管的电镜研究”日本癌学会总会记事、30，296（1971）、荒木京二郎：“癌的浸润初期与淋巴管侵袭的电镜研究—N—甲基—N’—硝基—n—亚硝基胍（MNNG）诱发大鼠胃癌中的观察—”冈山医志、91，659—669（1979）、James N, et al: “Lewis 肺癌在小鼠爪垫中的生长与转移” *Expl. Cell Biol.*、56，221—228（1992）、Carr I., et al: “肿瘤入侵的良好结构：Rd/3 肿瘤向肝脏、骨骼肌和淋巴管的入侵。” *J. Pathol.*、118，91—99（1976）、Paku S., et al: “在大鼠中通过淋巴行性肿瘤细胞转移的实验性诱导入侵的超结构分析。” *Anticancer Res.*、6，957—966（1986））。

但是，这些报道是在电子显微镜的细胞水平的研究，并没有报道在组织水平上观察组织中浸润到淋巴管的肿瘤的状态。

另一方面，研发出用于通过染色观察病理组织中的病理像的组织等的染色方法。例如，酶抗体法等免疫组织化学染色方法在特异性、重复性等方面出色，本发明中的方法也属于该范畴。但是，以淋巴管作为染色的目标，对其选择性地方法进行染色的方法到目前为止还没有。

发明内容

本发明的目的在于，提供可以作为淋巴管特异性抗体的抗原决定簇的 LYVE-1 的特定的肽片段以及识别该肽片段的抗体。另外，本发明的目的还在于，提供使用以 LYVE-1 中的特定肽片段为基础得到的抗体并选择性对淋巴管进行染色的方法，换言之，提供从其染色结果得到对恶性肿瘤的破坏性浸润性增殖的病理学观察结果的方法。

为了解决上述课题，本发明人等从 LYVE-1 的氨基酸序列中选择各种肽片段，借助作为连接序列的氨基酸（例如半胱氨酸等）以及适当的间

隔序列（例如 MBS（间马来酰亚胺苯甲酰基-N-羧基琥珀酰亚胺酯）等）使适当的免疫原识别辅基（例如 KLH: keyhole limpet hemocyanin（匙孔血蓝蛋白）等）与该选择的肽片段结合，将其作为免疫原免疫兔子。从免疫的兔子的血清提取抗体，纯化该抗体，使用提取的人组织进行免疫染色。

5 于是，即使在各种肽片段中，也是 LYVE-1 受体的氨基酸序列上的区域，在满足①是亲水性区域、②是没有附加糖的区域、③是具有 β 转角（turn）结构的区域以及④是细胞内区域这 4 个条件的氨基酸序列中，使用与在 GenBank 中 Accession number AF118108 下登记的氨基酸序列中的第 297 位~第 308 位相当的、用下述序列：

10 Ser-Lys-Lys-Thr-Asp-Lys-Asn-Pro-Glu-Glu-Ser-Lys（序列编号 1）

表示的肽片段，在进行上述抗体的调制和免疫染色之后，其染色对淋巴管具有特异性。进而，从使用了本发明的抗体的免疫染色的结果可以得到在生物体组织中的淋巴管的详细观察结果。另外，特别是可以得到通常难以确认的关于早期恶性肿瘤的破坏性浸润性增殖的病理学观察结果。

15 即，本发明涉及由序列编号 1 中记载的氨基酸序列构成的肽片段或在其 C 末端或者 N 末端上附加 1 个氨基酸作为连接序列的肽片段，另外还涉及抗该肽片段的抗体。

另外，本发明还涉及用以下序列：

20 TCA AAG AAA ACT GAT AAA AAC CCA GAA GAG
TCC AAG（序列号 2）

表示的且编码用上述酸序列号 1 表示的肽片段的 DNA 片段。

另外，本发明还涉及对人淋巴管特异性乙酰透明质酸受体-1（LYVE-1）具有特异性的上述抗体。

25 另外，本发明还涉及在序列号 1 所记载的氨基酸序列中，由缺失、取代或附加 1 或者几个氨基酸的氨基酸序列构成而且通过上述抗体识别的肽片段或在其 C 末端或者 N 末端上附加了作为连接序列的 1 个氨基酸的肽片段以及编码它们的 DNA 片段。

另外，本发明还涉及用于纯化上述抗体的上述肽片段的使用。

30 此外，本发明还涉及以含有上述抗体为特征的人淋巴管免疫染色用组合物以及人淋巴管免疫染色用试剂盒。

在这里，该人淋巴管免疫染色用试剂盒除了包括本发明的抗体之外，还可以包括3%过氧化氢水等内源性过氧化物酶的封闭试剂、生物素化标记抗兔免疫球蛋白抗体、过氧化物酶标记链亲和素、Tris 盐酸缓冲液等基质缓冲液、DAB（3，3'-二氨基联苯胺四盐酸盐）等显色试剂和/或0.8%过氧化氢水等基质试剂等。

另外，本发明还涉及使用本发明的抗体对采集的人淋巴管进行特异性免疫染色的方法。

进而，本发明还涉及通过使用本发明的抗体对人淋巴管进行特异性免疫染色来测量恶性肿瘤中的浸润度的方法以及通过测量该浸润度来诊断恶性肿瘤的恶性度的方法。

进而，此外，本发明还涉及使用了本发明的抗体的人淋巴细胞的分离、纯化即淋巴管细胞及其前体细胞的分取。为了进行细胞的分取，例如可以利用细胞分离器（cell sorter）、磁性细胞分离法等。另外，分取的细胞例如可以用于以减轻淋巴管浮肿为目的的淋巴管新生治疗等。

15 肽片段的调制

本发明的肽片段的调制可以使用市售的自动肽合成装置很容易地进行。

抗原的调制

为了提高肽片段的抗原性，在肽片段上结合载体蛋白质。另外，在肽片段与载体蛋白质结合中，为了避免立体障碍等妨碍抗原-抗体反应，使用连接序列和间隔序列。即，作为抗原，使用肽片段-连接序列-间隔序列-载体蛋白质的结合物是有利的。

作为可以在抗原调制中使用的连接序列，例如可以举出半胱氨酸、谷氨酸、酪氨酸等具有介导肽片段与间隔序列之间的结合的能力的即具有连接能力的氨基酸，优选的可以举出半胱氨酸。

在这里，间隔序列可以与肽片段的C末端或N末端的任意1个结合，优选与N末端结合。

优选在N末端结合连接序列的原因如下述。即，肽片段由于是从C末端开始合成，所以通过使连接序列与N末端结合，可以防止非全长肽片段与载体蛋白质结合。另外，这是因为当在C末端具有半胱氨酸时，

有时会发生螺旋化，不得不采取其防止措施，所以产量也变低。

另外，作为可以用于调制抗原的间隔序列，例如可以举出 MBS（间马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯）、SMCC（琥珀酰亚胺基 4-（N-马来酰亚胺甲基）环己烷-1-羧酸）、Sulfo-SMCC（磺基琥珀酰亚胺基 4-（N-马来酰亚胺甲基）环己烷-1-羧酸）或者 Sulfo-MBS（间马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯）等交联试剂，优选 MBS。

进而，作为可以用于调制抗原的载体蛋白质，例如可以举出牛白蛋白、卵清蛋白、肌球蛋白以及匙孔血蓝蛋白（KLH）等蛋白质，优选有利地使用 KLH。

肽片段与连接序列的结合可以通过自动肽合成装置容易地进行。另外，间隔序列与载体蛋白质的结合也可以通过以往的方法容易地进行。

抗体的调制

与佐剂一起乳化在调制上述抗原中得到的抗原来免疫动物。免疫后，对动物进行放血，分离抗血清。通过亲和层析法从该抗血清分取抗体。

在调制抗体中，作为免疫动物，例如可以使用小鼠、兔、大鼠、羊等等，作为优选的免疫动物，可以举出兔或羊。

另外，通过通常的单克隆抗体调制方法，也可以将本抗体调制为单克隆抗体。

抗体的免疫特异性的研究

用通常的方法，通过表达 LYVE-1 基因的细胞得到蛋白质样品，通过 Western 印迹将其转印到尼龙滤膜上作为滤膜样品。制作多个该滤膜样品。使滤膜样品的一部分与本发明的 LYVE-1 抗体发生反应，使残存的滤膜样品与如下所示的试验液体发生反应，其中，所述的试验液体是由预先使本发明的 LYVE-1 抗体和用于免疫的肽发生反应而产生的。采用使用了酶结合第 2 抗体的染色方法等通常的染色方法，对已发生反应的滤膜进行染色。

其结果，可以确认在与本发明的 LYVE-1 抗体发生反应的滤膜样品中有 LYVE-1 与 LYVE-1 抗体结合的带，在使预先让本发明的 LYVE-1 抗体与用于免疫的肽反应而产生的试验液体发生反应的滤膜样品中，没

有该带，所以可以确认本发明的 LYVE-1 抗体对 LYVE-1 有特异性。

组织染色

5 制作人正常组织的固定石蜡切片或冰冻切片，使本发明的 LYVE-1 抗体发生反应。接着，通过酶抗体法、荧光抗体法等通常的染色法进行染色。

其结果是只对组织切片的淋巴管进行染色，对其它部分不染色。从该结果可知，本发明的 LYVE-1 抗体是特异性识别淋巴管的抗体。进而，在可以观察到癌浸润的标本中，对 LYVE-1 抗体显示阳性的部分为淋巴管，由此可知本发明的 LYVE-1 抗体对淋巴管具有特异性。

10 下面进一步通过实施例对本发明进行具体说明。

附图说明

图 1 是表示对合成的抗原肽进行苜基化并加入 0.1% 三氟醋酸进行质量分析的质量分析谱的图。测量条件表示如下。

15 用 PE Biosystems Voyager System 1162 进行测量

Mode of operation: (测量方式)	线性
Extraction mode: ((数据)抽取方式)	延迟
Polarity: (极性)	正
Acquisition control: ((数据)获取调整)	手工

20

Accelerating voltage: (加速电压)	20000 V
Grid voltage: (栅压)	94%
Guide wire 0: ((数据)抽取延迟时间)	0.1%
Extraction delay time:	225 nsec

25

Digitizer start time: (测量范围)	500—3000Da
Number of laser shots: (激光照射次数)	128/spectrum
Laser intensity: (激光强度)	2119
Calibration type: (校准法)	外面

30

Calibration matrix: ((用于)校准的矩阵)	a-氰基-4-羟基肉
---------------------------------	------------

		桂酸
	Low mass gate:	500Da
	Digitizer start time (数字转换器开始时间)	14.2498
5	Bin size:	2nsec
	Number of data points: (数据点数)	50000
	Vertical scale (纵坐标):	1000mV
	Vertical offset (垂直偏移):	1%
	Input bandwidth (输入带宽):	100MHz
10	Sample well: (样品凹下部 (位置))	34
	Plate ID: (板 ID)	100
	Serial number: (序列号)	1162
	Instrument name: (机型名)	Voyager-DE
15	Plate type filename:(平板类型文件名) C: \VOYAGER\100well plate.pit	
	Lab name: (实验室名)	PE Biosystems
	Absolute x-position: (绝对 x-位置)	18588.6
	Absolute y-position (绝对 y-位置):	30956
20	Relative x-position: (相对 x-位置)	1761.12
	Relative y-position (相对 y-位置):	-1111.46
	Shots in spectrum	31
	Source pressure: (离子源真空度)	3.296e-007
	Mirror pressure: (镜真空度)	0
25	TC2 pressure:	0.01811
	TIS gate width:	30
	TIS flight length:	940

图 2 是表示使用了本发明的抗体的人的各种正常以及恶性肿瘤的组织染色图。在图 2 的各染色图中，箭形符号 (arrow) 所指的是用 LYVE

—1 抗体染色的淋巴管，箭头 (arrowhead) 所指的是用 von Willebrand factor (vWf) 染色的血管。

图 2-a 是表示通过 LYVE-1 抗体对插入了全长的 LYVE-1 的 cDNA 并表达蛋白的 cos7 细胞进行免疫染色的图。在图 2-a 中，可见 LYVE-1 主要在细胞表面的细胞膜上表达，在细胞质中也有轻度表达。

图 2-b~d 是表示胃组织的连续切片的染色图。图 2-b 是表示用苏木精-伊红 (Hematoxylin-Eosin) 染色 (HE 染色) 的图，图 2-c 是表示用 LYVE-1 抗体进行染色的图，另外，图 2-d 是表示使用了 vWf 抗体的免疫染色图。

图 2-e~m 是表示使用人的各种正常组织的 LYVE-1 抗体的免疫染色图。图 2-e 是表示食道、图 2-f 是表示结肠组织的染色结果，图 2-g 是表示图 2-f 的 LYVE-1 阳性管腔部的增强放大图像，图 2-h 是表示心脏、图 2-i 是表示肺、图 2-j 是表示肾脏、图 2-k 是表示前列腺、图 2-l 是表示卵巢、另外图 2-m 是表示胰脏组织的染色结果。

图 2-n~q 是表示在人的各种正常组织中具有窦结构的主要脏器的染色图。在图 2-n 中可以确认在肝脏的类窦内皮细胞中可见的 LYVE-1 表达的图，图 2-o 是其增强放大像。图 2-p 表示在脾脏的脾窦的内皮细胞中可见的 LYVE-1 表达的图，另外图 2-q 是表示在淋巴结内的淋巴管的内皮细胞以及网状纤维中可见的 LYVE-1 表达的图。

图 2-r~x 是表示人恶性肿瘤的病变部位组织的染色图。其中，图 2-r~t 是表示关于食道癌的组织图，在图 2-r 中，在 LYVE-1 阳性管腔内可见食道癌 (扁平上皮癌) 的肿瘤细胞块，表示淋巴管侵袭。另外，图 2-s 是表示该部分的增强放大像。图 2-t 是表示使用了图 2-r 的连续切片的 vWf 抗体的染色图。

图 2-u 和 v 是关于肺癌组织的图。图 2-u 是在肺支气管周围结缔组织内的 LYVE-1 阳性管腔内显示肺癌 (腺癌) 的肿瘤细胞块的图。图 2-v 是表示使用了图 2-u 的连续切片的 vWf 抗体的染色图。

图 2-w 和 x 是表示在人的心脏中发生的血管肉瘤的组织染色图，在图 2-w 中，可以确认在 LYVE-1 阳性管腔内有血管肉瘤的肿瘤块，在使用该连续切片进行 vWf 染色的图 2-x 中，也可以确认在 vWf 阳性管腔

内有 vWf 部分阳性的肿瘤细胞。

在图 2-r~x 中, 可以确认向具有 LYVE-1 阳性内皮细胞的淋巴管内的肿瘤细胞浸润。

各图中的放大率分别如下所述。a: 550 倍、g 和 s: 350 倍、o: 300 倍、j、u 和 v: 250 倍、w 和 x: 225 倍、k 和 p: 185 倍、b~d、f、l、m 和 q: 130 倍、h、i、n、r 和 t: 110 倍、e: 50 倍。

图 3-A 是表示在心脏肌层内的结缔组织内、心外膜脂肪组织内可见的 LYVE-1 阳性管腔的图。

图 3-B 是表示在肺胸膜下、血管周围等中可见的 LYVE-1 阳性管腔的图。

图 3-C 是表示在肾鲍曼氏 (Bowman) 囊周围、肾小管周围的间质中可见的 LYVE-1 阳性管腔的图。

图 3-D 是表示在以胰脏的血管周围为主的间质中可见的 LYVE-1 阳性管腔的图。

图 3-E 是表示在扁桃体的上皮下的淋巴小结内可见的 LYVE-1 阳性管腔的图。

图 3-F 是表示在胸腺的小叶间结缔组织内可见的 LYVE-1 阳性管腔的图。

图 3-G 是表示在从胃的粘膜固有层到浆膜全层中可见的 LYVE-1 阳性管腔的图。特别是沿着粘膜肌板在肌层多见。

图 3-H 是表示从小肠的粘膜固有层的粘膜上皮附近到浆膜的间质的组织的染色图。

图 3-I 是表示在舌的上皮下的结缔组织内可见的 LYVE-1 阳性管腔的图。

图 3-J 是表示在食管的上皮下的结缔组织内可见的 LYVE-1 阳性管腔的图。

图 3-K 是表示在从结肠的粘膜下层到浆膜的间质中可见的 LYVE-1 阳性管腔的图。

图 3-L 是表示在从膀胱的粘膜下层到浆膜的间质中可见的 LYVE-1 阳性管腔的图。

图 3-M 是表示在前列腺的腺腔间的血管附近、被膜中可见的 LYVE-1 阳性管腔的图。

图 3-N 是表示在睾丸的曲细精管周围的间质中可见的 LYVE-1 阳性管腔的图。

5 图 3-O 是表示在卵巢的皮质间质中可见的 LYVE-1 阳性管腔的图。

图 3-P 是表示在胎盘绒毛的间质中可见的 LYVE-1 阳性表达细胞的图。

图 3-Q 是表示在肝类窦血管的内皮细胞中可见的 LYVE-1 表达的图。

10 图 3-R 是表示在脾窦的内皮细胞中可见的 LYVE-1 表达的图。

图 3-S 是表示在输出入淋巴管内皮细胞和网状细胞中可见的 LYVE-1 表达的图。

图 3-T 是表示在肾上腺的窦样血管内皮细胞中可见的 LYVE-1 表达的图。

15 图 3-U 是表示食管癌中的淋巴管侵袭的染色像。在食管的粘膜下层的 LYVE-1 阳性管腔内可见肿瘤块。

图 3-V 是表示胃癌中的淋巴管侵袭的染色像。在组织的 LYVE-1 阳性管腔内可见肿瘤块。

20 图 3-W 是表示进行了 EMR 切除的胃癌组织中的淋巴管侵袭的图。在粘膜固有层的 LYVE-1 阳性管腔内可见肿瘤块。

图 3-X 是表示图 3-W 的放大图。

图 3-Y 是表示心脏的血管肉瘤中的淋巴管侵袭的图。在 LYVE-1 阳性管腔内可见肿瘤块。

25 图 3-Z 是表示在淋巴管肿瘤的不规则增生的管腔的内皮细胞中部分可以的 LYVE-1 表达的图。

图 4 是表示确认了抗体特异性的 Western 印迹图。

30 道 (lane) 1 和道 3 是表示和利用插入了 LYVE-1 基因的 Cos-7 细胞得到的样品发生反应的图, 道 2 和 4 是表示和利用没有插入 LYVE-1 基因的 Cos-7 细胞得到的样品发生反应的图。进而, 道 3 和 4 是表示使用预先使过量的本发明的肽片段反应而成的 LYVE-1 抗体进行反应的

图。

在道 1 中可见显色,在道 3 中无显色,由此可知本发明的抗体对 LYVE-1 蛋白质具有特异性。

5 具体实施方式

实施例 1 (抗原的调制)

使用 Genosys 公司制的 ABCus7 自动肽合成装置,通过固相法合成具有序列号 1 中记载的氨基酸序列的抗原肽片段。此时,向 N 末端附加成为连接序列的半胱氨酸,得到附加了连接序列的抗原肽片段 30mg。合成后,用高速液体层析纯化抗原肽片段。

如下所述对得到的抗原肽片段进行确认。即,对抗原肽片段进行苯基化,加入 0.1%三氟醋酸之后,用 ABI 公司制的 VoyagerSystem1162 质量分析器进行测量。在测量过程中,测量标准对照样本,在校正其理论分子量的差异之后,测量合成的肽片段,确认了与理论值一致(图 1)。

为了提高合成的抗原肽片段的抗原性,借助连接序列和间隔序列使血蓝蛋白(KLH)与抗原肽片段结合。首先,如下所述进行间隔序列与 KLH 的结合。将 KLH 16mg 溶解于 10mM 磷酸钠缓冲液(PH7.2) 1ml 中,向其中加入 MBS 2.8mg 的二甲替甲酰胺 1ml 溶液。在室温下搅拌 30 分钟以后,以 16000rpm 对溶液进行离心,利用通过交联葡聚糖 G25 的柱层析纯化其上清,得到 KLH-MBS 结合物质(含量 1.8mg/ml)。接着,混合 1mg 的上述抗原肽片段和 KLH-MBS 结合物质(相当于 KLH1mg)以及 1/2 体积的 0.2M 磷酸钠缓冲液,通过在氮气存在下且在室温中反应 3 小时,得到抗原。

实施例 2 (LYVE-1 抗体的调制)

将抗原(相当于抗原肽 100 μ g)与福氏(Freund)的完全佐剂一起在兔背部皮下进行免疫。

然后,以 2 周 1 次的比例,同样地将相当于抗原肽 100 μ g 的量的抗原与福氏(Freund)不完全佐剂一起进行免疫,共计免疫 5 次。在第 2 次免疫以后,通过使用抗原和纤维素醋酸酯膜的点印迹法确认抗体效价的上升。在确认抗体效价上升之后,进行全采血,分离抗血清。

接着，如下所述进行抗体的纯化。首先，使抗原肽与 Affigel 10 (BIO-RAD 公司) 结合，制作纯化用亲和柱。接着，用同量的 PBS (磷酸缓冲盐水) 稀释非动物血清 10ml，通过 0.45 μ m 的过滤器之后，添加到亲和柱中。用大约 50ml PBS 对柱进行清洗，然后用 5ml 的 50mM 柠檬酸缓冲液洗脱抗体。向洗脱的抗体中添加少量 2M Tris 缓冲液 (pH 9.5)，将洗脱抗体溶液的 PH 校正到 7.4。通过测量 280nm 波长的吸光度，来测量抗体浓度。

实施例 3 (LYVE-1 抗体的特异性研究)

将 LYVE-1 的蛋白质翻译区的全长基因插入到真核细胞表达质粒运载体中，使用脂质体试剂将该质粒运载体导入 Cos-7 细胞中，瞬间表达 LYVE-1 蛋白质。导入 24 小时后，用 PBS 清洗 Cos-7 细胞，用 Lysis 缓冲液 (20mM 的 Tris 盐酸缓冲液、140mM 盐水、0.1% Nonidet P-40、1 μ g/ml 蛋白分解抑制剂 (抑胃酶肽 (pepstatin)、亮抑蛋白酶肽 (Leupeptin) 和牛胰蛋白酶抑制剂 (Aprotinin) 的混合液) 溶解。以 15000rpm 离心该混合液，然后用 PAGE (聚丙烯酰胺凝胶电泳) 将其上清进行分离，然后转印到尼龙滤膜上，作为滤膜样品。将该滤膜样品的一部分与 LYVE-1 抗体发生反应。

另一方面，在 4 $^{\circ}$ C 下使抗体与抗原肽反应 1 个晚上，作为抗体吸收试样，同样使滤膜样品的一部分与抗体吸收试样发生反应。然后，与过氧化物酶标记抗兔 IgG 山羊血清反应，之后与化学发光检测试剂 (ECL Western 印迹试剂盒) 反应。检测是使用荧光图像分析仪 LAS-1000 (富士胶片) 进行的。其结果是，确认了在与 LYVE-1 抗体反应的滤膜样品中出现 LYVE-1 和 LYVE-1 抗体发生了反应的特异性带，而在与抗体吸收试样反应的滤膜样品中没有出现该带。由此证明了本抗体是 LYVE-1 特异性抗体。

实施例 4 (使用了 LYVE-1 抗体的组织染色)

使用在下述表 1 中表示的人的各种正常和病理组织的石蜡固定切片，对 LYVE-1 的定域进行检索。

表 1 通过 LYVE-1 染色的人组织

正常组织	恶性肿瘤
舌、食管、胃、小肠、结肠、心脏、肺、肾脏、膀胱、前列腺、睾丸、卵巢、胎盘、胰脏、肝脏、脾脏、肾上腺、扁桃腺、胸腺、淋巴结	食管癌、胃癌、肺癌、血管肉瘤（心脏）、淋巴管（淋巴管瘤）

对各切片进行脱蜡之后将其放置在载玻片上，在室温下使载玻片上的组织与 LYVE-1 抗体反应 30 分钟。用 PBS 清洗该载玻片之后，在室温下使其与生物素标记抗兔 IgG 山羊血清反应 30 分钟。

用 PBS 清洗反应物，进一步在室温下使其与链亲和素过氧化物酶结合试剂反应 30 分钟。PBS 清洗后，将 3,3'-二氨基联苯胺盐酸作为基质进行显色。将各组织的染色像显示于图 2。

另外，为了比较同一组织中的淋巴管内皮细胞的染色和血管内皮细胞的染色，也同样地进行通过 von Willebrand factor (vWF) 的血管内皮细胞的染色。

其结果是，在人的各种正常和病理组织中，通过 LYVE-1 抗体使淋巴管内皮细胞染色，但血管内皮细胞没有被染色。另外，通过 vWF 使血管内皮细胞染色，但淋巴管内皮细胞没有被染色。将各组织的染色像显示于图 3。

由上述实验结果，可以证明 LYVE-1 抗体是特异性识别淋巴管内皮细胞的抗体，以及 LYVE-1 抗体对淋巴管内的癌细胞浸润部的特定有用。

本发明可以提供 LYVE-1 的肽片段和抗该肽的抗体。利用本发明的抗体，可以只选择性地对生物体组织中的淋巴管进行染色。特别是，本发明的抗体在为了得到与通过生物体组织中的肿瘤导致的淋巴管的破坏性浸润性增殖有关的病理观察结果的使用中是有用的，进而可以得到用于利用本发明的抗体来诊断肿瘤的恶性度的指标，成为对癌症患者的治疗和预后有用的指标。

进而，本发明的抗体还可以用于利用了人淋巴细胞的分离、纯化的淋巴管的新生治疗。即，使用本发明的抗体，例如通过细胞分离器 (cell

sorter)、磁性细胞分离法等对淋巴管细胞及其前体细胞进行分取，可以将其例如用于以减轻淋巴管浮肿为目的的淋巴管新生治疗等。

(Lymphangiogenesis in tumors: What do we know? , Microscopy Research and Technique Volume 60 , Issue 2 , 171 – 180 , February 2003 ;

- 5 Lymphangiogenesis and Tumor Metastasis, Myth or Reality? Clinical Cancer Research Vol. 7, 462–468, March 2001; Expression of the Fms–Like Tyrosine Kinase 4 Gene Becomes Restricted to Lymphatic Endothelium During Development, Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol 92, 3566–3570, April 1995)

<110> 帝国脏器制药株式会社

<120> LYVE-1肽片段及其抗体

<130> KP-10557

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

Ser Lys Lys Thr Asp Lys Asn Pro Glu Glu Ser Lys

1

5

10

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> 人

<400> 2

tcaaagaaaa ctgataaaaa cccagaagag tccaag

36

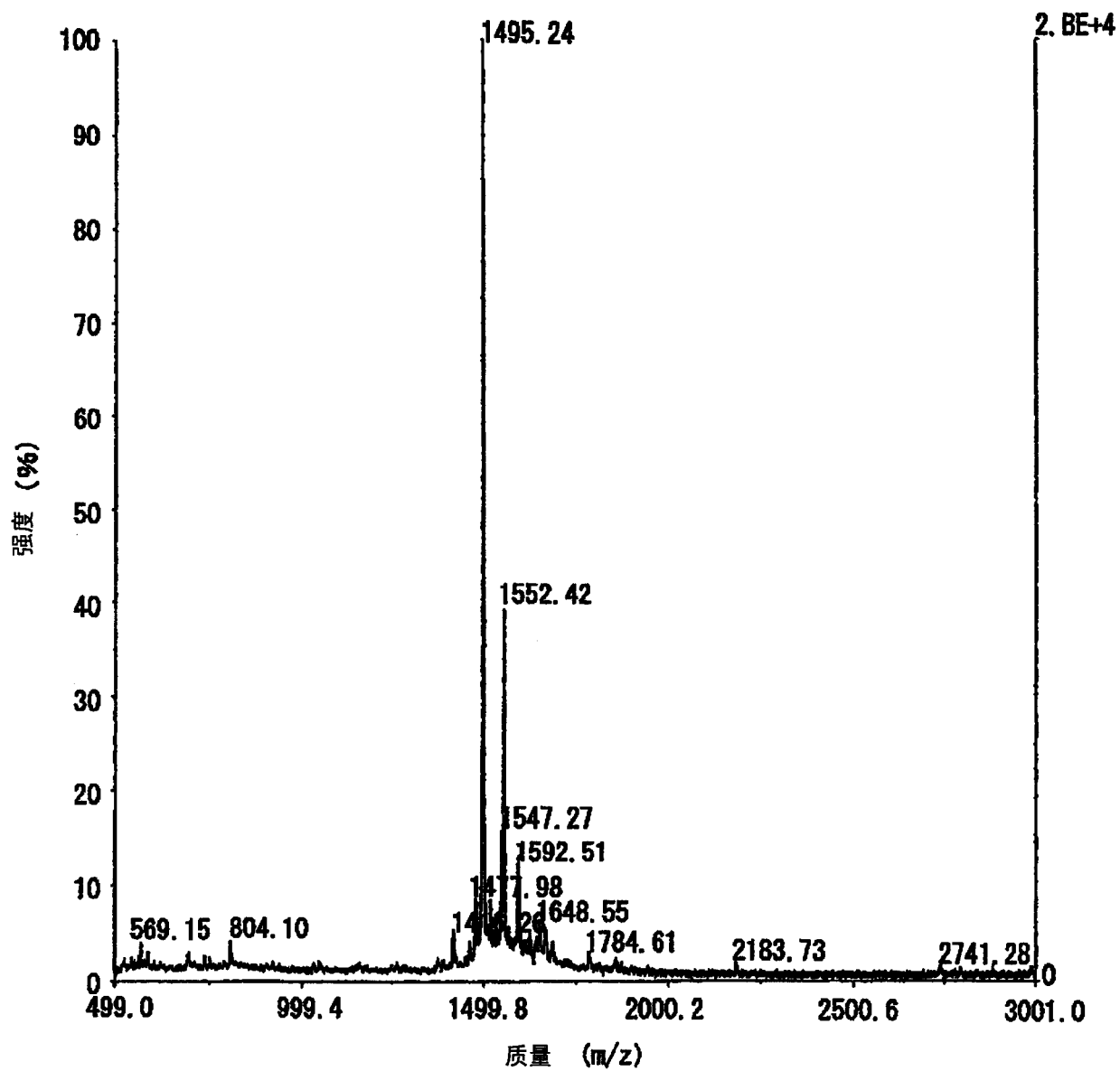


图 1

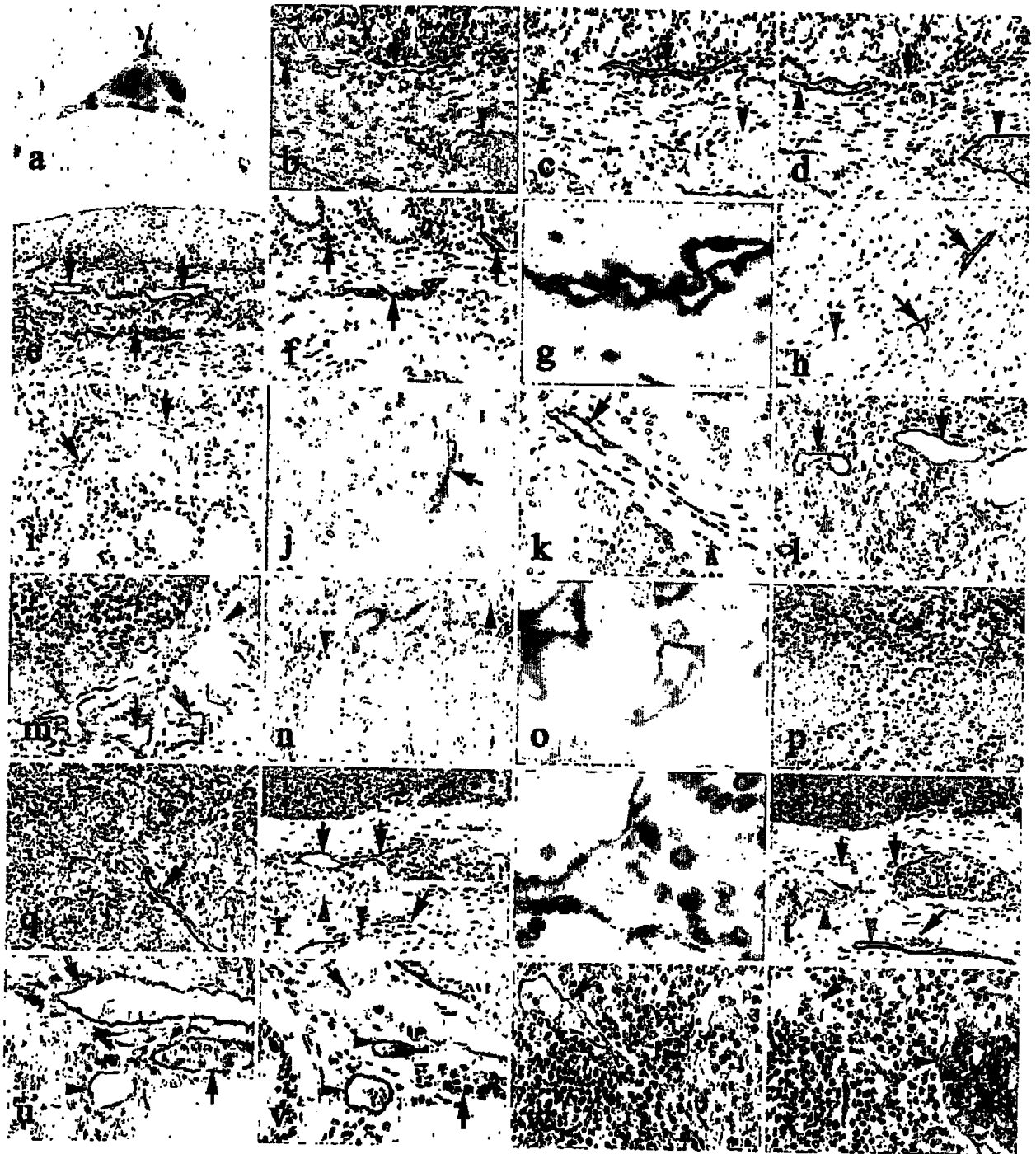


图 2

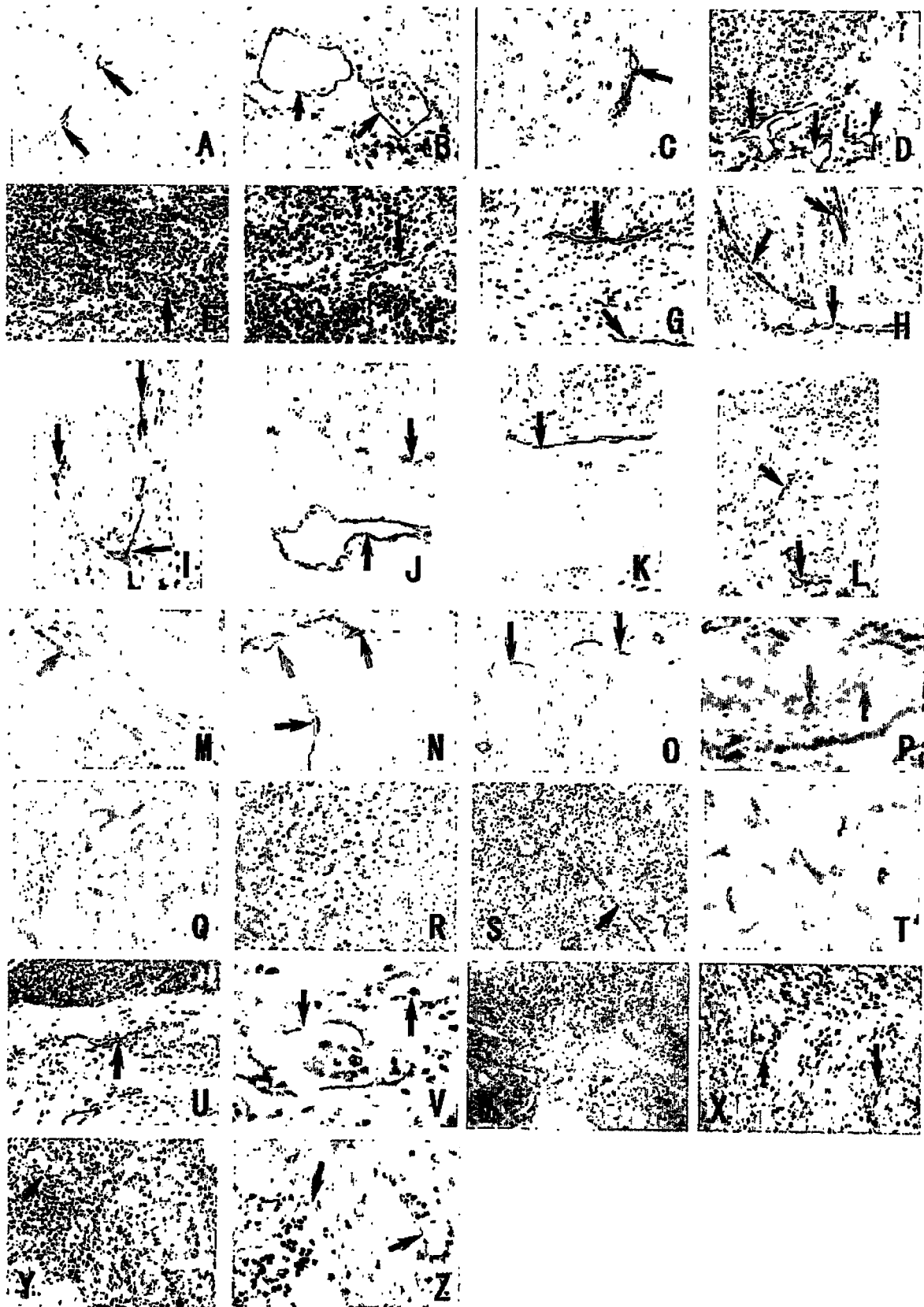


图 3

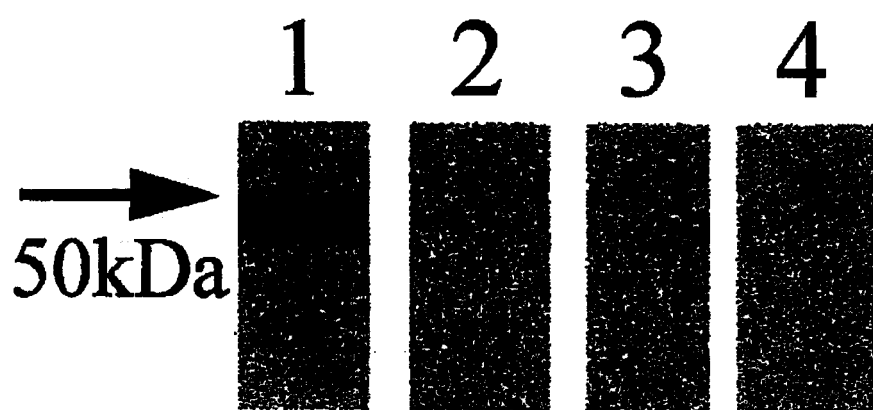


图 4

专利名称(译)	LYVE - 1的肽片段以及抗该肽片段的抗体		
公开(公告)号	CN1761679A	公开(公告)日	2006-04-19
申请号	CN200480006934.0	申请日	2004-03-11
[标]发明人	伊藤金次 石井寿晴 深泽由里		
发明人	伊藤金次 石井寿晴 深泽由里		
IPC分类号	C07K7/08 C07K14/705 C07K16/28 G01N33/53 C07K14/47 C07K16/18		
CPC分类号	C07K16/18 C07K14/47		
代理人(译)	李香兰		
优先权	2003070568 2003-03-14 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的目的在于提供一种可以作为淋巴管特异性抗体的抗原决定簇的LYVE - 1的特定的肽片段以及识别该肽片段的抗体。是一种由氨基酸序列：Ser - Lys - Lys - Thr - Asp - Lys - Asn - Pro - Glu - Glu - Ser - Lys构成的肽片段或在其C末端或者N末端上附加1个氨基酸作为连接序列的肽片段。

