

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2004/081035

発行日 平成18年8月24日 (2006. 8. 24)

(43) 国際公開日 **平成16年9月23日 (2004. 9. 23)**

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/705 (2006.01)	C07K 14/705 ZNA	2GO45
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	4BO24
C07K 1/22 (2006.01)	C07K 1/22	4CO85
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4HO45
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 N	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 24 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2005-503584 (P2005-503584)	(71) 出願人	000002990 あすか製薬株式会社 東京都港区芝浦二丁目5番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2004/003231	(74) 代理人	100078662 弁理士 津国 肇
(22) 国際出願日	平成16年3月11日 (2004. 3. 11)	(74) 代理人	100075225 弁理士 篠田 文雄
(31) 優先権主張番号	特願2003-70568 (P2003-70568)	(72) 発明者	伊藤 金次 東京都目黒区緑ヶ丘3-9-10
(32) 優先日	平成15年3月14日 (2003. 3. 14)	(72) 発明者	石井 壽晴 東京都新宿区大久保2-18-17-203
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	秋嶋 由里 東京都大田区中馬込1-15-18

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 LYVE-1 のペプチドフラグメント及びそれに対する抗体

(57) 【要約】

リンパ管特異的抗体のエピトープとなり得る LYVE-1 の特定のペプチドフラグメント及びそのペプチドフラグメントを認識する抗体を提供すること。 アミノ酸配列：Ser Lys Lys Thr Asp Lys Asn Pro Glu Glu Ser Lys からなるペプチドフラグメント又はそのC末端若しくはN末端にリンカーとして一つのアミノ酸が付加されたペプチドフラグメント。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドフラグメント又はその C 末端若しくは N 末端にリンカーとして一つのアミノ酸が付加されたペプチドフラグメント。

【請求項 2】

請求の範囲第 1 項に記載のペプチドフラグメントに対する抗体。

【請求項 3】

ヒトリンパ管特異的ヒアルロナン受容体-1 (LYVE-1) に特異的である、請求の範囲第 2 項に記載の抗体。

【請求項 4】

配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ請求の範囲第 2 項又は第 3 項に記載の抗体によって認識されるペプチドフラグメント又はその C 末端若しくは N 末端にリンカーとして一つのアミノ酸が付加されたペプチドフラグメント。

【請求項 5】

請求の範囲第 2 項又は第 3 項に記載の抗体を調製するための、請求の範囲第 1 項又は第 4 項に記載のペプチドフラグメントの使用。

【請求項 6】

請求の範囲第 2 項又は第 3 項に記載の抗体を含むことを特徴とする、ヒトリンパ管免疫染色用組成物。

【請求項 7】

請求の範囲第 2 項又は第 3 項に記載の抗体を含むことを特徴とする、ヒトリンパ管免疫染色用試薬キット。

【請求項 8】

採取したヒト組織におけるリンパ管を、請求の範囲第 2 項又は第 3 項に記載の抗体を用いて特異的に免疫染色する方法。

【請求項 9】

悪性腫瘍の悪性度の鑑別方法であって、次のステップ；

a) 採取したヒト組織におけるリンパ管を、請求の範囲第 2 項又は第 3 項に記載の抗体を用いて特異的に免疫染色するステップ、

b) ステップ a) で染色した染色像における悪性腫瘍の浸潤度を測定するステップ、

c) ステップ b) に基づいて悪性腫瘍の悪性度を鑑別するステップ、
からなる方法。

【請求項 10】

請求の範囲第 2 項又は第 3 項に記載の抗体を用いて、ヒトリンパ球を分離及び／又は精製する方法。

【請求項 11】

ヒトリンパ管の新生治療における、請求の範囲第 2 項又は第 3 項に記載の抗体の使用。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】**

本発明は、炎症時の創傷治癒時に多く出現する細胞外基質のグリコサミノグリカンヒアルロナンに対する受容体である LYVE-1 (リンパ管特異的ヒアルロナン受容体-1) の中の特定のペプチドフラグメント、そのペプチドフラグメントに対する抗体およびそれらの用途に関する。特に、本発明のペプチドフラグメント及びそれに対する抗体はリンパ管の組織学的証明やリンパ管への悪性腫瘍の浸潤に対する免疫組織化学検査に関して有用である。

【背景技術】

細胞外基質の一つであるヒアルロン酸は、細胞遊走、創傷治癒、腫瘍転移等に関連した重要な因子であり、生体組織における殆んど全ての細胞に存在する。ヒアルロン酸と細胞表面のヒアルロン酸結合受容体を介した細胞間応答は、細胞間相互作用の重要な手段の一

10

20

30

40

50

つに挙げられる。また、最近では、ヒアルロン酸については細胞遊走因子としてのみでなく、核内転写因子の一つであるNF (nuclear factor) - κ Bの活性化や脈管形成の促進因子としての能力も報告されている。

細胞膜に局在するいくつかのヒアルロン酸結合受容体については、今日までに、例えば、CD44 (リンパ球抗原群 Clusters of Differentiation のうちのの一つ)、LYVE-1 (lymphatic vessel endothelial HA receptor)、RHAMM (Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility)、LEC (Liver Endothelial Cell clearance) 受容体などが同定されており、これらヒアルロン酸結合受容体の中で、LYVE-1は322個のアミノ酸残基からなる受容体として見出された (J. Cell Biol. 144, 789-801 (1999) 参照)。

LYVE-1のmRNAは脾臓、リンパ節、胎児肝臓、心臓、肺など全身に広く発現されており、LYVE-1受容体は、それら組織内のリンパ管内皮に局在することが明らかにされている。このことから、LYVE-1は、形態的に毛細血管と区別が困難なリンパ管の同定に利用できると考えられる。

例えば、悪性腫瘍のリンパ行性転移においては、腫瘍が周囲の組織へと浸潤した後、リンパ管壁を破壊的に浸潤してリンパ管に侵入し、リンパ行性に運搬されて、原発巣とは離れた部位に転移する行程を経るが、この浸潤過程において、リンパ管を含む宿主組織の破壊がもたらされる。

従って、病理組織におけるリンパ管の詳細な所見が得られれば、その腫瘍の破壊性浸潤性増殖の有用な病理像となるものと考えられる。

これまでに、腫瘍がリンパ管壁を破壊的に浸潤してリンパ管に浸潤する様子をとらえた報告がいくつかなされている (高沢 博:「実験的リンパ行性転移形成における移植部リンパ管の電顕的研究」日本癌学会総会記事、30, 296 (1971)、荒木 京二郎:「癌の浸潤初期とリンパ管侵襲の電顕的研究-N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) 誘発ラット胃癌における観察」岡山医誌、91, 659-669 (1979)、James N., et al:「Growth and metastasis of Lewis lung carcinoma in the footpad of mice.」Expl. Cell Biol. 56, 221-228 (1992)、Carr I., et al:「The fine structure of neoplastic invasion: invasion of liver, skeletal muscle and lymphatic vessels by the Rd/3 tumour.」J. Pathol. 118, 91-99 (1976)、Paku S., et al:「Ultrastructural analysis of experimentally induced invasion in the rat lung by tumour cells metastasizing lymphatically.」Anticancer Res. 6, 957-966 (1986) 参照)。

しかし、これらの報告は電子顕微鏡による細胞レベルの研究であり、組織においてリンパ管に浸潤する腫瘍の様子を組織レベルで観察した報告はない。

一方、病理組織における病理像を染色によって観察するための、組織等の染色方法が種々開発されてきた。例えば、酵素抗体法などの免疫組織化学的な染色方法は、特異性、再現性等に優れており、本発明による方法もこの範疇に属するものである。しかしながら、リンパ管を染色の標的とし、これを選択的に染色する方法はこれまで知られていない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、リンパ管特異的抗体のエピトープとなり得るLYVE-1の特定のペプチドフラグメント及びそのペプチドフラグメントを認識する抗体を提供することである。また、本発明の目的は、LYVE-1における特定のペプチドフラグメントに基づいて

得られた抗体を用いてリンパ管を選択的に染色する方法、言い換えれば、その染色結果から悪性腫瘍の破壊性浸潤性増殖についての病理学的所見を得る方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するため、LYVE-1のアミノ酸配列の中から種々のペプチドフラグメントを選択し、その選択したペプチドフラグメントに適当な、リンカーとしてのアミノ酸（例えば、システインなど）及び適当なスペーサー（例えば、MBS（*m*-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシニミドエステル）など）を介して免疫源認識補助基（例えば、KLH：keyhole limpet hemocyanin（スカシ貝ヘモシアニン）など）を結合し、これを免疫源としてウサギを免疫した。免疫したウサギの血清から抗体を抽出、精製し、採取したヒト組織を使用して免疫染色を行った。

すると、種々のペプチドフラグメントの中でも、LYVE-1受容体のアミノ酸配列上の領域であって、▲1▼親水性領域であること、▲2▼糖付加されない領域であること、▲3▼βターン構造をとる領域であること及び▲4▼細胞内領域であることの4つの条件を満たすアミノ酸配列のうち、GenBankにAccession number AF118108の下に登録されたアミノ酸配列における第297位～第308位に相当する、以下の配列：

Ser-Lys-Lys-Thr-Asp-Lys-Asn-Pro-Glu-Glu-Ser-Lys （配列番号 1）

で表されるペプチドフラグメントを用いて、上記の抗体の調製及び免疫染色を行ったところ、その染色がリンパ管に特異的であることがわかった。さらに、本発明の抗体を用いた免疫染色の結果から、生体組織におけるリンパ管の詳細な所見を得ることができた。また、特に、通常は確認が困難な早期の悪性腫瘍の破壊性浸潤性増殖についての病理学的所見を得ることができたのである。

すなわち、本発明は、配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドフラグメント又はそのC末端若しくはN末端にリンカーとして一つのアミノ酸が付加されたペプチドフラグメントに関するものであり、さらに当該ペプチドフラグメントに対する抗体にも関する。

また、本発明は、以下の配列：

TCA AAG AAA ACT GAT AAA AAC CCA GAA

GAG TCC AAG

（配列番号2）

で表される、上記配列番号1で表されるペプチドフラグメントをコードするDNAフラグメントにも関する。

また、本発明は、ヒトリンパ管特異的ヒアルロナン受容体-1（LYVE-1）に特異的である、上記抗体にも関する。

また、本発明は、配列番号1に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ上記抗体によって認識されるペプチドフラグメント又はそのC末端若しくはN末端にリンカーとして一つのアミノ酸が付加されたペプチドフラグメント及びそれらをコードするDNAフラグメントにも関する。

さらに、本発明は、上記抗体を調製するための、上記ペプチドフラグメントの使用にも関する。

加えて、本発明は、上記抗体を含むことを特徴とする、ヒトリンパ管免疫染色用組成物及びヒトリンパ管免疫染色用試薬キットにも関する。

ここで、当該ヒトリンパ管免疫染色用試薬キットは、本発明の抗体の他、3%過酸化水素水等の内因性パーオキシダーゼのブロック試薬、ビオチン化標識抗ウサギイムノグロブリン抗体、パーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン、トリス塩酸緩衝液等の基質緩衝液、DAB（3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩）等の発色試薬及び/又は0.8%過酸化水素水等の基質試薬等を含むことができる。

10

20

30

40

50

また、本発明は、採取したヒトリンパ管を、本発明の抗体を用いて特異的に免疫染色する方法にも関する。

さらに、本発明は、本発明の抗体を用いてヒトリンパ管を特異的に免疫染色することによる、悪性腫瘍における浸潤度の測定方法、及び当該浸潤度を測定することによる、悪性腫瘍の悪性度の診断方法にも関する。

さらに加えて、本発明は、本発明の抗体を用いたヒトリンパ球の分離、精製、すなわちリンパ管細胞及びその前駆細胞の分取にも関する。細胞の分取には、例えば、細胞分離機器（セルソーター）、磁気細胞分離法等を利用することができる。また、分取した細胞は、例えば、リンパ管浮腫の軽減を目的としたリンパ管新生治療等に用いることができる。

ペプチドフラグメントの調製

本発明のペプチドフラグメントの調製は、市販の自動ペプチド合成装置を用いて容易に行うことができる。

抗原の調製

ペプチドフラグメントの抗原性を高めるために、ペプチドフラグメントにキャリアタンパク質を結合させる。また、ペプチドフラグメントとキャリアタンパク質との結合には、立体障害等による抗原-抗体反応の阻害を避けるため、リンカー及びスペーサーを用いる。すなわち、抗原として、ペプチドフラグメント-リンカー-スペーサー-キャリアタンパク質の結合物を用いるのが有利である。

抗原の調製において用いることのできるリンカーとしては、例えば、システイン、グルタミン酸、チロシン等の、ペプチドフラグメントとスペーサーとの結合を仲介する能力、すなわち、リンク能力を有するアミノ酸が挙げられ、好ましくはシステインを挙げることができる。

ここで、リンカーは、ペプチドフラグメントのC末端又はN末端のどちらに結合することもできるが、N末端に結合することが好ましい。

リンカーをN末端に結合するほうが好ましい理由は次のとおりである。すなわち、ペプチドフラグメントはC末端から合成されるため、リンカーをN末端に結合することにより、不完全長のペプチドフラグメントがキャリアタンパク質と結合されるのを防ぐことができる。また、C末端にシステインがある場合は、ラセミ化が起こることがあり、その防止措置を講じなければならず、収量も低くなるからである。

また、抗原の調製において用いることのできるスペーサーとしては、例えば、MBS（*m*-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシニミドエステル）、SMCC（スクシニミジル 4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸）、Sulfo-SMCC（スルホスクシニミジル 4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸）又はSulfo-MBS（*m*-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホスクシニミドエステル）等の架橋試薬を挙げることができ、MBSが好ましい。

さらに、抗原の調製において用いることのできるキャリアタンパク質としては、例えば、牛アルブミン、卵白アルブミン、ミオグロビン及びスカシ貝ヘモシアニン（KLH）等のタンパク質が挙げられ、好ましくはKLHが有利に用いられる。

ペプチドフラグメントとリンカーとの結合は、自動ペプチド合成装置により容易に行うことができる。また、スペーサー及びキャリアタンパク質の結合も従来の方法により容易に行うことができる。

抗体の調製

上記抗原の調製において得られた抗原をアジュバントと共に乳化して動物に免疫する。免疫後、動物を放血させ、抗血清を分離する。この抗血清からアフィニティークロマトグラフィー法により抗体を分取する。

抗体の調製においては、免疫動物として、例えば、マウス、ウサギ、ラット、羊等を用いることができるが、好ましい免疫動物としては、ウサギ又は羊を挙げることができる。

また、一般的なモノクローナル抗体調製方法により、本抗体をモノクローナル抗体として調製することもできる。

抗体の免疫特異性の検討

10

20

30

40

50

LYVE-1 遺伝子を発現させた細胞より通常の方法にてタンパク質試料を得、これをウェスタンブロットティングによりナイロンフィルターに転写してフィルター試料とした。このフィルター試料を複数作製した。フィルター試料の一部は本発明のLYVE-1抗体と反応させ、残りのフィルター試料を、本発明のLYVE-1抗体と免疫に使用したペプチドを予め反応させておいた試液と反応させた。反応させたフィルターは、酵素結合第2抗体を用いた染色方法等の一般的な染色方法により染色した。

その結果、本発明のLYVE-1抗体と反応させたフィルター試料にはLYVE-1とLYVE-1抗体とが結合したバンドが確認され、本発明のLYVE-1抗体と免疫に使用したペプチドを予め反応させておいた試液を反応させたフィルター試料にはそのバンドが確認されないことから、本発明のLYVE-1抗体はLYVE-1に特異的であることが確認された。

10

組織染色

ヒト正常組織の固定パラフィン切片又は凍結切片を作製し、本発明のLYVE-1抗体を反応させた。そして、酵素抗体法、蛍光抗体法等の一般的な染色法により染色を行った。

その結果、組織切片のリンパ管のみが染まり、その他の部分は染まらなかった。この結果から、本発明のLYVE-1抗体は、リンパ管を特異的に認識する抗体であることがわかった。さらに、癌浸潤が見られる標本においてLYVE-1抗体に陽性を示す部分がリンパ管であることから、本発明のLYVE-1抗体がリンパ管に特異的であることがわかった。

20

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

【図面の簡単な説明】

図1は、合成した抗原ペプチドをベンジル化し、0.1%トリフルオロ酢酸を加えて質量分析を行った、その質量分析スペクトルを示す図である。測定条件を以下に示す。

PE Biosystems Voyager System 1162にて測定した

Mode of operation:	(測定モード)	Linear	
Extraction mode:	((データ抽出モード)	Delayed	
Polarity:	(極性)	Positive	(正)
Acquisition control:	((データ)取込み調整)	Manual	(マニュアル)
Accelerating voltage:	(加速電圧)	20000 V	
Grid voltage:	(グリッド電圧)	94%	
Guide wire 0:	((データ)抽出遅延時間)	0.1%	
Extraction delay time:		225 nsec	10
Acquisition mass range:	(測定範囲)	500 -- 3000 Da	
Number of laser shots:	(レーザー照射回数)	128/spectrum	
Laser intensity:	(レーザー強度)	2119	
Calibration type:	(校正法)	External	
Calibration matrix:	(校正(に用いた)マトリックス)	a-Cyano-4-hydroxycinnamic acid	
Low mass gate:		500 Da	
Digitizer start time:		14.2498	
Bin size:		2 nsec	
Number of data points:	(データポイント数)	50000	20
Vertical scale:		1000 mV	
Vertical offset:		1%	
Input bandwidth:		100 MHz	
Sample well:	(試料ウェル(位置))	34	
Plate ID:	(プレートID)	100	
Serial number:	(シリアルナンバー)	1162	
Instrument name:	(機種名)	Voyager-DE	
Plate type filename:	(プレートタイプファイル名)	C:\VOYAGER\100 well plate.plt	
Lab name:	(研究室名)	PE Biosystems	30
Absolute x-position:	(絶対×位置)	18588.6	
Absolute y-position:		30956	
Relative x-position:	(相対×位置)	1761.12	
Relative y-position:		-1111.46	
Shots in spectrum:		31	
Source pressure:	(イオン源真空度)	3.296e-007	
Mirror pressure:	(ミラー真空度)	0	
TC2 pressure:		0.01811	
TIS gate width:		30	
TIS flight length:		940	40

図2は、本発明の抗体を用いたヒトの各種正常及び悪性腫瘍の組織の染色図である。図2の各染色図において、矢印 (arrow) はLYVE-1抗体により染色されたリンパ管を指し、矢じり (arrowhead) はvon Willebrand factor (vWf) により染色された血管を指す。

図2-aは、全長のLYVE-1のcDNAを組み込み、蛋白発現させたcos7細胞をLYVE-1抗体により免疫染色した図である。図2-aにおいて、LYVE-1は主に細胞表面の細胞膜に発現がみられ、細胞質にも軽度の発現を認めた。

図2-b~dは、胃組織の連続切片の染色図である。図2-bはHematoxylin-Eosin染色 (HE染色) によるもの、図2-cはLYVE-1抗体による染色、そして、図2-dはvWf抗体を用いた免疫染色図である。

図2-e~mは、ヒトの各種正常組織のLYVE-1抗体を用いた免疫染色図である。図2-eは食道、図2-fは結腸、図2-gは図2-fのLYVE-1陽性管腔部の強拡大像、図2-hは心臓、図2-iは肺、図2-jは腎臓、図2-kは前立腺、図2-lは卵巣、そして図2-mは膵臓組織の染色結果である。

図2-n~qは、ヒトの各種正常組織の中で洞構造を持つ主な臓器の染色図である。図2-nでは肝臓の類洞内皮細胞に認められるLYVE-1発現を認め、図2-oはその強拡大像である。図2-pでは脾臓の脾洞の内皮細胞に、また、図2-qではリンパ節内のリンパ管の内皮細胞及び網状線維に認められるLYVE-1発現を示したものである。

図2-r~xは、ヒト悪性腫瘍の病変部組織の染色図である。そのうち、図2-r~tは、食道癌の組織に関するものであり、図2-rにおいては食道癌（扁平上皮癌）の腫瘍細胞塊がLYVE-1陽性管腔内に認められ、リンパ管侵襲が示されている。また、図2-sはその部分の強拡大像である。図2-tは図2-rの連続切片を用いたvWf抗体の染色図である。

図2-u及びvは、肺癌の組織に関するものである。図2-uにおいては、肺気管支周囲結合織内のLYVE-1陽性管腔内に肺癌（腺癌）の腫瘍細胞塊を示したものである。図2-vは図2-uの連続切片を用いたvWf抗体の染色図である。

図2-w及びxは、ヒトの心臓に発生した血管肉腫の組織染色図で、図2-wではLYVE-1陽性管腔内に血管肉腫の腫瘍塊を認め、その連続切片を用いてvWf染色を行った図2-xでは、vWf一部陽性の腫瘍細胞がvWf陽性管腔内にも認められる。

図2-r~xにおいて、LYVE-1陽性内皮細胞をもつリンパ管内への腫瘍細胞浸潤を確認することができる。

各図における拡大率はそれぞれ次の通りである。a；550倍、g及びs；350倍、o；300倍、j、u及びv；250倍、w及びx；225倍、k及びp；185倍、b~d、f、l、m及びq；130倍、h、i、n、r及びt；110倍、e；50倍。

図3-Aは、心臓筋層内の結合組織内、心外膜脂肪織内に認められるLYVE-1陽性管腔を示したものである。

図3-Bは、肺胸膜下、血管周囲などに認められるLYVE-1陽性管腔を示したものである。

図3-Cは、腎ボウマン囊周囲、尿細管周囲の間質に認められるLYVE-1陽性管腔を示したものである。

図3-Dは、膵臓の血管周囲を主とする間質に認められるLYVE-1陽性管腔を示したものである。

図3-Eは、扁桃の上皮下のリンパ小節内に認められるLYVE-1陽性管腔を示したものである。

図3-Fは、胸腺の小葉間結合組織内に認められるLYVE-1陽性管腔を示したものである。

図3-Gは、胃の粘膜固有層から漿膜まで全層に認められるLYVE-1陽性管腔を示したものである。特に粘膜筋板沿い、筋層に多く見られる。

図3-Hは、小腸の粘膜固有層の粘膜上皮近傍から漿膜の間質に至る組織の染色図である。

図3-Iは、舌の上皮下の結合織内に認められるLYVE-1陽性管腔を示したものである。

図3-Jは、食道の上皮下の結合織内に認められるLYVE-1陽性管腔を示したものである。

図3-Kは、結腸の粘膜下層から漿膜までの間質に認められるLYVE-1陽性管腔を示したものである。

図3-Lは、膀胱の粘膜下層から漿膜までの間質に認められるLYVE-1陽性管腔を示したものである。

図3-Mは、前立腺の腺腔間の血管近傍、被膜に認められるLYVE-1陽性管腔を示したものである。

10

20

30

40

50

図3-Nは、精巣の曲精細管周囲の間質に認められるLYVE-1陽性管腔を示したものである。

図3-Oは、卵巣の皮質間質内に認められるLYVE-1陽性管腔を示したものである。

図3-Pは、胎盤絨毛の間質に認められるLYVE-1陽性発現細胞を示したものである。

図3-Qは、肝類洞血管の内皮細胞に認められるLYVE-1発現を示したものである。

図3-Rは、脾洞の内皮細胞に認められるLYVE-1発現を示したものである。

図3-Sは、輸出入リンパ管内皮細胞および細網細胞に認められるLYVE-1発現を示したものである。 10

図3-Tは、副腎の洞様血管内皮細胞に認められるLYVE-1発現を示したものである。

図3-Uは、食道癌におけるリンパ管侵襲の染色像である。食道の粘膜下層のLYVE-1陽性管腔内に腫瘍塊が認められる。

図3-Vは、胃癌におけるリンパ管侵襲の染色像である。組織のLYVE-1陽性管腔内に腫瘍塊が認められる。

図3-Wは、EMR切除を行った胃癌組織におけるリンパ管侵襲を示した図である。粘膜固有層のLYVE-1陽性管腔内に腫瘍塊が認められる。

図3-Xは、図3-Wの拡大図です。 20

図3-Yは、心臓の血管肉腫におけるリンパ管侵襲を示した図である。LYVE-1陽性管腔内に腫瘍塊が認められる。

図3-Zは、リンパ管腫の不規則に増生する管腔の内皮細胞に部分的に認められるLYVE-1発現を示したものである。

図4は、抗体の特異性を確認したウェスタンブロット図である。

レーン1及び3はLYVE-1遺伝子を組み込んだCos-7細胞より得られた試料と反応させた図であり、レーン2及び4はLYVE-1遺伝子を組み込んでいないCos-7細胞より得られた試料と反応させた図である。更に、レーン3及び4は、予め過剰量の本発明のペプチドフラグメントを反応させておいたLYVE-1抗体を用いて反応させたものである。 30

レーン1で発色が認められレーン3で発色が認められないことから、本発明の抗体はLYVE-1タンパク質に特異的であることがわかる。

【実施例】

実施例1 (抗原の調整)

配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する抗原ペプチドフラグメントは、Genosys社製Abcus7自動ペプチド合成装置を用いて固相法により合成した。その際、N末端にリンカーとなるシステインを付加し、リンカーを付加した抗原ペプチドフラグメント30mgを得た。合成後、抗原ペプチドフラグメントを高速液体クロマトグラフィーにて精製した。

得られた抗原ペプチドフラグメントの確認は次のようにして行った。すなわち、抗原ペプチドフラグメントをベンジル化し、0.1%トリフルオロ酢酸を加えた後、ABI社製Voyager System 1162質量分析器にて測定した。測定にあたっては、標準コントロールサンプルを測定し、その理論分子量の差異を補正した後に、合成したペプチドフラグメントを測定し、理論値と一致することを確認した(図1)。 40

合成した抗原ペプチドフラグメントの抗原性を高めるために、抗原ペプチドフラグメントにリンカー及びスペーサーを介してヘモシアニン(KLH)を結合させた。まず、スペーサーとKLHの結合は次のようにして行った。KLH16mgを10mMリン酸ナトリウムバッファー(pH7.2)1mlに溶解し、これにMBS2.8mgのジメチルホルムアミド1ml溶液を加える。室温中で30分攪拌後、溶液を16,000rpmで遠心し、その上清をセファデックスG25によるカラムクロマトグラフィーにて精製し、KLH 50

-MBS結合物質を得た(含有量は1.8mg/ml)。次に、1mgの上記抗原ペプチドフラグメントとKLH-MBS結合物質(KLH1mg相当)および1/2体積の0.2Mリン酸ナトリウムバッファーを混合し、窒素ガス存在下で室温にて3時間反応することにより、抗原を得た。

実施例2 (LYVE-1抗体の調製)

抗原(抗原ペプチド100μg相当)を、フロイントの完全アジュバントと共にウサギ背部皮下に免疫した。

以後、2週間に一度の割合で、抗原ペプチド100μgに相当する量の抗原をフロイント不完全アジュバントと共に同様に免疫し、合計5回免疫した。第2回目の免疫以降、抗原及びセルロースアセテート膜を使用したドットプロット法にて抗体価上昇の確認を行った。抗体価の上昇を確認した後、全採血を行い、抗血清を分離した。

10

次に、抗体の精製を以下のようにして行った。まず、Affige10(BIO-RAD社)に抗原ペプチドを結合させて、精製用アフィニティーカラムを作製した。そして、非動化血清10mlを同量のPBS(リン酸緩衝食塩水)で希釈し、0.45μmのフィルターに通した後、アフィニティーカラムに添加した。カラムを約50mlのPBSにて洗浄した後、5mlの50mMクエン酸バッファーで抗体を溶出した。溶出した抗体に2Mトリスバッファー(pH9.5)を少量加え、溶出抗体溶液のpHを7.4に補正した。280nmの波長の吸光度を測定することにより、抗体濃度を計測した。

実施例3 (LYVE-1抗体の特異性の検討)

LYVE-1のタンパク質翻訳域の全長遺伝子を、真核細胞発現プラスミドベクターに組み込み、リポソーム試薬を使用して、このプラスミドベクターをCos-7細胞に導入し、一過性にLYVE-1タンパク質を発現させた。導入24時間後にCos-7細胞をPBSで洗い、Lysisバッファー(20mMトリス塩酸バッファー、140mM食塩水、0.1% Nonidet P-40、1μg/ml 蛋白分解阻害剤(ペプスタチン、リユーペプチン及びアプロチニン)の混合液)により溶解した。この混合液を15,000rpmにて遠心した後、その上清をPAGE(ポリアクリルアミドゲル電気泳動)にて分画した後、ナイロンフィルターに転写し、フィルター試料とした。このフィルター試料の一部をLYVE-1抗体と反応させた。

20

一方、抗体を抗原ペプチドと4℃にて一晚反応させ、抗体吸収試液とし、同様にフィルター試料の一部を抗体吸収試液と反応させた。その後、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG山羊血清と反応させた後、化学発光検出試薬(ECL Western blottingキット)を反応させた。検出は、フルオロイメーリアナライザーLAS-1000(富士フィルム)を用いて行った。その結果、LYVE-1抗体と反応させたフィルター試料にはLYVE-1とLYVE-1抗体とが反応した特異的なバンドが確認されたが、抗体吸収試液と反応させたフィルター試料ではそのバンドは確認されなかった。このことより、本抗体がLYVE-1特異的な抗体であることが証明された。

30

実施例4 (LYVE-1抗体を用いた組織染色)

下記表1に示すヒトの各種正常及び病学的組織のパラフィン固定切片を使用し、LYVE-1の局在について検索した。

表1 ; LYVE-1により染色したヒト組織

40

正常組織	悪性腫瘍
舌、食道、胃、小腸、結腸、心臓、肺、腎臓、膀胱、前立腺、精巣、卵巣、胎盤、脾臓、肝臓、脾臓、副腎、扁桃腺、胸腺、リンパ節	食道癌、胃癌、肺癌、血管肉腫(心臓)、リンパ管(リンパ管腫)

各切片を脱パラフィン後にガラススライド上に置き、ガラススライド上の組織とLYV

50

E-1抗体を室温にて30分反応させた。これをPBSで洗浄した後、ビオチン標識抗ウサギIgG山羊血清と室温にて30分反応させた。

反応物をPBSで洗浄し、さらにストレプトアビジンペルオキシダーゼ結合試薬と室温にて30分反応させた。PBS洗浄後3,3'-ジアミノベンジジン塩酸を基質として発色を行った。各組織の染色像を図2に示す。

また、同一組織におけるリンパ管内皮細胞の染色と血管内皮細胞の染色を比較するため、von Willebrand factor (vWF)による血管内皮細胞の染色も同様にして行った。

その結果、ヒトの各種正常及び病理学的組織において、LYVE-1抗体によりリンパ管内皮細胞は染色されたが、血管内皮細胞は染色されなかった。また、vWFにより血管内皮細胞は染色されたが、リンパ管内皮細胞は染色されなかった。各組織の染色像を図3に示す。

10

上記実験の結果から、LYVE-1抗体はリンパ管内皮細胞を特異的に認識する抗体であること、及びLYVE-1抗体はリンパ管内の癌細胞浸潤部の特定に有用であることが証明された。

本発明により、LYVE-1のペプチドフラグメント及びそのペプチドに対する抗体が提供される。本発明の抗体を利用して、生体組織中のリンパ管のみを選択的に染色することができる。特に、本発明の抗体は、生体組織における腫瘍によるリンパ管の破壊性浸潤性増殖についての病理学的所見を得るための使用において有用であり、ひいては、本発明の抗体を利用して腫瘍の悪性度を診断するための指標を得ることができ、癌患者の治療及び予後に役立つものとなる。

20

さらに、本発明の抗体は、ヒトリンパ球の分離、精製を利用したリンパ管の新生治療に用いることができる。すなわち、本発明の抗体を用いて、例えば細胞分離機器（セルソーター）、磁気細胞分離法等によりリンパ管細胞及びその前駆体細胞を分取し、これを、例えば、リンパ管浮腫の軽減を目的としたリンパ管新生治療等に用いることができる。（Lymphangiogenesis in tumors: What do we know?, Microscopy Research and Technique Volume 60, Issue 2, 171-180, February 2003; 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)

30

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Teikoku Hormone Manufacturing Co., Ltd

<120> A peptide fragment of LYVE-1 and an antibody therefor 10

<130> KP-10557

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1 20

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1 30

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

1 5 10

<210> 2 40

<211> 36

<212> DNA

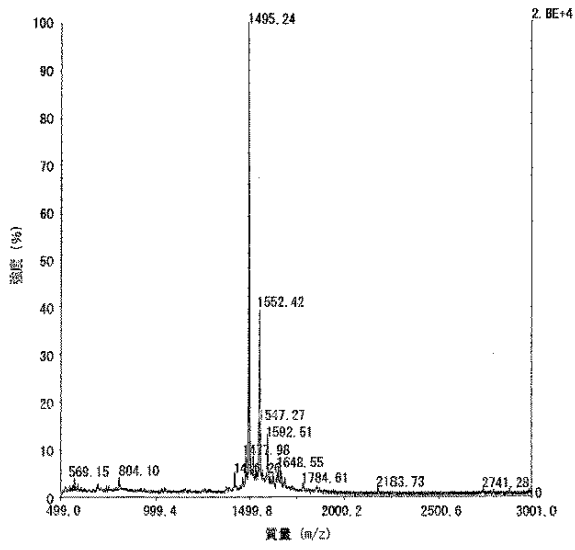
<213> Homo sapiens

<400> 2

tcaaagaaaa ctgataaaaa cccagaagag tccaag

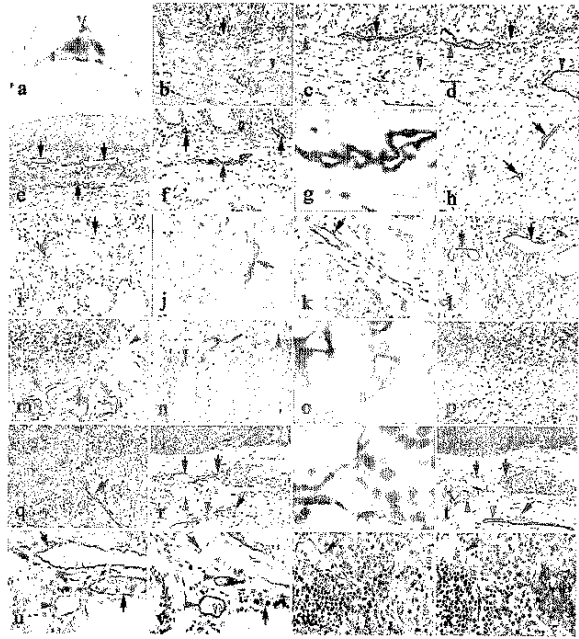
【図 1】

図 1



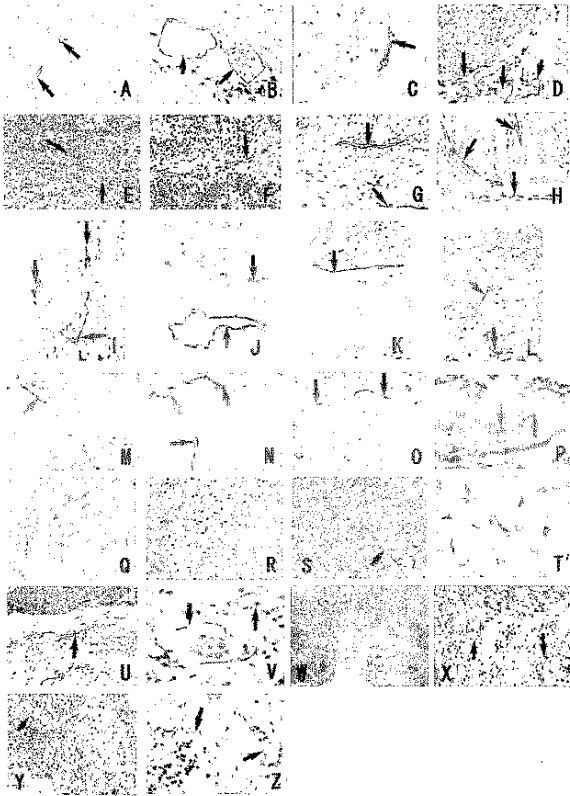
【図 2】

図 2



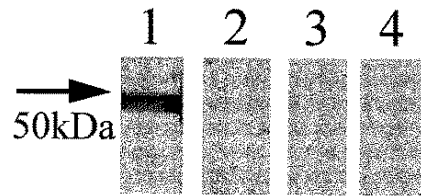
【図 3】

図 3



【図 4】

図 4



【手続補正書】

【提出日】平成18年5月16日(2006.5.16)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドフラグメント又はそのC末端若しくはN末端にリンカーとして一つのアミノ酸が付加されたペプチドフラグメント。

【請求項2】

請求の範囲第1項に記載のペプチドフラグメントに対する抗体。

【請求項3】

ヒトリンパ管特異的ヒアルロナン受容体-1(LYVE-1)に特異的である、請求の範囲第2項に記載の抗体。

【請求項4】

配列番号1に記載のアミノ酸配列において、そのC末端若しくはN末端以外に1若しくは数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、かつ請求の範囲第2項又は第3項に記載の抗体によって認識されるペプチドフラグメント又はそのC末端若しくはN末端にリンカーとして一つのアミノ酸が付加されたペプチドフラグメント。

【請求項5】

請求の範囲第2項又は第3項に記載の抗体を調製するための、請求の範囲第1項又は第4項に記載のペプチドフラグメントの使用。

【請求項6】

請求の範囲第2項又は第3項に記載の抗体を含むことを特徴とする、ヒトリンパ管免疫染色用組成物。

【請求項7】

請求の範囲第2項又は第3項に記載の抗体を含むことを特徴とする、ヒトリンパ管免疫染色用試薬キット。

【請求項8】

採取したヒト組織におけるリンパ管を、請求の範囲第2項又は第3項に記載の抗体を用いて特異的に免疫染色する方法。

【請求項9】

悪性腫瘍の悪性度の検査方法であって、次のステップ；

a) 採取したヒト組織におけるリンパ管を、請求の範囲第2項又は第3項に記載の抗体を用いて特異的に免疫染色するステップ、

b) ステップa)で染色した染色像における悪性腫瘍の浸潤度を測定するステップ、

c) ステップc)に基づいて悪性腫瘍の悪性度を検査するステップ、
からなる方法。

【請求項10】

請求の範囲第2項又は第3項に記載の抗体を用いて、ヒトリンパ球を分離及び/又は精製する方法。

【請求項11】

請求の範囲第2項又は第3項に記載の抗体を含むことを特徴とする、ヒトリンパ管新生治療用組成物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JF2004/003231
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁷ C07K7/08, C07K14/705, C07K16/28, G01N33/53		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. ⁷ C07K7/08, C07K14/705, C07K16/28, G01N33/53		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN), SwissProt/PIR/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JACKSON D.G., The lymphatics revisited: new perspectives from the hyaluronan receptor LYVE-1, Trends Cardiovasc Med., 2003 January; 13(1):1-7.	1-10
Y	STRAUME O. et al., Independent prognostic impact of lymphatic vessel density and presence of low-grade lymphangiogenesis in cutaneous melanoma., Clin.Cancer.Res., 2003 January; 9(1):250-6.	1-10
Y	CURSIEFEN C. et al., Lymphatic vessels in vascularized human corneas: Immunohistochemical investigation using LYVE-1 and podoplanin., Investigative Ophthalmology & Visual Science., 2002, Vol.43, No.7, p.2127-35	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 April, 2004 (22.04.04)		Date of mailing of the international search report 18 May, 2004 (18.05.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003231

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	AKISHIMA Y. et al., Immunohistochemical detection of human small lymphatic vessels under normal and pathological conditions using the LYVE-1 antibody., Virchows Arch., 2004 February; 444(2):153-7	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003231

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item I, b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- a sequence listing
- table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- in written format
- in computer readable form
- c. time of filing/furnishing
- contained in the international application as filed
- filed together with the international application in computer readable form
- furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003231

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 11

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

It is recognized that the invention as set forth in the above claim relates to a method of using an antibody in therapy of regenerating human lymphatic duct and, therefore, pertains to methods for treatment of the human body by therapy. Therefore, it relates to (continued to extra sheet)

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003231

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet (2)

a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2004/003231	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C07K7/08, C07K14/705, C07K16/28, G01N33/53			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C07K7/08, C07K14/705, C07K16/28, G01N33/53			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN) SwissProt/PIR/GeneSeq			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
Y	JACKSON D.G., The lymphatics revisited: new perspectives from the hyaluronan receptor LYVE-1. Trends Cardiovasc Med. 2003 Jan;13(1):1-7.	1-10	
Y	STRAUME O. et al., Independent prognostic impact of lymphatic vessel density and presence of low-grade lymphangiogenesis in cutaneous melanoma., Clin Cancer Res. 2003 Jan;9(1):250-6.	1-10	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 22. 04. 2004		国際調査報告の発送日 18. 5. 2004	
国際調査機関の名称及びあて先 日本特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 佐久 敬 4B 3037 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/003231

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	CURSIEFEN C. et al., Lymphatic vessels in vascularized human corneas: Immunohistochemical investigation using LYVE-1 and podoplanin., Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2002, Vol. 43, No. 7, p. 2127-35	I-10
PX	AKISHIMA Y. et al., Immunohistochemical detection of human small lymphatic vessels under normal and pathological conditions using the LYVE-1 antibody., Virchows Arch. 2004 Feb;444(2):153-7	I-10

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/003231

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT I 7条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 11 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、当該請求の範囲に記載された発明は、抗体をヒトリンパ管の新生治療に用いる方法に係る発明と認められ、これはヒトの身体の治療による処置方法に他ならず、PCT I 7条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2004年1月)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/003231

第 I 欄 スクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。
- a. タイプ 配列表
 配列表に関連するテーブル
- b. フォーマット 書面
 コンピュータ読み取り可能な形式
- c. 提出時期 出願時の国際出願に含まれる
 この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された
 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された
2. さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見：

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P	7/00	
G 0 1 N	33/48	(2006.01)	G 0 1 N	33/48	P
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	Y

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

Fターム(参考) 2G045 AA24 BA14 BB24 CB01 FA16 FB03
 4B024 AA01 AA11 BA63 CA02 DA02 EA04 GA13
 4C085 AA14 BB11 CC12 CC21 CC23 DD33 DD86
 4H045 AA10 AA30 BA16 CA40 DA50 DA86 EA20 EA50 FA34 FA74

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	LYVE-1の肽片段及其抗体		
公开(公告)号	JPWO2004081035A1	公开(公告)日	2006-08-24
申请号	JP2005503584	申请日	2004-03-11
申请(专利权)人(译)	ASKA药业有限公司		
[标]发明人	伊藤金次 石井壽晴 秋嶋由里		
发明人	伊藤 金次 石井 壽晴 秋嶋 由里		
IPC分类号	C07K14/705 C07K16/28 C07K1/22 C12N15/09 A61K39/395 A61P7/00 G01N33/48 G01N33/53 C07K14/47 C07K16/18		
CPC分类号	A61P7/00 C07K14/47 C07K16/18		
FI分类号	C07K14/705.ZNA C07K16/28 C07K1/22 C12N15/00.A A61K39/395.N A61P7/00 G01N33/48.P G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/BA14 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/FA16 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA02 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC12 4C085/CC21 4C085/CC23 4C085/DD33 4C085/DD86 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA16 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA34 4H045/FA74		
代理人(译)	津国 肇 筱田文雄		
优先权	2003070568 2003-03-14 JP		
其他公开文献	JP3899362B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供LYVE-1の特異性肽片段，其可以是淋巴管特異性抗体和识别该肽片段的抗体的表位。氨基酸序列：由Ser Lys Lys Thr Asp Lys Asn Pro Glu Glu Ser Lys组成的肽片段，或其中一个氨基酸作为接头添加至其C端或N端的肽片段。

LYVE-1の抗体により染色したヒト組織

表1；LYVE-1により染色したヒト組織

正常組織	悪性腫瘍
舌、食道、胃、小腸、結腸、心臓、肺、腎臓、膀胱、前立腺、精巣、卵巣、胎盤、脾臓、肝臓、膵臓、副腎、扁桃腺、胸腺、リンパ節	食道癌、胃癌、肺癌、血管肉腫(心臓)、リンパ管(リンパ管腫)

各切片を脱パラフィン後にガラススライド上に置き、ガラススライド上の組織とし