

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-102415

(P2009-102415A)

(43) 公開日 平成21年5月14日(2009.5.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 B 0 2 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Q	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	

審査請求 有 請求項の数 3 O L (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-23515 (P2009-23515)	(71) 出願人	505010168
(22) 出願日	平成21年2月4日 (2009.2.4)		ヘルシンキ ユニバシティ ライセンシン
(62) 分割の表示	特願2005-1867 (P2005-1867)		グ リミテッド オケサ ユキチュア
	の分割		フィンランド共和国、00710 ヘルシ
原出願日	平成7年6月9日 (1995.6.9)		ンキ、コエチランチエ 3
(31) 優先権主張番号	257, 754	(71) 出願人	300046083
(32) 優先日	平成6年6月9日 (1994.6.9)		オリオン コーポレーション
(33) 優先権主張国	米国 (US)		フィンランド共和国、02200 エスポ
			ー、オリオニンチエ 1
		(74) 代理人	100065226
			弁理士 朝日奈 宗太
		(72) 発明者	アリタロ、カリ
			フィンランド共和国、フィン-02100
			エスポー、ニューリキンチエ 4 ア

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 受容体チロシンキナーゼである F L T 4 ならびに診断および治療におけるその使用

(57) 【要約】

【課題】リンパ組織、とくにたとえばリンパ管腫、転移性リンパ節ならびに炎症性疾患、感染性疾患および免疫性疾患などの疾患状態のリンパ管および高内皮性小静脈における変化を検出するための診断道具を提供すること。

【解決手段】モノクローナル抗 F L T 4 抗体は、リンパ管および高内皮性小静脈の内皮細胞に対する特異的マーカーとして、リンパ組織、とくにたとえばリンパ管腫、転移性リンパ節ならびに炎症性疾患、感染性疾患および免疫性疾患などの疾患状態のリンパ管および高内皮性小静脈における変化を検出するための診断道具として有用である。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物中の F L T 4 の機能の刺激または拮抗用薬剤であって、受容体チロシンキナーゼ F L T 4 を刺激するまたはブロックするのに十分な量の抗 F L T 4 モノクローナル抗体を含有する薬剤。

【請求項 2】

該受容体 F L T 4 の活性が、転移性癌、リンパ腫、リンパ管腫、炎症性疾患（慢性または急性）、感染性疾患および免疫性疾患からなる群より選ばれる疾患に関連している請求項 1 記載の薬剤。

【請求項 3】

受容体チロシンキナーゼ F L T 4 に対するモノクローナル抗体を含有する、転移性癌、リンパ腫、リンパ管腫、炎症性疾患（慢性または急性）、感染性疾患および免疫性疾患からなる群より選ばれる疾患の治療剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は概して、受容体チロシンキナーゼ、核酸プローブおよび前記受容体の特異的に認識する抗体、ならびに動物およびヒト組織中のリンパ管と高内皮性小静脈（high endothelial venules）（HEV）を、そして培養物中（in culture）のリンパ内皮細胞（lymphatic endothelial cells）を同定するための前記プローブおよび抗体の使用に関する。さらに詳しくは、本発明は受容体チロシンキナーゼである F L T 4 に特異的な抗体、リンパ管における F L T 4 の発現を同定する方法ならびに究極的には、たとえば炎症性疾患、感染性疾患および免疫性疾患、転移性リンパ節ならびにリンパ管腫などのリンパ組織における変化を含む動物およびヒトにおける疾患の状態の診断ならびに治療に関する。

【背景技術】

【0002】

いくつかの疾患と同様、胚の脈管形成および血管形成（embryonic vasculogenesis and angiogenesis）、血液凝固ならびに創傷の治癒および再生などの脈管系の生理機能は、血管に並ぶ脈管内皮（vascular endothelium）に関係している。脈管枝（vascular tree）の発達は血管形成を経ておこり、いくつかの理論によると、リンパ系の形成は、静脈からの発芽（sprouting）により動脈および静脈の発達（development）後すぐに開始する^(1、2)。

【0003】

胎児期（fetal period）ののち、新生血管形成に関連した脈管形成の期間を除いて、内皮細胞は非常にゆっくりと増殖する。脈管形成を刺激する成長因子は、特異的な内皮細胞表面受容体であるチロシンキナーゼを介してそれらの効果を及ぼす。

【0004】

ヒト赤白血病細胞系からクローニングした受容体チロシンキナーゼである F L T 4 の c D N A のタンパク質産物は、N を介してグリコシル化（N - glycosylated）され、その細胞外ドメインには 7 つの免疫グロブリン様ループを含んでいる。F L T 4 の細胞質チロシンキナーゼドメインは、F L T 1 および K D R の対応するドメインとアミノ酸レベルで約 80 % 同一であり、血小板由来成長因子に対する受容体、コロニー刺激因子 - 1 に対する受容体、幹細胞因子に対する受容体および受容体 F L T 3 と約 60 % 同一である⁽³⁾。

【0005】

F L T 4 の生物学的機能は現在までのところ知られていないが、その制限された発現のパターンは前記機能が脈管内皮に関係しているかもしれないということを示した。本発明者らが以前にえた結果から、ジャーナル・オブ・エクスperimental・メディシン（J. Exp. Med.）、178 巻、2077 ~ 2088 頁（1993 年）にカイバイネン（Kaipainen）らが開示したように、いくつかの胎児の器官の発達中の管（vessels）の内皮細胞における F L T 4 の m R N A の発現が明らかになった。受容体 F L T 4、F L T 1 および K D

R / F L K - 1 の m R N A シグナルは、重複 (overlapping) を示したが、研究した組織においては異なる発現パターンを示した⁽⁴⁾。これらのデータは、この遺伝子ファミリーによってコードされる受容体チロシンキナーゼは血管の成長の調節および / または分化において異なる機能を有するかもしれないことを示唆している。

【 0 0 0 6 】

リンパ系の主要な機能は、組織から流体が戻るようにし、多くの脈管外物質 (extravascular substances) を血液へ戻すことである。さらに、成熟過程のあいだ、リンパ球は血液を離れ、リンパ系器官および他の組織を通り移動してリンパ管に入り、胸管を通り血液に戻る。専門化した小静脈である高内皮性小静脈 (H E V) は再びリンパ球に結合し、組織への管外遊出を引き起こす。したがって、リンパ管、とくにリンパ節は免疫学における重要な役割を果たしており、異なる腫瘍の転移が発達する部位でもある。

10

【 0 0 0 7 】

20 世紀以来、リンパ系の胚起源 (embryonic origin) に関する 3 つの異なる理論が提起されている。しかしながら、リンパ管に対して利用できる特異的マーカーは存在しなかったため、本発明より前は、リンパ管を同定することは困難であった。

【 0 0 0 8 】

リンパ管は、リンパ管造影法を用いてもっとも一般的に研究される。リンパ管造影法において、エックス線造影剤はリンパ管に直接注射される。前記造影剤はリンパ系の輸出ドレナージ管 (efferent drainage vessels) に沿って分配される。前記造影剤はリンパ節に集められ、半年間はそこにとどまり、そのあいだにエックス線解析によりリンパ節の大きさと構造を追跡することができる。この診断は、リンパ節に転移を有する癌患者およびたとえばリンパ腫などのリンパの悪性疾患においてとくに重要である。

20

【 発明の概要 】

【 0 0 0 9 】

本発明は、F L T 4 ペプチドおよびその他の構築物、ならびにリンパ内皮細胞に対する特異的マーカーとしての F L T 4 の用途に関する。

【 0 0 1 0 】

また本発明は、核酸プローブおよび F L T 4 を特異的に認識する抗体、とくにモノクローナル抗体ならびに前記抗体を含む組成物に関する。さらに本出願では、組織、とくにリンパ組織およびリンパ内皮細胞における受容体 F L T 4 を検出し、その量を測定する診断目的への前記モノクローナル抗体の使用が開示される。

30

【 0 0 1 1 】

好ましい態様において、本発明は受容体 F L T 4 を特異的に認識するモノクローナル抗体を提供する。より明確には、本発明は 9 D 9 F 9 と名付けられたモノクローナル抗体を提供する。モノクローナル抗体 9 D 9 F 9 を産生するハイブリドーマ細胞系は、ブダペスト条約の規定によりドイチェ・サムルング・フォン・ミクロオルガニズメン・ウント・ツエルクルツレン・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) (D S M) に寄託されている (D S M 受託番号 A C C 2 2 1 0)。

【 0 0 1 2 】

40

また検出しうるマーカーで標識したモノクローナル抗体も提供する。本明細書で使用するとき、「検出しうるマーカー」という用語は当業者に知られたあらゆる検出しうるマーカーを包含する。しかしながら、本発明の好ましい態様における検出しうるマーカーは、放射性同位体、蛍光色素、色素、酵素およびビオチンからなる群より選ばれる。本発明の目的に対して、適当な放射性同位体は¹²⁵I および¹³¹I を含むがこれらに限定されるものではない。

【 0 0 1 3 】

本発明のモノクローナル抗体は、細胞サンプル中の受容体 F L T 4 の存在を検出する方法に使用しうる。前記方法は、細胞サンプルを本発明のモノクローナル抗体にさらす工程および前記モノクローナル抗体の受容体 F L T 4 への結合を検出する工程からなる。

50

【 0 0 1 4 】

したがって、本発明の別の面は、細胞サンプル中の受容体 F L T 4 の存在を決定する方法であって、

- (a) 細胞サンプルを本発明のモノクローナル抗体にさらす工程、および
 - (b) 前記モノクローナル抗体の受容体 F L T 4 への結合を検出する工程
- からなる方法に関する。

【 0 0 1 5 】

細胞混合物を本発明のモノクローナル抗体にさらすことは、蛍光により活性化された細胞の選別 (fluorescence-activated cell sorting) のばあいには、溶液中で行なうことができ、たとえば生検材料などの固形組織標本上でも行なうこともでき、またカラムクロマトグラフィーまたは直接免疫接着 (direct immune adherence) を用いるばあいには、固体担体に固定化されたモノクローナル抗体を用いて行なうことができる。モノクローナル抗体にさらされる細胞混合物は、血液細胞または組織細胞のいかなる溶液であってもよい。好ましくは、細胞混合物はリンパ内皮細胞を含むかまたは含むことが疑われる正常または病的な組織に由来する。細胞混合物を前記モノクローナル抗体にさらしたのち、受容体 F L T 4 を有する細胞は前記モノクローナル抗体と結合し、抗体 - 受容体 F L T 4 複合体を形成するであろう。抗体 - 受容体 F L T 4 複合体の存在、したがって受容体 F L T 4 の存在は、当該技術分野において既知の方法によって検出することができる。これらの方法はたとえば蛍光抗体法、F A C S 分析、E L I S A、I R M A (サンドイッチ型免疫化学分析法)、免疫組織化学的方法、¹²⁵I 標識およびオートラジオグラフィーを用いた R I A などの当該技術分野において標準的な免疫組織化学的方法を含む。

【 0 0 1 6 】

本発明はまた映像化しうる試薬に接合 (conjugated) したモノクローナル抗体も提供する。本明細書で使用するとき、「映像化しうる試薬」という用語は放射性同位体を含むが、これに限定されるものではない。好ましい放射性同位体はテクネチウム 9 9 m である。

【 0 0 1 7 】

特定の態様において、本発明は組織サンプルおよび生物中のリンパ管およびその内皮細胞をモニターする方法に関する。さらに本発明はリンパ組織、とくにリンパ管の状態 (炎症、感染、外傷 (traumas)、成長、新形成など) を描く臨床的検出方法および生物中のリンパ管、したがってリンパ系血管新生 (lymphatic vascularization) を検出する方法を提供する。

【 0 0 1 8 】

さらに具体的には、本発明は、転移性癌、炎症状態、感染状態および免疫状態に関係した F L T 4 の発現によって特徴付けられるリンパ系の変化 (lymphatic changes) を検出し、同定する方法を提供する。前記方法は、

- (a) リンパ系の変化が疑われる組織および / または体液サンプルをうる工程、
 - (b) 前記サンプルを、F L T 4 に特異的なモノクローナル抗体とその抗原の複合体を形成するのに適した条件下で、F L T 4 に特異的なモノクローナル抗体と接触させる工程、および
 - (c) 形成されたあらゆる複合体の存在を検出する工程
- からなる。

【 0 0 1 9 】

前記方法により検出されうる組織は、F L T 4 を含むリンパ系細胞 (lymphatic cells) または受容体 F L T 4 を発現している細胞を有するあらゆる正常な、前癌性のまたは癌性の固形腫瘍組織である。本発明の 1 つの態様において、モノクローナル抗体は本明細書に記載されたような検出しうるマーカーで標識される。本発明の方法は様々な形態の癌、とくにリンパ節における転移およびリンパ管腫に加えて、たとえばリンパ腫などのその他のリンパの悪性疾患の検出および識別に有用である。

【 0 0 2 0 】

ヒト患者におけるリンパ管、高内皮性小静脈またはリンパ節の存在を映像化する方法も

10

20

30

40

50

本発明によって提供される。前記方法は標識した抗体を投与し、リンパ管またはリンパ節においてF L T 4を発現している細胞が存在する部位を映像化することにより検出することからなる。

【0021】

本発明はさらにリンパ血管新生ならびに炎症状態、感染状態および免疫状態におけるF T L 4の機能を刺激するまたは拮抗する方法に関する。前記方法は、このような反応に關与するF L T 4内皮細胞部位、とくにF L T 4の機能が、たとえば転移性癌、リンパ腫、炎症性疾患（慢性または急性）、感染性疾患および免疫性疾患などの疾患に関連している部位をブロックするのに十分な量のF L T 4に結合する化合物を投与することによりF L T 4が介在するリンパ血管新生を阻害することからなる。

10

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】図1はマウス組織におけるF L T 4のm R N Aの発現を表わし、Aは成体のマウスの表示した組織から単離したポリアデニル化R N A (polyadenylated R N A)のハイブリダイゼーションを表わす。F L T 4のm R N Aのバンドの大きさはk bで示す。Bは様々な存胎齢(E 8 ~ E 1 8)のマウス胚および新生マウス(1日)から単離したR N AのR Nアーゼプロテクション分析(R N A se protection analysis)を表わしている。サンプルE 8 + Pは胎盤も含んでいる。プローブおよび保護されたF L T 4断片の大きさはヌクレオチドで示し、 β -アクチンを対照として使用した。

20

【図2】図2は交尾後7.5日、8.5日および11.5日の胚におけるF L T 4のm R N Aの発現を表わしている。インサイチュ・オートラジオグラムの暗視野(darkfield)および明視野(brightfield)の顕微鏡写真を示す。F L T 4のm R N Aの発現は、7.5日の胚(A)においては検出することができなかった。交尾後8.5日のマウス胚のF L T 4の発現を(B)および(C)に示す。矢印は、後主静脈の内皮(c v)、(B)における尿膜(a l)および(C)の頭部間葉の血管芽細胞(a b)におけるF L T 4陽性細胞を示している。交尾後8.5日の胎盤において、F L T 4転写物は、静脈裂孔(venous lacunae)(v l)の内皮細胞において見ることができた(D)。パネルEおよびFは、交尾後11.5日の胚におけるF L T 4およびT i eのハイブリダイゼーションシグナルの比較を示している。発達中の胸部大動脈および後腎(m n)領域を示す(20 $\times$)。胸部大動脈はF L T 4に対して陰性であるがT i eのm R N Aに対しては陽性であるのに対して、両方のプローブはともに心内膜下静脈(subendocardial vein)(s v)の内皮とハイブリダイズすることに注意すべきである。またF L T 4のプローブは、後腎静脈(v)からシグナルを出す、T i eは後腎毛細管(metanephric capillaries)(c、矢印)と大部分がハイブリダイズする。d aは胸部大動脈を、n gは神経溝を示す。スケールバーは30 μ mである。

30

【図3】図3は交尾後12.5日の胚におけるF L T 4のm R N Aの発現を表わしている。腋窩面(axillar plane)を通る矢状切断図を示す。F L T 4のm R N Aは、腋窩(a x)の拡張された管(dilated vessels)、眼窩周辺(p o)領域の叢様パターン、脊椎傍組織(矢じり)および皮下(s c)組織において顕著であった。bは脳を、l iは肝臓を示す。スケールバーは5 μ mである。

40

【図4】図4は交尾後14日および16.5日の胚におけるF L T 4を表わしている。パネルAおよびBは、正中矢状切断図の明視野および暗視野の映像を示している。p oは眼窩領域を、l jは下顎を、n eは頸領域を、s cは皮下組織を、m tは腸間膜を、a oは大動脈を、d tは胸管を示す。(C)はヘマトキシリン-エオシン染色した16.5日の胚の横断面を示す。t hは胸腺を、t rは気管を、eは食道を、c aは頸動脈を、b aは腕頭の動脈を、d tは胸郭を示す。(D)は胸管領域の高拡大図(40 $\times$)を示し、オートラジオグラフィの粒子が内皮細胞全体に見ることができる。また、前記写真の上の部分における小管(v)は陽性である。スケールバーは10 μ m(A~C)および1 μ m(D)である。

【図5】図5は培養した内皮細胞におけるF L T 4およびT i eのm R N A発現の比較を

50

表わしている。ヒトの包皮の微小管 (MV)、大腿の静脈 (VE)、大動脈 (AO) および臍帯の静脈 (HU) の内皮細胞由来のポリアデニル化 RNA のノーザンブロット分析を示す。比較のために、受容体チロシンキナーゼである Tie の mRNA のハイブリダイゼーションシグナルを示す。プローブのリボソーム RNA への非特異的結合の結果生じたバンドをアスタリスクで印をつけた。

【図 6】図 6 は成人のヒト腸間膜 (A、B)、肺 (C、D) および扁桃 (E、F) のリンパ管における FLT 4 を表わしている。A および C におけるリンパ管のみが FLT 4 シグナルを出し、静脈、毛細管および動脈では FLT 4 の mRNA に対して陰性であることに注意すべきである。扁桃において、シグナルはいくらかの HEV の内皮において見出された。スケールバーは 200 μm である。

10

【図 7】図 7 は正常 (A、B) および転移性 (C、D) リンパ節ならびにリンパ管腫 (E ~ G) における FLT 4 の mRNA を表わしている。矢じりは、FLT 4 陽性であるリンパ洞および HEV に印をつけている。FLT 4 およびフォンビルブランド因子のシグナルの比較では、両方がリンパ内皮において示されるが、毛細管 (c) および静脈 (v) の内皮においてはフォンビルブランド因子のシグナルのみが示された。スケールバーは 10 μm (A ~ D) および 100 μm (E ~ G) である。

【図 8】図 8 はイムノペルオキシダーゼ染色によって検出された胎児の腸間膜管 (mesenteric vessels) における FLT 4 の発現を表している。親和性により精製した抗 FLT 4 抗体 (A)、抗原でブロックした抗血清 (B)、あらかじめ免疫した血清 (C) および第 VIII 因子関連抗原に対して特異的な抗血清 (D) を用いて断片を染色した。染色はいくらかのものに制限されるが、すべての管 (v) には制限されないことに注意すべきである。スケールバーは 0.05 mm である。

20

【発明を実施するための形態】

【0023】

リンパ組織、とくに転移性癌および免疫性疾患状態に関連するリンパ節における変化を同定することの重要性を認識して、本発明者らは FLT 4 がリンパ管内皮を検出する特異的なマーカーであり、したがってヒトの病的状態におけるリンパ系の変化に対するマーカーとして有用であることを示した。

【0024】

本発明者らは以前に、FLT 1 および KDR と比較した FLT 4 の発現パターンは、妊娠 18 週目のヒト胎児の組織において大きく異なることを示した⁽⁴⁾。発達における FLT 4 の役割を理解するために、本発明者らはマウス FLT 4 の部分的な cDNA をクローニングした。これらのプローブをインサイチュ・ハイブリダイゼーションに使用して、マウスの発達における FLT 4 の mRNA の発現を分析し、FLT 4 はリンパ系の脈管形成中に発現することを見出した。FLT 4 はいくらかの高内皮性小静脈 (HEV) と同様に、正常および病的な状態の成人の組織のリンパ内皮細胞において見出されたので、前記の知見の妥当性は正常および病的な成人の組織においても確認された。

30

【0025】

マウス FLT 4 の cDNA 断片のクローニングにより、前記断片から推定されるアミノ酸配列は対応するヒトの配列とほとんど同一であることが示された (研究した両方の区域におけるアミノ酸の同一性は約 96%)。マウス FLT 4 の cDNA の同一性のさらなる証拠はノーザンハイブリダイゼーションによりえられ、そこでは両方の種に由来するプローブが典型的なマウス組織から 5.8 kb の mRNA シグナルを出した。成体マウスの様々な組織から単離した RNA の解析は、肝臓、肺、心臓、脾臓および腎臓における FLT 4 の発現を示し、脳および精巣においてはまったくないかまたはわずかのハイブリダイゼーションを示した。このパターンは先にガランド (Galland) らにより報告されたパターンと類似している⁽⁵⁾。RNA アーゼプロテクション (RNase protection) の結果により、FLT 4 遺伝子は交尾後 8.5 日の胚から始まって、マウスの発達中必要であることが示唆され、相対的な発現レベルはかなり安定しているようであった。

40

【0026】

50

インサイチュ・ハイブリダイゼーションのために、細胞外ドメイン配列をコードするマウス F L T 4 の c D N A 断片を 2 つ選んだ。このことによりハイブリダイゼーションパターンに関連の受容体 F L K - 1 および F L T - 1 のパターンと明確に区別することができる。このことは細胞外領域における F L T 4 との配列同一性が非常に低い程度のものでしかないことを示している^(6、7、8、9)。内皮の受容体チロシンキナーゼである F L K - 1、F L T - 1、T i e および T e k の遺伝子と同様に、F L T 4 の遺伝子は、交尾後 7 . 5 日の胚では発現しなかった。交尾後 8 . 5 日の胚においては、強い F L T 4 シグナルが尿膜、頭部間葉 (head mesenchyme) の血管芽細胞および主静脈に局在した。対照的に、胸部大動脈 (dorsal aorta)、心臓の心内膜および卵黄包の血管芽細胞は、T i e、T e k、F L K - 1 ならびに F L T - 1、T i e および T e k に対してとは異なり、F L T 4 に対して陰性であった^(10、8)。F L T 4 発現の静脈系 (venous system) への限定は、11 . 5 日のマウス胚由来のサンプルにおいてよりいっそう明確になり、ここでは T i e の m R N A は動脈においても発現した。交尾後 12 . 5 日の胚においては、F L T 4 シグナルは発達中の静脈性内皮および推定リンパ内皮を装飾したが、内皮の受容体チロシンキナーゼである T i e に対してとは異なり、動脈内皮は陰性であった。発達の後半段階中、F L T 4 の m R N A は、発達中のリンパ管を表わす血液細胞を欠いた脈管叢 (vascular plexuses) に限定されるようになった。成人の組織において、リンパ内皮およびいくつかの高内皮性小静脈のみが F L T 4 の m R N A を発現した。増加した発現が転移性リンパ節およびリンパ管腫におけるリンパ洞および高内皮性小静脈においておこった。

10

20

30

40

50

【0027】

マウス胚からえたデータの解釈が困難であり、ヒトのリンパ系は非常によく定義されているため、ヒト内皮を研究した。また、様々な内皮から確立した細胞を、F L T 4 の発現の特異性がインビトロ条件において持続するかどうかをみるために、細胞培養中で研究することができた。内皮細胞系はインビトロ培養において分化した特徴 (differentiated features) を失うことが知られている。それゆえ、前記内皮細胞系が F L T 4 に対して陰性であることは予期されないことではなかった。培養した大動脈の内皮細胞もまた F L T 4 の m R N A を欠いていた。しかしながら、微小脈管構造ならびに大腿および臍帯の静脈から成長したヒト内皮細胞からシグナルはえられた。したがって、少なくとも F L T 4 発現の特異性のいくつかは細胞培養中で維持されていた。

【0028】

成人の組織のインサイチュ・ハイブリダイゼーション分析は、発達中のマウス胚においてみられた F L T 4 のリンパ系への限定を確認した。F L T 4 の発現はリンパ内皮およびヒトリンパ節のリンパ洞においてみられた。興味深いことに、立方体様内皮 (cuboidal endothelium) を有し、白血球のリンパ節への取り引き (trafficking) における機能を示すいくつかの H E V もまた F L T 4 陽性であった。さらに、パラレル・ハイブリダイゼーション (parallel hybridization) 分析により、正常なリンパ節と比較して、転移性のこれらの構造においては F L T 4 の m R N A レベルが上ったことが示された。また F L T 4 は、結合組織基質 (connective tissue stroma) および成長している、内皮に並んだリンパチャネル (endothelial-lined lymphatic channels) からなる良性腫瘍であるリンパ管腫において非常に目立った。F L T 4 の m R N A は、前記腫瘍のリンパ内皮に限定され、前記腫瘍の動脈、静脈および毛細管には存在しなかった。ヒトの肺において、本発明者らは、この組織における唯一の F L T 4 に陽性な管であるリンパ構造を同定することができた。

【0029】

前記の結果は、F L T 4 は成人の組織におけるリンパ管およびいくつかの高内皮性小静脈に対する新規なマーカーであることを示唆している。また前記の結果は、リンパ管の静脈起源 (venous origin) についての理論を支持する。成長因子の受容体としての F L T 4 は前記の管の分化および機能に関係しているかもしれない。

【0030】

本発明に係る F L T 4 結合化合物 (F L T 4 - binding compounds) を組合わせた結果

は、とくに可視化することができる放射性的、電子的に密集した (electron-dense) またはその他のリポーター物質につないだ本発明の抗体を使用することによって、リンパ内皮を選択的に標識することができる。受容体 F L T 4 の内在化を誘導するモノクローナル抗体を含む物質をリンパ系に注射し、それによってあらかじめ定義した (predefined) 分子をリンパ内皮に運ぶことが可能であろう。また、前記の本発明に係る F L T 4 結合化合物を高内皮性小静脈、とくに受容体 F L T 4 を高いレベルで発現する活性化 H E V の検出に使用することが可能であろう。本発明者らが知る限り、リンパ内皮に対する特異的なマーカーは現在入手できない。

【 0 0 3 1 】

以下の実施例は本発明を説明するためのみに与えられるものであり、いかなるばあいも本発明の範囲を限定するものではない。

【 実施例 】

【 0 0 3 2 】

実施例 1

マウス F L T 4 の c D N A プローブのクローニング

1 2 9 S V マウス由来のイフィックス (登録商標) ツー ゲノムライブラリー (i F I X (登録商標) II genomic library) (ストラタジーン (Stratagene)) の約 10^6 のブランクを、細胞外ドメインを含む S 2 . 5 ヒト受容体 F L T 4 の c D N A 断片を用いてスクリーニングした⁽³⁾。2 . 5 k b の B a m H I 断片を陽性のブランクからサブクローニングし、両方の末端から配列決定を行なった。前記サブクローニング物から、ポリメラーゼ連鎖反応を使用して増幅し、マウス F L T 4 の c D N A 配列のヌクレオチド 1 7 4 5 ~ 2 0 4 9 を含むエクソン断片を pBluescript K S II + / - ベクター (ストラタジーン) へクローニングした⁽⁹⁾。

【 0 0 3 3 】

ヌクレオチド 1 ~ 1 9 2 を含む第 2 の断片も同様にクローニングした。

【 0 0 3 4 】

実施例 2

マウス組織における F L T 4 の m R N A の分析

コムチュンスキー (Chomczynski) らにしたがい、発達中の胚 (交尾後 8 ~ 1 8 日のマウスおよび 1 日齢のマウス) から全 R N A を単離した⁽¹¹⁾。交尾後 8 日の胚由来のサンプルは胎盤も含んでいた。

【 0 0 3 5 】

R N アーゼプロテクション分析のために、R N A プローブを、アンチセンス配向 (anti sense orientation) のために [32 P] - U T P および T 7 ポリメラーゼを使用して、実施例 1 にしたがってえた直線状 F L T 4 プラスミドから生成した。使用した β - アクチンプロローブは公開されているマウス β - アクチン配列のヌクレオチド 1 1 8 8 ~ 1 2 7 9 に対応する⁽¹²⁾。6 % ポリアクリルアミド / 7 M 尿素ゲル中で精製したのち、標識した転写物を 3 0 μ g の全 R N A と 5 2 で一晩ハイブリダイズさせた。ハイブリダイズしなかった R N A を、R N アーゼ A (1 0 U / m l) および T 1 (1 μ g / m l) を用い 3 7 、p H 7 . 5 で 1 時間かけて消化した。R N アーゼを、プロテイナーゼ K を用いた 3 7 での 1 5 分間の消化により不活性化し、サンプルを 6 % ポリアクリルアミド / 7 M 尿素ゲル中で分析した。

【 0 0 3 6 】

本実験において分析した F L T 4 の発現パターンにより、肺、肝臓、心臓、腎臓、骨格筋および脾臓からは非常に弱い m R N A シグナルがえられたが、精巣および脳には明白に特異的なシグナルはないということが示された (図 1 A) 。R N アーゼプロテクション法による、マウス発生の異なる時期 (phase) に採取した一連の R N A の分析によって、F L T 4 の m R N A は、交尾後 8 日から新生マウスまで終始シグナル強度における大きな変動なしに発現することが示された (図 1 B) 。

【 0 0 3 7 】

10

20

30

40

50

実施例 3

マウス胚における F L T 4 に対するインサイチュ (in situ) ・ハイブリダイゼーション

F L T 4 転写物を細胞および組織に首尾よくもどすために、交尾後 7 . 5 日および 8 . 5 日のマウス胚の切片を、標識した F L T 4 の R N A とハイブリダイズさせた。マウス胚は C B A および N M R I マウスの交配に由来した。妊娠したマウスを頸部の脱臼 (cervical dislocation) により屠殺し、胚をただちに凍結するかまたはリン酸緩衝液を経て 4 % パラホルムアルデヒド中へ移した。胚および単離したマウスの器官を 4 で 1 8 時間かけて固定し、脱水し、パラフィン中に包埋し、ついで 6 μ m 切片に切出した。

【 0 0 3 8 】

1 9 2 ヌクレオチドおよび 3 4 9 ヌクレオチドの R N A プローブ (アンチセンスおよびセンス) (実施例 1 参照) を、[³⁵ S] - U T P を使用して、直線状プラスミドから生成した。切片のインサイチュ・ハイブリダイゼーションを、ウィルキンソン (Wilkinson) らの文献^(13、14)にしたがい、以下に示す改変、1) パラフィンワックス中への包埋前に、トルエンの代わりにキシレンを使用し、2) 6 μ m 切片を切出し、2 % の 3 - トリエトキシシリルプロピルアミンを用いて前処理したガラススライド表面上のジエチルピロ炭酸塩で処理した水の層に置き、3) プローブのアルカリ加水分解を省略し、4) ハイ・ストリンジェンシー・ウオッシュ (high stringency wash) を、3 0 m M D T T および 1 × S S C を含む溶液中、6 5 で 8 0 分間かけて行なうという改変を加えて行なった。切片を N T B - 2 エマルジョン (コダック (Kodak)) でおおい、4 で貯蔵した。スライドを 1 4 日間さらし、現像し (developed) 、ヘマトキシリンを用いて染色した。センス鎖および R N アーゼ A で処理した切片を用いた対照のハイブリダイゼーションはバックグラウンドをこえる特異的なシグナルを出さなかった。

【 0 0 3 9 】

図 2 A および 2 B に示したように、F L T 4 の m R N A は交尾後 7 . 5 日のマウス胚においては発現しなかったが、発生 8 . 5 日の後主静脈 (c v) においては明るいシグナルが検出された。対照的に、発達中の心臓 (データは示さず) および胸部大動脈 (d a) は F L T 4 陰性であった。胚外の組織において、F L T 4 は尿膜 (パネル B における a l) においては顕著に発現したが、発達中の卵黄包の血島は陰性であった (データは示さず)。一方、頭部の間葉の血管芽細胞 (a b) は強い F L T 4 陽性であった (C)。発達中の胎盤において、F L T 4 シグナルは、末梢の洞様毛細血管静脈 (peripheral sinusoidal veins) において最初に見られた (データは示さず)。交尾後 9 . 5 日の胎盤において、静脈の裂孔 (venous lacunae) の内皮 (D における v l) およびレイチャート膜 (Reichert's membrane) に部分的に融合した巨細胞 (データは示さず) は F L T 4 の m R N A を発現した。

【 0 0 4 0 】

したがって、F L T 4 の発現は、もっとも初期の内皮細胞前駆体である血管芽細胞において非常に顕著であるが、交尾後 8 . 5 日のマウス胚の特定の管のみに限定されるように思われる。受容体 T i e は発達中のマウス胚のすべての内皮細胞において発現し、したがって前記細胞に対するマーカーを提供することが知られている。とくに、T i e プローブとは対照的に、F L T 4 プローブは、交尾後 1 1 . 5 日のマウス胚の動脈性内皮、たとえば発達中の胸部大動脈 (図 2 の E、F における d a) または頸動脈 (データは示さず) の内皮細胞とハイブリダイズしたとしても非常に弱かった。その代わりに、F L T 4 シグナルは発達中の静脈において非常に顕著であった。たとえば、F L T 4 シグナルは発達中の後腎を囲む静脈 (E における v、s v) において検出され、T i e プローブは後腎内の毛細管 (c) を顕著に認識した (F)。

【 0 0 4 1 】

図 3 から理解されうるように、F L T 4 の m R N A は交尾後 1 2 . 5 日のマウス胚のいくつかの領域に分布し、とくに腋窩領域 (a x) の拡張された管において顕著である。類似した F L T 4 陽性の管構造が、頸静脈域における正中矢状切断図において見られた (データは示さず)。F L T 4 を発現している管の叢様パターンは、眼窩周辺領域 (p o) お

10

20

30

40

50

よび発生中の椎骨の周囲 (v b) において見られた。また、発達中の皮膚のちょうど下の F L T 4 陽性脈管網 (F L T 4 - positive vascular network) が明らかになった (s c)。より弱い毛細管シグナルが発達中の脳 (b) を含むいくつかの領域からえられた。F L T 4 の m R N A は、尾の領域と同様、頸の領域の小管、発達中の鼻の小管および発達中の舌の基底部分 (base) においても検出することができた (データは示さず)。そのうえ、肝臓 (l i) は斑点様のパターンで F L T 4 の m R N A に対して強い陽性であった。

【 0 0 4 2 】

さらなる発達のあいだ、F L T 4 の R N A は胚の特定の管にさらに限定されるようになったと思われる。交尾後 1 4 . 5 日のマウス胚はこの限定された発現パターンを精密に示している (図 4 A、B)。図 4 の正中矢状切断図において、最も顕著な F L T 4 のシグナルは、前記切断図の前方部分における発達中の脊柱に沿って見られる。前記シグナルは、発達のこの時点において形成された最大のリンパ管である胸管 (d t) の内皮細胞に由来していると思われた。対照的に、胸部大動脈 (d a) および下大静脈 (v c) は陰性であった。また腸間膜領域の拡張された管も F L T 4 に対して強い陽性であった。さらに、交尾後 1 2 . 5 日のマウス胚において、頸 (n e) の領域と同様、眼窩周辺 (p o)、下顎 (l j) における解剖学的な境界線に沿った管の網 (vessel networks) は F L T 4 陽性の内皮を含んでいた。類似した構造は心膜空間 (pericardial space) および皮下 (s c) 組織のいたる所に存在した。とくに、F L T 4 陰性の管とは対照的に、すべての F L T 4 陽性の管は、それらの管腔 (lumen) に血液細胞を欠いていた。前記発現パターンは、発達のこの時点においてリンパ管の内皮に F L T 4 が限定されることを示唆している。本発明者らが F L T 4 発現を見たさらなる部位は、発達中の骨髓 (b m) の洞様毛細血管にあった。

【 0 0 4 3 】

F L T 4 プローブとハイブリダイズした交尾後 1 6 . 5 日の胚の上部胸郭 (upper thorax) の横径切断写真を図 4 のパネル C および D に示す。C に示される切片を、ヘマトキシリン - エオシンを用いて染色し、前記区域における異なる型の管を可視化した。前記区域は頸の動脈 (c a)、腕頭の動脈 (b a)、大静脈 (v c) およびサイズが小さく筋肉および結合組織の周囲には存在しない胸管 (矢印) を含んでいる。胸管領域の拡大図をパネル D に示し、ここでは F L T 4 のオートラジオグラフィの粒子を見ることができる。周辺の小管 (v) と同様、胸管の内皮細胞は F L T 4 プローブとハイブリダイズする。

【 0 0 4 4 】

実施例 4

培養した内皮細胞における F L T 4 の m R N A の分析

実施例 3 に記載したインサイチュ・ハイブリダイゼーションの結果により、F L T 4 は静脈の内皮細胞ならびに後にはリンパ管およびいくつかの静脈の内皮細胞では発現するが、動脈の内皮では発現しないことが示された。前記のような調節がインビトロで維持されるかどうかを見るために、本発明者らはノーザンブロッティングおよびハイブリダイゼーション分析を使用して培養した内皮細胞を研究した。

【 0 0 4 5 】

ヒトの大動脈、大腿静脈、臍帯静脈および包皮微小管由来の内皮細胞を単離し、培養して、ファン・ヒンスバーグ (Van Hinsberg) によりすでに記載されたように特徴づけを行なった^(15、16)。前記内皮細胞を、ポリアデニル化 R N A を単離するために、5 ~ 8 回継代 (分裂比 (split ratio) 1 : 3) したのち、コンフルエントな密度 (confluent density) で使用した。

【 0 0 4 6 】

内皮細胞系 E A . h y 9 2 6、B C E および L E I I は F L T 4 を発現しなかった (データは示さず)。しかしながら、培養したヒトの微小管、静脈および臍帯の静脈の内皮細胞は、F L T 4 に特異的な 5 . 8 k b および 4 . 5 k b の m R N A に関して陽性であり、一方大動脈の内皮細胞は陰性であった (図 5)。対照的に、別の内皮の受容体チロシンキナーゼの遺伝子である T i e は、研究したすべての型の内皮細胞において 4 . 4 k b の m

R N Aとして発現した。

【 0 0 4 7 】

実施例 5

成人組織における F L T 4 の m R N A

実施例 3 においてえられた結果により、F L T 4 の m R N A は、発達中、リンパ管の内皮に大規模に制限されるようになることが示された。ヒトにおけるこの知見の潜在的な重要性のため、本発明者らは、ヒト F L T 4 プローブを使用して成人組織における F L T 4 も研究した。使用したヒト F L T 4 プローブは、c D N A の塩基対 1 ~ 5 9 5 を含む E c o R I - S p h I 断片であった⁽³⁾。フォンビルブランド因子プローブは塩基対 1 ~ 2 3 3 4 を含む E c o R I - H i n d I I I 断片であった⁽¹⁷⁾。

10

【 0 0 4 8 】

本発明者らは、組織病理学的診断に送るための、慣用の操作で固定された材料を使用した。正常な肺組織を類表皮癌におかされた左の肺の下葉の切除によりえた。腸間膜および腸間膜のリンパ節を、結腸の腺癌を有する患者からえた。異常な大きさであったので、唾液腺に隣接した正常なリンパ節を摘出した。2 人の患者由来の扁桃およびその 2 つの垂 (appendixes) は診断上の変化はなかった。2 つのリンパ管筋腫瘍 (lymphangiomyomas) および 3 つの嚢胞性リンパ管腫を研究し類似した結果をえた。

【 0 0 4 9 】

ヒト組織について、ヒト組織は組織病理学的診断のために 1 0 % ホルマリンを用いて固定した慣用サンプルであり、正常なインサイチュでの手順は単にバックグラウンドのみを与えるが、プロテイナーゼ K の代わりにマイクロ波処理は特異的ハイブリダイゼーションを可能にした^(18、19)。

20

【 0 0 5 0 】

腸間膜において、肺および垂のリンパ内皮 (l v) は F L T 4 シグナルを出す、静脈 (v)、動脈 (a) および毛細管 (c) は陰性であった (図 6 A ~ D およびデータは示さず)。F L T 4 が H E V で発現するかどうかを研究するために、扁桃を研究した。実際に扁桃について、F L T 4 に特異的なオートラジオグラフィーの粒子が、いくつかの H E V においては検出された (E 、 F)。

【 0 0 5 1 】

実施例 6

正常および転移性リンパ節ならびにリンパ管腫における F L T 4 の m R N A の分析

ヒト腸間膜リンパ節の一部 (実施例 5 参照) を F L T 4 の発現について分析した。結果を図 7 に示す。

30

【 0 0 5 2 】

F L T 4 はリンパ洞 (l s) ならびに輸入 (afferent) および輸出 (efferent) のリンパ管において発現する (データは示さず)。同じパターンが腺癌の転移を含むリンパ節において見られる (C 、 D)。正常および転移性リンパ節の両方におけるいくつかの H E V も陽性であった。パネル E において、F L T 4 の発現は嚢胞性リンパ管腫において見られる (F におけるヘマトキシリン - エオシンで染色した切片と比較した)。とくに、F L T 4 のリンパ内皮に対する特異性は、すべての血管におけるフォンビルブランド因子に対するインサイチュでのシグナルとの比較により明らかである (F)。

40

【 0 0 5 3 】

実施例 7

胎児の内皮細胞における F L T 4 の局在化

短型 (short form) のカルボキシ末端側の 4 0 のアミノ酸をコードする F L T 4 の c D N A 断片を、6 5 7 b p の E c o R I 断片として、読み取り枠 (frame) 中にグルタチオン - S - トランスフェラーゼをコードする領域を有する p G E X - 1 I T 細菌性発現ベクター (ファルマシア (Pharmacia)) にクローニングした。えられた G S T - F L T 4 融合タンパク質を大腸菌中で産生し、グルタチオン - セファロース 4 B カラムを使用したアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。精製したタンパク質を凍結乾燥し

50

、P B S 中に溶解し、フロイントアジュバントと混合し、ウサギの免疫に使用した。抗血清は4回のブースター免疫ののちのものを使用した。

【0054】

17週齢および20週齢のヒト胎児由来の組織を、プロスタグランジンを用いて誘導した合法の流産よりえた。研究はヘルシンキ大学中央病院の倫理委員会の承認を受けた。存胎齢は胎児の脚の長さより推定した。胎児の組織をティッシュ・テック (Tissue-Tek) (マイルス (Miles)) 中に包埋し、直ちに凍結し、-70 で貯蔵した。

【0055】

抗F L T 4抗血清をG S T - セファロースカラムに交差吸収 (cross-absorbed) させて抗G S T抗体を除去し、ついでG S T - F L T 4アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。厚さ6 μ mのいくつかの組織のクリオスタット切片 (cryostat sections) をアセトンを用いて固定し、メタノール中の0.3% H_2O_2 で30分間処理し内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックした。洗浄後、切片を5%正常ブタ血清とともにインキュベートした。ついで切片をF L T 4に対する抗体とともにインキュベートし、洗浄して、結合した抗体をペルオキシダーゼが結合したブタ抗ウサギI g Gを用いて検出し、続いて基質として0.2%の3,3'-ジアミノベンジジン (アマシャム (Amersham)) を使用してペルオキシダーゼ活性に対する染色を行なった。切片をマイヤーのヘマトキシリン (Meyer's hematoxylin) 中で対比染色した。

【0056】

ヒト胎児の腸間膜の抗F L T 4イムノペルオキシダーゼ染色は、いくつかの管の内皮中のF L T 4タンパク質を示したが (図8A)、抗原でブロックした抗F L T 4抗体 (B) およびあらかじめ免疫した血清 (C) は陰性であった。比較のために、図8Dは、脈管の内皮細胞に特異的な第VIII因子関連抗原に対する抗血清を使用した染色の結果を示す。

【0057】

実施例8

F L T 4に対するモノクローナル抗体の産生

融合I:

4月齢のB a l b / c雄マウスを、フロイント完全アジュバントを用いて乳化した濃縮培地 (150 μ g / マウス) 中の組換えにより産生したF L T 4タンパク質 (実施例7参照) の腹腔内注射により免疫した。3~4週間おきに150 μ gのブースター注射をし、さらに3週間の間隔をおいたのち最終ブースター (P B S 中の10 μ gのF L T 4の腹腔内投与) を行なった。最終ブースター投与から4日後、マウスを屠殺し、マウス脾リンパ様細胞 (lymphoid cells) をS P 2 / 0プラスマ細胞腫細胞とそれぞれ2:1の割合で融合させた。

【0058】

融合細胞を、20%ウシ胎児血清およびH A T補足物 (H A T supplement) (ヒボキサンチン - アミノプテリン - チミジン、ギブコ (GIBCO)、043 - 01060H、50倍希釈) を含むイーエックス - セル320 (EX-Cell 320) 培地 (セララブ (SERALAB)) を添加した96ウェル培養プレート (ヌンク (NUNC)) 中からえた。細胞を5%CO₂雰囲気下、+37 で培養した。10日後、H A T補足培地をH T補足細胞培養培地 (ギブコ、043 - 01065H、50倍希釈) に交換した。H T培地はアミノプテリンを含まないことを除くとH A T培地と同一である。

【0059】

3週間後、特異的な抗体の産生を、実施例10に記載されている抗原特異的免疫蛍光分析法 (antigen-specific immunofluorometric assay) であるI F M Aにより決定した。マスタークローンを、スタスツェウスキー (Staszewski) ら、エール・ジャーナル・オブ・バイオロジー・アンド・メディシン (Yale Journal of Biology and Medicine)、57巻、865~868頁 (1984年) に記載された限界希釈 (limited dilutions) によりクローニングした。陽性クローンを24ウェル組織培養プレート (ヌンク) 上で増やし、再クローニングし、前記と同様の方法により再試験を行なった。陽性のクローンを蛍光

活性化細胞選別法 (FACS) により試験した。

【0060】

安定したクローンは、おそらくクラス IgA に属する Ig を産生した 1 つのクローンを除いて、IgG1 クラスに属する免疫グロブリンを分泌した。モノクローナル抗体のサブクラスを、IFMA において、マウスのサブクラスに対するラットのモノクローナル抗体をビオチン接合物 (biotin conjugate) (セロテック (SEROTEC)) として使用して決定した。

【0061】

腹水 (ascites fluid) 中にモノクローナル抗体を産生するために Balb/c マウスを使用した。プリスタン (pristane) (2, 6, 10, 14 - テトラメチルペンタデカン、98%、アルドリッチ - ケミエ (ALDRICH-CHEMIE)、デー (D) - 7924、シュタインハイム (Steinheim)、カタログ番号 T2, 280 - 2) でマウスを前処理したのち、前記ハイブリドーマを前記マウスに腹腔内注射した。ハイブリドーマ細胞注射の約 2 週間前に、プリスタン 0.5 ml を (静脈内) 注射した。注射した細胞量はマウス 1 匹あたり約 $7.5 \sim 9 \times 10^6$ であった。ハイブリドーマ注射後 10 ~ 14 日後、腹水を集めた。

10

【0062】

融合 II :

2 月齢の Balb/c マウス (雌) を、フロイント完全アジュバントを用いて乳化した組換えにより産生した FLT4 タンパク質 (実施例 7 参照) ($20 \mu\text{g}$ / マウス) の腹腔内注射により免疫した。3 ~ 4 週間おきに $20 \mu\text{g}$ のブースター注射をし、さらに 3 週間の間隔をおいたのち最終ブースター (PBS 中に $10 \mu\text{g}$ の FLT4、静脈内投与) を行なった。最終ブースター投与から 4 日後、マウスを屠殺し、マウス脾リンパ様細胞を SP2/0 プラスマ細胞腫細胞とそれぞれ 2 : 1 の割合で融合させた。

20

【0063】

融合細胞を、20% ウシ胎児血清および HAT 補足物 (ヒポキサンチン - アミノプテリン - チミジン、ギブコ ビーアールエル (GIBCO BRL) 21060 - 017、1 : 50 に希釈) を含む オプティエムイーエム (OptiMEM) 1 (グルタマックス (Glutamax) 1 を有する、51985 - 026、ギブコ ビーアールエル) を添加した 96 ウェル培養プレート (ファルコン (FALCON)) 中からえた。細胞を 5% CO₂ 雰囲気下、+37 で培養した。10 日後、HAT 補足培地を HT 補足細胞培養培地 (ギブコ ビーアールエル、41065 - 012、1 : 50 倍に希釈) に交換した。HT 培地はアミノプテリンを含まないことを除くと HAT 培地と同一である。

30

【0064】

3 週間後、特異的な抗体の産生を、実施例 9 に記載されている抗原特異的免疫蛍光分析法 (IFMA) により決定した。マスタークローンを、スタスツェウスキーら、エール・ジャーナル・オブ・バイオロジー・アンド・メディシン、57 巻、865 ~ 868 頁 (1984 年) に記載された限界希釈によりクローニングした。陽性クローンを 24 ウェル組織培養プレート (ファルコン) 上で増やし、再クローニングし、前記と同様の方法により再試験を行なった。陽性のクローンを蛍光活性化細胞選別法 (FACS) により試験した。

40

【0065】

2E11 および 6B2 クローンは、IgG₁ クラスに属する免疫グロブリンを分泌し、2B12 クローンはサブクラス IgM に属する Ig を産生した。マウスのサブクラスの IgG₁ を、IFMA において、マウスのサブクラスの重鎖に対するラットモノクローナル抗体をビオチン接合物 (セロテック) として使用して決定し、マウスのサブクラスの IgM を、マウスモノクローナル抗体アイソタイピング・キット (Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit) (ディップスティック フォーマット (Dipstick Format)) (19663 - 012、ライフ テクノロジーズ社 (Life Technologies Inc.)) を用いて決定した。

50

【 0 0 6 6 】

実施例 9

F L T 4 に対するモノクローナル抗体の特異性

融合 I の抗体：

実施例 7 に記載した F L T 4 の細胞外ドメインを、アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.)、176 巻 (2)、319 ~ 325 頁 (1989 年) に記載された ムッカラ (Mukkala) らの方法に、以下に示す改変：250 倍をこえるモル量のイソチオシアネート D T T A - E u (N 1 キレート (N 1 chelate)、ワラック (Wallac)、フィンランド共和国) を F L T 4 溶液 (P B S 中に 0.5 mg / ml) に添加し、pH を 0.5 mol / L 炭酸ナトリウム緩衝液、pH 9.8 を添加することにより約 9 に調整したことを加えて標識化した。標識化を + 4 で一晩行なった。結合しなかった標識を、溶離液としての T S A 緩衝液 (0.15 mol / l の NaCl を含む 50 mmol / L Tris - HCl、pH 7.8) とともに P D - 10 (ファルマシア、スウェーデン王国) を用いて除去した。

10

【 0 0 6 7 】

精製後、標識された F L T 4 に 1 mg / ml ウシ血清アルブミン (B S A) を添加し、標識物を + 4 で貯蔵した。既知の E u C l₃ 標準の蛍光に対する蛍光の割合を測定することにより決定した F L T 4 の 1 分子あたりに取り込まれたユウロピウムイオン数は 1.9 であった (ヘミッラ (Hemmilae) ら、アナリティカル・バイオケミストリー、137 巻、335 ~ 343 頁 (1984 年))。

20

【 0 0 6 8 】

実施例 8 において産生した抗体を、ウサギ抗マウス I g (Z 2 5 9、ダコパッツ (DAKO PATTS)) で被覆したマイクロタイトレーション・ストリップ・ウェル (microtitration strip wells) (ヌンク (NUNC)、ポリソープ (polysorb)) を用いたサンドイッチ型免疫蛍光分析法を使用してスクリーニングした。あらかじめ被覆したウェルをデルフィア (DELFI A) 洗浄溶液を用いたプレートウォッシュ (Platewash) 1296 - 024 (ワラック) により一度洗浄した。デルフィア分析緩衝液を、細胞培養上清および予備的スクリーニング分析 (preliminary screening assays) における正の対照として使用した脾摘出したマウスの血清 (1 : 1000 ~ 1 : 10000 の希釈) の希釈緩衝液として使用した。

30

【 0 0 6 9 】

+ 4 で一晩 (または室温で 2 時間) のインキュベーションを、プレートシェイク振とう機 (Plateshake shaker) (1296 - 001、ワラック) 上での 5 分間の振とうにより開始し、続いて前記洗浄溶液を用いて 4 回洗浄した。

【 0 0 7 0 】

ユウロピウムで標識した F L T 4 を、分析緩衝液 100 μ l 中、1 : 500 の希釈で添加した。プレートシェイク振とう機上で 5 分間および室温 (R T) で 1 時間インキュベートしたのち、前記と同様にストリップを洗浄した。

【 0 0 7 1 】

エンハンスメント溶液 (Enhancement solution) (デルフィア) を 200 μ l / ウェルの濃度で添加した。ついで、プレートを、プレートシェイク振とう機上で 5 分間振とうし、アルクス (ARCUS) - 1230 (ワラック) により蛍光強度を 10 ~ 15 分間測定した (レブグレン (Loevgren) ら、コリンズ ダブリュー ピー (Collins W.P.) (編)、オルターナティブ・イムノアッセイズ (Alternative Immunoassays)、ジョン・ウィレー・アンド・ソنز社 (John Wiley & Sons Ltd.)、203 ~ 216 頁 (1985 年))。

40

【 0 0 7 2 】

えられた F L T 4 に対するモノクローナル抗体および対応する F A C S の結果を表 1 に要約する。

【 0 0 7 3 】

【表 1】

表 1

モノクローナル 抗体のクローン	LTR% ^{a)}	NEO% ^{b)}	デルフィア カウント
1B1	67,3	1	20625
1B1D11	75	1,2	19694
1B1F8	76,1	1,4	18580
4F6	69,9	1,2	23229
4F6B8G12	75	0,3	24374
4F6B8H11	75,9	0,3	28281
4F6B8E12	74,8	0,4	27097
4F6B8G10	75,3	0,4	26063
9D9	45,1	0,75	17316
9D9D10	71,7	2,3	18230
9D9F9	73	1,8	11904
9D9G6	74,3	2,9	16743
9D9G7	70,7	1,3	17009
10E4	24,2	1,4	39202
10E4B10E12	32,3	0,3	42490
10E4B10G10	36,5	0,3	54815
10E4B10F12	45,6	0,4	43909
10E4B10G12	45,7	0,5	35576
11G2	30,2	1,6	11304
11G2D12	74,4	1,5	14660
11G2G9	74,2	0,9	10283
11G2H7	74,4	2,1	25382

10

20

30

a) LTR トランスフェクト細胞を用いての FACS の結果

b) NEO 細胞 (対照) を用いての FACS の結果

【0074】

抗 F L T 4 の 9 D 9 F 9 と名付けられた 1 つのクローンは、I F M A により免疫グロブリンクラス I g G₁ に属することが決定されたモノクローナル抗体を安定して分泌した。ハイブリドーマ 9 d 9 f 9 は、1995 年 3 月 23 日に、ドイツ連邦共和国、3300 ブラウンシュヴァイク (Braunschweig)、マシエロデル ヴェク 1 ベー (Mascheroder Weg 1 b) のドイツ微生物および細胞培養コレクション (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)、ヒトおよび動物細胞ならびにウイルス部門 (Department of Human and Animal Cell Cultures and Viruses) に寄託され、受託番号 A C C 2 2 1 0 を与えられている。

【0075】

融合 II の抗体：

実施例 7 に記載した F L T 4 の細胞外ドメインを、アナリティカル・バイオケミストリ

40

50

一、176巻(2)、319~325頁(1989年)に記載されたムッカラらの方法に、以下に示す改変: 250倍をこえるモル量のイソチオシアネートDTTA-Eu(N1キレート、ワラック、フィンランド共和国)をFLT4溶液(PBS中に0.5mg/ml)に添加し、pHを0.5mol/L炭酸ナトリウム緩衝液、pH9.8を添加することにより約9に調整したことを加えて標識化した。標識化を+4で一晩行なった。結合しなかった標識は、溶離液としてのTSA緩衝液(0.15mol/LのNaClを含む50mmol/L Tris-HCl、pH7.8)とともにPD-10(ファルマシア)を用いて除去した。

【0076】

精製後、標識されたFLT4に1mg/mlウシ血清アルブミン(BSA)を添加し、標識物を+4で貯蔵した。既知のEuCl₃標準の蛍光に対する蛍光の割合を測定することにより決定したFLT4の1分子あたりに取り込まれたユウロピウムイオン数は1.9であった(ヘミッリ(Hemmi)ら、アナリティカル・バイオケミストリー、137巻、335~343頁(1984年))。

【0077】

実施例8において産生した抗体を、ウサギ抗マウスIg(Z259、ダコ(DAKO))で被覆したマイクロタイトレーション・ウェル(ヌンク、ポリソープ)を用いたFLT4特異的IFMAを使用してスクリーニングした。あらかじめ被覆したウェルをデルフィア・プレート・ウォッシュにより洗浄溶液(ワラック)を用いて一度洗浄した。

【0078】

デルフィア分析緩衝液を、細胞培養上清(予備的スクリーニングにおいて1:2の希釈)および正の対照として使用した脾摘出したマウスの血清(1:1000~1:10000の希釈)の希釈緩衝液として使用した。標準として、精製した抗FLT4の9D9F9(マウスのサブクラスIgG1)を1.0ng/ml~250ng/mlのあいだの濃度で使用した。サンプルをはじめに室温下、プレート・シェイク(ワラック)上で5分間振とうし、ついで+4で約18時間インキュベートした。はじめにフレーム(frames)を4回洗浄し、ついでユウロピウムで標識したFLT4(分析緩衝液100μl中、1:2000)を添加し、最終的に前記フレームを室温下で1時間インキュベートした。前記のように洗浄したのち、エンハンスメント溶液(200μl/ウェル、ワラック)を添加し、プレートをプレート・シェイク上で5分間振とうした。蛍光強度をアルクス-1230(ワラック)により測定した。

【0079】

えられたFLT4に対するモノクローナル抗体および対応する結果を表2に要約する。

【0080】

抗FLT4抗体の定量の標準曲線を、親和性により精製した抗FLT4である9D9F9を使用して作成した。直線の範囲は1.0ng/ml~250ng/mlに達した。

【0081】

細胞表面上に全長のFLT4を発現するpLTRFLT4構築物を同時にトランスフェクト(cotransfected)したNIH3T3細胞の細胞溶解物を、6.5%SDS-PAGE中で電気泳動し、タンパク質をニトロセルロース硝酸塩(nitrocellulose nitrate)膜(0.45μm、シュレイチャー アンド シュエル(SCHLEICHER & SCHUELL))上に移し、モノクローナル抗体細胞培養上清(1:10に希釈、50mmol/L TRIS-4%メタノールを含む40mmol/Lグリシン緩衝液、0.04%SDS)を用いてイムノプロットした。モノクローナル抗体の特異性をエイチアールピー(HRP)接合ウサギ抗マウスIg(P161、ダコ、150mmol/L食塩水および5%ミルク粉末を含む20mmol/L TRIS緩衝液、pH7.5中、1:1000に希釈)およびイーシーエル(ECL)(エンハンスド ケミルミネッセンス(Enhanced chemiluminescence)、アマシャム)とのインキュベーションを使用して検出した。

【0082】

10

20

30

40

【表 2】

表 2

モノクローナル 抗体のクローン	LTR %a)	NEOb)	10 ⁶ 細胞あたりの 産生される抗体の およその量 (ng/ml)	WB
2B12E10	39.5	6.0	440	+
2E11D11	44.6	8.8	110	+
2E11F9	49.5	4.5	100	+
2E11F12	46.0	4.1	180	+
2E11G8	41.2	7.8	160	+
6B2E12	NF	NF	1390	+
6B2F8	NF	NF	470	+
6B2G6	NF	NF	630	+
6B2H5	NF	NF	740	+
6B2H8	NF	NF	1800	+

a) LTR トランスフェクト細胞を用いてのFACSの結果

b) NEO細胞（対照）を用いてのFACSの結果

NF：FACSにおいて機能しなかった

c) 標準として使用した親和性により精製した抗FLTである

9D9F9抗体にもとづくモノクローナル抗体産生の定量

【0083】

前記より明らかなように、本発明に係る抗体は、リンパ管、リンパ内皮細胞、高内皮性小静脈、リンパ管腫、転移性リンパ節およびその他のリンパ系の疾患状態の診断ならびに同定、転移の蔓延（metastatic spread）の検出およびモニタリングに、リンパ管および高内皮性小静脈の内皮細胞の刺激ならびに阻害に、内皮細胞への分子の選択的な導入に、そしてリンパ管およびリンパ管の疾患状態の映像化において有用である。本明細書において請求した主題の他の用途は当業者にとって明らかである。

【0084】

[参考文献]

1. Sabin, F.R. 1909. リンパ系全体としての形態を考慮した、ヒト胚のリンパ系。Am. J. Anat. 9 : 43.
2. van der Putte, S.C.J. 1975. ヒトにおけるリンパ系の発達。Adv. Anat. Embryol. Cell Biol. 51 : 3.
3. Pajusola, K., O. Aprelikova, J. Korhonen, A. Kaipainen, L. Pertovaara, R. Alitalo, and K. Alitalo. 1992. 受容体チロシンキナーゼであるFLT4は7つの免疫グロブリン様ループを含み、多数のヒト組織および細胞系で発現する。Cancer Res. 52 : 5738.
4. Kaipainen, A., J. Korhonen, K. Pajusola, O. Aprelikova, M. G. Persico, B. I. Terman, and K. Alitalo. 1993. 受容体チロシンキナーゼである関連したFLT4、FLT1およびKDRは、ヒト胎児の内皮細胞において異なる発現パターンを示す。J. Exp. Med. 178 : 2077.
5. Galland, F., A. Karamysheva, M. -J. Pebusque, J. -P. Borg, R. Rottapel, P. Dubreuil, O. Rosnet, and D. Birnbaum. 1993. FLT4遺伝子は、脈管の内皮成長因子受容体に関するトランスメンブレン型チロシンキナーゼをコードする。Oncogene. 8 : 1233.
6. Millauer, B., S. Witzigmann-Voos, H. Schnuerch, R. Martinez, N. -P. H. Moller, W. Risau, and A. Ullrich. 1993. 高親和性のVEGFの結合および発達上の発現は、脈管形成および

血管形成の主要なレギュレーターとしての F l k - 1 を示唆する。Cell. 7 2 : 8 3 5 .

7. Yamaguchi, T. P., D. Dumont, R. A. Conlon, M. L. Breitman, and J. Rossant. 1 9 9 3 . f l t 関連チロシンキナーゼである f l k - 1 は内皮細胞前駆体に対する早期のマーカーである。Development. 1 1 8 : 4 8 9 .

8. Peters, K. G., C. De Vries, and L. T. Williams. 1 9 9 3 . 脈管内皮の成長因子の受容体の胚形成および組織修復中の発現は、内皮の分化および血管の成長における役割を示唆する。Proc. Natl. Acad. Sci. USA 9 0 : 8 9 1 5 .

9. Finnerty, H., K. Kelleher, G. Morris E., K. Bean, D. Merberg, R. Kritiz, J. Morris C., H. Soodeo, K. J. Turner, and C. R. Wood 1 9 9 3 . マウスの F L T および F L T 4 の分子クロニング。Oncogene. 8 : 2 2 9 3 .

10. Korhonen, J., A. Polvi, J. Partanen, and K. Alitalo. 1 9 9 3 . マウスの受容体チロシンキナーゼである t i e 遺伝子：胚の血管形成中の発現。Oncogene. 8 : 3 9 5 .

11. Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1 9 8 7 . 酸性グアニジンチオシアネート - フェノール - クロロホルム抽出による R N A 単離の単一工程方法。Anal. Biochem. 1 6 2 : 1 5 6 .

12. Tokunaga, K., H. Taniguchi, K. Yoda, M. Shimizu, and S. Sakiyama. 1 9 8 6 . マウスの細胞骨格 β に作用する m R N A に対する全長の c D N A のヌクレオチド配列。Nucleic Acid Res. 1 4 : 2 8 2 9 .

13. Wilkinson, D. G., J. A. Bailes, J. E. Champion, and A. P. McMahon. 1 9 8 7 . 交尾後 (post coitum) 8 ~ 1 0 日のマウスの発達の分子解析により胚のグロビン発現のみに変化が検出される。Development. 9 9 : 4 9 3 .

14. Wilkinson, D. G., J. A. Bailes, and A. P. McMahon. 1 9 8 7 . プロトオンコジーンである i n t - 1 の発現は、発達中のマウスの胚の特定の神経細胞に限定される。Cell. 5 0 : 7 9 .

15. Van Hinsberg, V. W. M., D. Binnema, M. A. Scheffer, E. D. Sprengers, T. Kooistra, and D. C. Rijcken. 1 9 8 7 . 成人のヒト血管由来の連続的に増殖した内皮細胞によるプラスミノゲン活性化因子および阻害因子の産生。Arteriosclerosis. 7 : 3 8 9 .

16. Van Hinsberg, V. W. M., M. A. Scheffer, and T. Kooistra. 1 9 8 7 . ヒト包皮微小管の内皮細胞によるプラスミノゲン活性化因子および P A 阻害因子 - 1 産生に対するトロンビンの作用。Thromb. Haemostas. 5 7 : 1 4 8 .

17. Bonthron, D. T., E. C. Orr, L. M. Mitsock, D. Ginsberg, R. I. Handin, and S. H. Orkin. 1 9 8 6 . プレ - プロ - フォンビルプラント因子の c D N A のヌクレオチド配列。Nucleic Acids Res. 1 4 1 : 7 1 2 5 .

18. Shi, E., M. Kan, J. Xu, and W. L. McKeehan. 1 9 9 1 . (繊維芽細胞) 成長因子結合型の 1 6 キロダルトンのヘパリンのあるものは、受容体に依存した内在化ののち、安定な 4 0 キロダルトンの複合体として生じる。J. Biol. Chem. 2 6 6 : 5 7 7 4 .

19. Catoretti, G., M. H. G. Becker, G. Key, M. Duchrow, C. Schlueter, J. Galle, and J. Gerdest. 1 9 9 2 . K i - 6 7 抗原の組換え部分に対するモノクローナル抗体 (M I B 1 および M I B 3) は、マイクロ波で処理したホルマリン固定化パラフィン切片中の増殖している細胞を検出した。J. of Pathol. 1 6 8 : 3 5 7 .

【 0 0 8 5 】

[配列の表示]

(1) 一般情報

(i) 出願人 :

(A) 名称 : ヘルシンキ ユニバシティ ライセンシング リミテッド オケサ ユキチュア

(A) 名称 : オリオン コーポレーション

(ii) 発明の名称 : 受容体チロシンキナーゼである F L T 4 ならびに診断および治療におけるその用途

(iii) 配列の数 : 1

(iv) コンピュータ読取フォーム :

(A) ソフトウェア : PatentIn Release 1.0、バージョン1.25 (ヨーロッパ特許局)

(v) 優先権データ :

(A) 出願番号 : アメリカ合衆国、08 / 257754

(B) 出願日 : 1994年6月9日

(2) 配列番号 : 1

CCACGCGCAG CGGCCGGAG ATG CAG CGG GGC GCC GCG CTG TGC CTG CGA CTG
52

Met Gln Arg Gly Ala Ala Leu Cys Leu Arg Leu

1

5

10

TGG CTC TGC CTG GGA CTC CTG GAC GGC CTG GTG AGT GGC TAC TCC ATG
100

Trp Leu Cys Leu Gly Leu Leu Asp Gly Leu Val Ser Gly Tyr Ser Met
15 20 25

ACC CCC CCG ACC TTG AAC ATC ACG GAG GAG TCA CAC GTC ATC GAC ACC
148

Thr Pro Pro Thr Leu Asn Ile Thr Glu Glu Ser His Val Ile Asp Thr
30 35 40

GGT GAC AGC CTG TCC ATC TCC TGC AGG GGA CAG CAC CCC CTC GAG TGG
196

Gly Asp Ser Leu Ser Ile Ser Cys Arg Gly Gln His Pro Leu Glu Trp
45 50 55

GCT TGG CCA GGA GCT CAG GAG GCG CCA GCC ACC GGA GAC AAG GAC AGC
244

Ala Trp Pro Gly Ala Gln Glu Ala Pro Ala Thr Gly Asp Lys Asp Ser
60 65 70 75

GAG GAC ACG GGG GTG GTG CGA GAC TGC GAG GGC ACA GAC GCC AGG CCC
292

Glu Asp Thr Gly Val Val Arg Asp Cys Glu Gly Thr Asp Ala Arg Pro
80 85 90

TAC TGC AAG GTG TTG CTG CTG CAC GAG GTA CAT GCC AAC GAC ACA GGC
340

Tyr Cys Lys Val Leu Leu Leu His Glu Val His Ala Asn Asp Thr Gly
95 100 105

AGC TAC GTC TGC TAC TAC AAG TAC ATC AAG GCA CGC ATC GAG GGC ACC
388

Ser Tyr Val Cys Tyr Tyr Lys Tyr Ile Lys Ala Arg Ile Glu Gly Thr
110 115 120

ACG GCC GCC AGC TCC TAC GTG TTC GTG AGA GAC TTT GAG CAG CCA TTC
436

Thr Ala Ala Ser Ser Tyr Val Phe Val Arg Asp Phe Glu Gln Pro Phe
125 130 135

ATC AAC AAG CCT GAC ACG CTC TTG GTC AAC AGG AAG GAC GCC ATG TGG
484

Ile Asn Lys Pro Asp Thr Leu Leu Val Asn Arg Lys Asp Ala Met Trp
140 145 150 155

GTG CCC TGT CTG GTG TCC ATC CCC GGC CTC AAT GTC ACG CTG CGC TCG
532

Val Pro Cys Leu Val Ser Ile Pro Gly Leu Asn Val Thr Leu Arg Ser
160 165 170

CAA AGC TCG GTG CTG TGG CCA GAC GGG CAG GAG GTG GTG TGG GAT GAC
580

Gln Ser Ser Val Leu Trp Pro Asp Gly Gln Glu Val Val Trp Asp Asp
175 180 185

10

20

30

40

50

CGG CGG GGC ATG CTC GTG TCC ACG CCA CTG CTG CAC GAT GCC CTG TAC
 628
 Arg Arg Gly Met Leu Val Ser Thr Pro Leu Leu His Asp Ala Leu Tyr
 190 195 200

CTG CAG TGC GAG ACC ACC TGG GGA GAC CAG GAC TTC CTT TCC AAC CCC
 676
 Leu Gln Cys Glu Thr Thr Trp Gly Asp Gln Asp Phe Leu Ser Asn Pro
 205 210 215

TTC CTG GTG CAC ATC ACA GGC AAC GAG CTC TAT GAC ATC CAG CTG TTG
 724
 Phe Leu Val His Ile Thr Gly Asn Glu Leu Tyr Asp Ile Gln Leu Leu
 220 225 230 235

CCC AGG AAG TCG CTG GAG CTG CTG GTA GGG GAG AAG CTG GTC CTG AAC
 772
 Pro Arg Lys Ser Leu Glu Leu Leu Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn
 240 245 250

TGC ACC GTG TGG GCT GAG TTT AAC TCA GGT GTC ACC TTT GAC TGG GAC
 820
 Cys Thr Val Trp Ala Glu Phe Asn Ser Gly Val Thr Phe Asp Trp Asp
 255 260 265

TAC CCA GGG AAG CAG GCA GAG CGG GGT AAG TGG GTG CCC GAG CGA CGC
 868
 Tyr Pro Gly Lys Gln Ala Glu Arg Gly Lys Trp Val Pro Glu Arg Arg
 270 275 280

TCC CAG CAG ACC CAC ACA GAA CTC TCC AGC ATC CTG ACC ATC CAC AAC
 916
 Ser Gln Gln Thr His Thr Glu Leu Ser Ser Ile Leu Thr Ile His Asn
 285 290 295

GTC AGC CAG CAC GAC CTG GGC TCG TAT GTG TGC AAG GCC AAC AAC GGC
 964
 Val Ser Gln His Asp Leu Gly Ser Tyr Val Cys Lys Ala Asn Asn Gly
 300 305 310 315

ATC CAG CGA TTT CGG GAG AGC ACC GAG GTC ATT GTG CAT GAA AAT CCC
 1012
 Ile Gln Arg Phe Arg Glu Ser Thr Glu Val Ile Val His Glu Asn Pro
 320 325 330

TTC ATC AGC GTC GAG TGG CTC AAA GGA CCC ATC CTG GAG GCC ACG GCA
 1060
 Phe Ile Ser Val Glu Trp Leu Lys Gly Pro Ile Leu Glu Ala Thr Ala
 335 340 345

GGA GAC GAG CTG GTG AAG CTG CCC GTG AAG CTG GCA GCG TAC CCC CCG
 1108
 Gly Asp Glu Leu Val Lys Leu Pro Val Lys Leu Ala Ala Tyr Pro Pro
 350 355 360

CCC GAG TTC CAG TGG TAC AAG GAT GGA AAG GCA CTG TCC GGG CGC CAC
 1156
 Pro Glu Phe Gln Trp Tyr Lys Asp Gly Lys Ala Leu Ser Gly Arg His
 365 370 375

AGT CCA CAT GCC CTG GTG CTC AAG GAG GTG ACA GAG GCC AGC ACA GGC
 1204
 Ser Pro His Ala Leu Val Leu Lys Glu Val Thr Glu Ala Ser Thr Gly
 380 385 390 395

10

20

30

40

ACC TAC ACC CTC GCC CTG TGG AAC TCC GCT GCT GGC CTG AGG CGC AAC
 1252
 Thr Tyr Thr Leu Ala Leu Trp Asn Ser Ala Ala Gly Leu Arg Arg Asn
 400 405 410

ATC AGC CTG GAG CTG GTG GTG AAT GTG CCC CCC CAG ATA CAT GAG AAG
 1300
 Ile Ser Leu Glu Leu Val Val Asn Val Pro Pro Gln Ile His Glu Lys
 415 420 425

GAG GCC TCC TCC CCC AGC ATC TAC TCG CGT CAC AGC CGC CAG GCC CTC
 1348
 Glu Ala Ser Ser Pro Ser Ile Tyr Ser Arg His Ser Arg Gln Ala Leu
 430 435 440

ACC TGC ACG GCC TAC GGG GTG CCC CTG CCT CTC AGC ATC CAG TGG CAC
 1396
 Thr Cys Thr Ala Tyr Gly Val Pro Leu Pro Leu Ser Ile Gln Trp His
 445 450 455

TGG CGG CCC TGG ACA CCC TGC AAG ATG TTT GCC CAG CGT AGT CTC CGG
 1444

Trp Arg Pro Trp Thr Pro Cys Lys Met Phe Ala Gln Arg Ser Leu Arg
 460 465 470 475

CGG CGG CAG CAG CAA GAC CTC ATG CCA CAG TGC CGT GAC TGG AGG GCG
 1492
 Arg Arg Gln Gln Gln Asp Leu Met Pro Gln Cys Arg Asp Trp Arg Ala
 480 485 490

GTG ACC ACG CAG GAT GCC GTG AAC CCC ATC GAG AGC CTG GAC ACC TGG
 1540
 Val Thr Thr Gln Asp Ala Val Asn Pro Ile Glu Ser Leu Asp Thr Trp
 495 500 505

ACC GAG TTT GTG GAG GGA AAG AAT AAG ACT GTG AGC AAG CTG GTG ATC
 1588
 Thr Glu Phe Val Glu Gly Lys Asn Lys Thr Val Ser Lys Leu Val Ile
 510 515 520

CAG AAT GCC AAC GTG TCT GCC ATG TAC AAG TGT GTG GTC TCC AAC AAG
 1636
 Gln Asn Ala Asn Val Ser Ala Met Tyr Lys Cys Val Val Ser Asn Lys
 525 530 535

GTG GGC CAG GAT GAG CGG CTC ATC TAC TTC TAT GTG ACC ACC ATC CCC
 1684
 Val Gly Gln Asp Glu Arg Leu Ile Tyr Phe Tyr Val Thr Thr Ile Pro
 540 545 550 555

GAC GGC TTC ACC ATC GAA TCC AAG CCA TCC GAG GAG CTA CTA GAG GGC
 1732
 Asp Gly Phe Thr Ile Glu Ser Lys Pro Ser Glu Glu Leu Leu Glu Gly
 560 565 570

CAG CCG GTG CTC CTG AGC TGC CAA GCC GAC AGC TAC AAG TAC GAG CAT
 1780
 Gln Pro Val Leu Leu Ser Cys Gln Ala Asp Ser Tyr Lys Tyr Glu His
 575 580 585

CTG CGC TGG TAC CGC CTC AAC CTG TCC ACG CTG CAC GAT GCG CAC GGG
 1828
 Leu Arg Trp Tyr Arg Leu Asn Leu Ser Thr Leu His Asp Ala His Gly
 590 595 600

10

20

30

40

AAC CCG CTT CTG CTC GAC TGC AAG AAC GTG CAT CTG TTC GCC ACC CCT
 1876
 Asn Pro Leu Leu Leu Asp Cys Lys Asn Val His Leu Phe Ala Thr Pro
 605 610 615

CTG GCC GCC AGC CTG GAG GAG GTG GCA CCT GGG GCG CGC CAC GCC ACG
 1924
 Leu Ala Ala Ser Leu Glu Glu Val Ala Pro Gly Ala Arg His Ala Thr
 620 625 630 635

CTC AGC CTG AGT ATC CCC CGC GTC GCG CCC GAG CAC GAG GGC CAC TAT
 1972
 Leu Ser Leu Ser Ile Pro Arg Val Ala Pro Glu His Glu Gly His Tyr
 640 645 650

GTG TGC GAA GTG CAA GAC CGG CGC AGC CAT GAC AAG CAC TGC CAC AAG
 2020
 Val Cys Glu Val Gln Asp Arg Arg Ser His Asp Lys His Cys His Lys
 655 660 665

AAG TAC CTG TCG GTG CAG GCC CTG GAA GCC CCT CGG CTC ACG CAG AAC
 2068
 Lys Tyr Leu Ser Val Gln Ala Leu Glu Ala Pro Arg Leu Thr Gln Asn
 670 675 680

TTG ACC GAC CTC CTG GTG AAC GTG AGC GAC TCG CTG GAG ATG CAG TGC
 2116
 Leu Thr Asp Leu Leu Val Asn Val Ser Asp Ser Leu Glu Met Gln Cys
 685 690 695

TTG GTG GCC GGA GCG CAC GCG CCC AGC ATC GTG TGG TAC AAA GAC GAG
 2164
 Leu Val Ala Gly Ala His Ala Pro Ser Ile Val Trp Tyr Lys Asp Glu
 700 705 710 715

AGG CTG CTG GAG GAA AAG TCT GGA GTC GAC TTG GCG GAC TCC AAC CAG
 2212
 Arg Leu Leu Glu Glu Lys Ser Gly Val Asp Leu Ala Asp Ser Asn Gln
 720 725 730

AAG CTG AGC ATC CAG CGC GTG CGC GAG GAG GAT GCG GGA CGC TAT CTG
 2260
 Lys Leu Ser Ile Gln Arg Val Arg Glu Glu Asp Ala Gly Arg Tyr Leu
 735 740 745

TGC AGC GTG TGC AAC GCC AAG GGC TGC GTC AAC TCC TCC GCC AGC GTG
 2308
 Cys Ser Val Cys Asn Ala Lys Gly Cys Val Asn Ser Ser Ala Ser Val
 750 755 760

GCC GTG GAA GGC TCC GAG GAT AAG GGC AGC ATG GAG ATC GTG ATC CTT
 2356
 Ala Val Glu Gly Ser Glu Asp Lys Gly Ser Met Glu Ile Val Ile Leu
 765 770 775

GTC GGT ACC GGC GTC ATC GCT GTC TTC TTC TGG GTC CTC CTC CTC CTC
 2404
 Val Gly Thr Gly Val Ile Ala Val Phe Phe Trp Val Leu Leu Leu Leu
 780 785 790 795

ATC TTC TGT AAC ATG AGG AGG CCG GCC CAC GCA GAC ATC AAG ACG GGC
 2452
 Ile Phe Cys Asn Met Arg Arg Pro Ala His Ala Asp Ile Lys Thr Gly
 800 805 810

10

20

30

40

TAC CTG TCC ATC ATC ATG GAC CCC GGG GAG GTG CCT CTG GAG GAG CAA
 2500
 Tyr Leu Ser Ile Ile Met Asp Pro Gly Glu Val Pro Leu Glu Glu Gln
 815 820 825

TGC GAA TAC CTG TCC TAC GAT GCC AGC CAG TGG GAA TTC CCC CGA GAG
 2548
 Cys Glu Tyr Leu Ser Tyr Asp Ala Ser Gln Trp Glu Phe Pro Arg Glu
 830 835 840

CGG CTG CAC CTG GGG AGA GTG CTC GGC TAC GGC GCC TTC GGG AAG GTG
 2596
 Arg Leu His Leu Gly Arg Val Leu Gly Tyr Gly Ala Phe Gly Lys Val
 845 850 855

GTG GAA GCC TCC GCT TTC GGC ATC CAC AAG GGC AGC AGC TGT GAC ACC
 2644
 Val Glu Ala Ser Ala Phe Gly Ile His Lys Gly Ser Ser Cys Asp Thr
 860 865 870 875

GTG GCC GTG AAA ATG CTG AAA GAG GGC GCC ACG GCC AGC GAG CAC CGC
 2692
 Val Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Gly Ala Thr Ala Ser Glu His Arg
 880 885 890

GCG CTG ATG TCG GAG CTC AAG ATC CTC ATT CAC ATC GGC AAC CAC CTC
 2740
 Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Leu Ile His Ile Gly Asn His Leu
 895 900 905

AAC GTG GTC AAC CTC CTC GGG GCG TGC ACC AAG CCG CAG GGC CCC CTC
 2788
 Asn Val Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Lys Pro Gln Gly Pro Leu
 910 915 920

ATG GTG ATC GTG GAG TTC TGC AAG TAC GGC AAC CTC TCC AAC TTC CTG
 2836
 Met Val Ile Val Glu Phe Cys Lys Tyr Gly Asn Leu Ser Asn Phe Leu
 925 930 935

CGC GCC AAG CGG GAC GCC TTC AGC CCC TGC GCG GAG AAG TCT CCC GAG
 2884
 Arg Ala Lys Arg Asp Ala Phe Ser Pro Cys Ala Glu Lys Ser Pro Glu
 940 945 950 955

CAG CGC GGA CGC TTC CGC GCC ATG GTG GAG CTC GCC AGG CTG GAT CGG
 2932
 Gln Arg Gly Arg Phe Arg Ala Met Val Glu Leu Ala Arg Leu Asp Arg
 960 965 970

AGG CGG CCG GGG AGC AGC GAC AGG GTC CTC TTC GCG CGG TTC TCG AAG
 2980
 Arg Arg Pro Gly Ser Ser Asp Arg Val Leu Phe Ala Arg Phe Ser Lys
 975 980 985

ACC GAG GGC GGA GCG AGG CGG GCT TCT CCA GAC CAA GAA GCT GAG GAC
 3028
 Thr Glu Gly Gly Ala Arg Arg Ala Ser Pro Asp Gln Glu Ala Glu Asp
 990 995 1000

CTG TGG CTG AGC CCG CTG ACC ATG GAA GAT CTT GTC TGC TAC AGC TTC
 3076
 Leu Trp Leu Ser Pro Leu Thr Met Glu Asp Leu Val Cys Tyr Ser Phe
 1005 1010 1015

10

20

30

40

CAG GTG GCC AGA GGG ATG GAG TTC CTG GCT TCC CGA AAG TGC ATC CAC
 3124
 Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Phe Leu Ala Ser Arg Lys Cys Ile His
 1020 1025 1030 1035
 AGA GAC CTG GCT GCT CGG AAC ATT CTG CTG TCG GAA AGC GAC GTG GTG
 3172
 Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu Ser Asp Val Val
 1040 1045 1050
 AAG ATC TGT GAC TTT GGC CTT GCC CGG GAC ATC TAC AAA GAC CCT GAC
 3220
 Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asp Pro Asp
 1055 1060 1065
 TAC GTC CGC AAG GGC AGT GCC CGG CTG CCC CTG AAG TGG ATG GCC CCT
 3268
 Tyr Val Arg Lys Gly Ser Ala Arg Leu Pro Leu Lys Trp Met Ala Pro
 1070 1075 1080
 GAA AGC ATC TTC GAC AAG GTG TAC ACC ACG CAG AGT GAC GTG TGG TCC
 3316
 Glu Ser Ile Phe Asp Lys Val Tyr Thr Thr Gln Ser Asp Val Trp Ser
 1085 1090 1095
 TTT GGG GTG CTT CTC TGG GAG ATC TTC TCT CTG GGG GCC TCC CCG TAC
 3364
 Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Ala Ser Pro Tyr
 1100 1105 1110 1115
 CCT GGG GTG CAG ATC AAT GAG GAG TTC TGC CAG CGG CTG AGA GAC GGC
 3412
 Pro Gly Val Gln Ile Asn Glu Glu Phe Cys Gln Arg Leu Arg Asp Gly
 1120 1125 1130
 ACA AGG ATG AGG GCC CCG GAG CTG GCC ACT CCC GCC ATA CGC CGC ATC
 3460
 Thr Arg Met Arg Ala Pro Glu Leu Ala Thr Pro Ala Ile Arg Arg Ile
 1135 1140 1145
 ATG CTG AAC TGC TGG TCC GGA GAC CCC AAG GCG AGA CCT GCA TTC TCG
 3508
 Met Leu Asn Cys Trp Ser Gly Asp Pro Lys Ala Arg Pro Ala Phe Ser
 1150 1155 1160
 GAG CTG GTG GAG ATC CTG GGG GAC CTG CTC CAG GGC AGG GGC CTG CAA
 3556
 Glu Leu Val Glu Ile Leu Gly Asp Leu Leu Gln Gly Arg Gly Leu Gln
 1165 1170 1175
 GAG GAA GAG GAG GTC TGC ATG GCC CCG CGC AGC TCT CAG AGC TCA GAA
 3604
 Glu Glu Glu Glu Val Cys Met Ala Pro Arg Ser Ser Gln Ser Ser Glu
 1180 1185 1190 1195
 GAG GGC AGC TTC TCG CAG GTG TCC ACC ATG GCC CTA CAC ATC GCC CAG
 3652
 Glu Gly Ser Phe Ser Gln Val Ser Thr Met Ala Leu His Ile Ala Gln
 1200 1205 1210
 GCT GAC GCT GAG GAC AGC CCG CCA AGC CTG CAG CGC CAC AGC CTG GCC
 3700
 Ala Asp Ala Glu Asp Ser Pro Pro Ser Leu Gln Arg His Ser Leu Ala
 1215 1220 1225

10

20

30

40

GCC AGG TAT TAC AAC TGG GTG TCC TTT CCC GGG TGC CTG GCC AGA GGG

3748

Ala Arg Tyr Tyr Asn Trp Val Ser Phe Pro Gly Cys Leu Ala Arg Gly
1230 1235 1240

GCT GAG ACC CGT GGT TCC TCC AGG ATG AAG ACA TTT GAG GAA TTC CCC

3796

Ala Glu Thr Arg Gly Ser Ser Arg Met Lys Thr Phe Glu Glu Phe Pro
1245 1250 1255

ATG ACC CCA ACG ACC TAC AAA GGC TCT GTG GAC AAC CAG ACA GAC AGT

3844

Met Thr Pro Thr Thr Tyr Lys Gly Ser Val Asp Asn Gln Thr Asp Ser
1260 1265 1270 1275

GGG ATG GTG CTG GCC TCG GAG GAG TTT GAG CAG ATA GAG AGC AGG CAT

3892

Gly Met Val Leu Ala Ser Glu Glu Phe Glu Gln Ile Glu Ser Arg His
1280 1285 1290

AGA CAA GAA AGC GGC TTC AGG TAGCTGAAGC AGAGAGAGAG AAGGCAGCAT

3943

Arg Gln Glu Ser Gly Phe Arg
1295

ACGTCAGCAT TTTCTTCTCT GCACTTATAA GAAAGATCAA AGACTTTAAG ACTTTTCGCTA

4003

TTTCTTCTAC TGCTATCTAC TACAACTTC AAAGAGGAAC CAGGAGGACA AGAGGAGCAT

4063

GAAAGTGGAC AAGGAGTGTG ACCACTGAAG CACCACAGGG AAGGGGTTAG GCCTCCGGAT

4123

GACTGCGGGC AGGCCTGGAT AATATCCAGC CTCCCACAAAG AAGCTGGTGG AGCAGAGTGT

4183

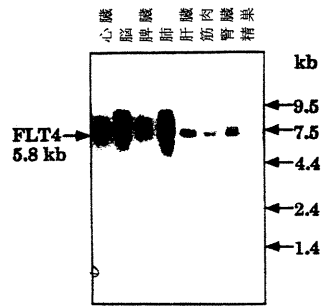
TCCCTGACTC CT

4195

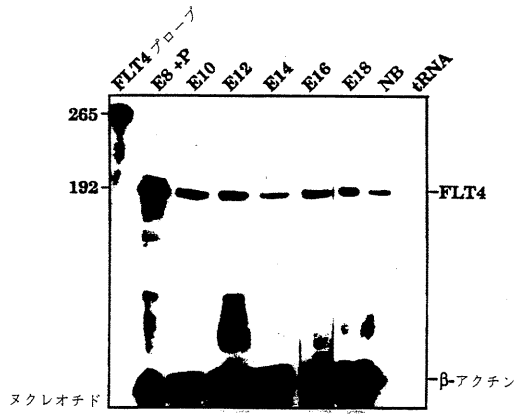
10

20

【 図 1 】



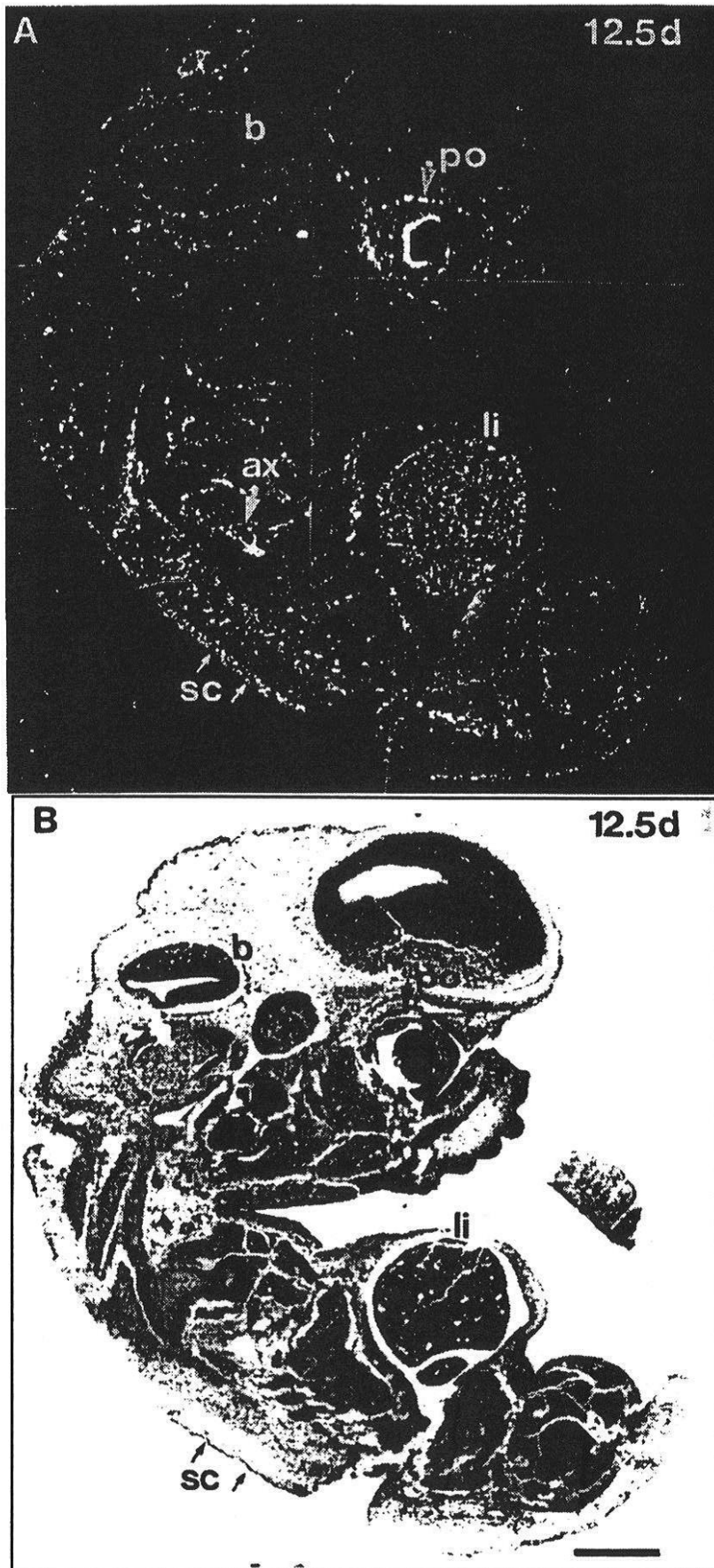
A



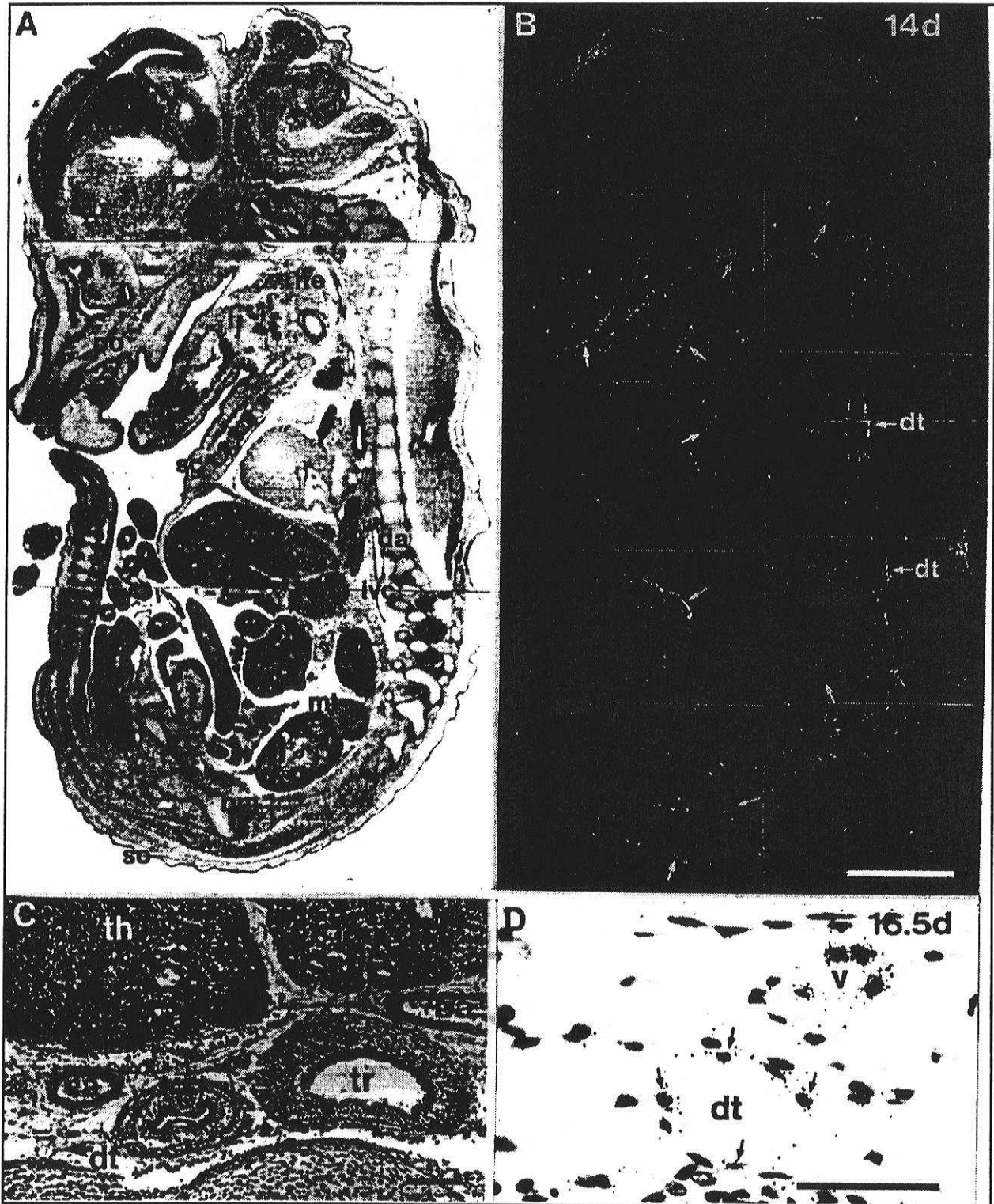
B

Figure 1 consists of nine panels (A-I) arranged in a 3x3 grid, showing the development of the chick eye. Panels A, B, and C are dark-field images at 7.5d, 8.5d, and 8.5d, respectively. Panels D, E, and F are bright-field images at 9.5d, 11.5d, and 11.5d, respectively. Panels G, H, and I are bright-field images at 9.5d, 11.5d, and 11.5d, respectively. Labels include da (dorsal area), ng (neural groove), pcv (posterior ciliary vein), al (anterior layer), ab (anterior body), vl (ventral layer), sv (subventral), mn (mesoderm), c (choroid), and flt (fertilized egg). A scale bar is present in panel I.

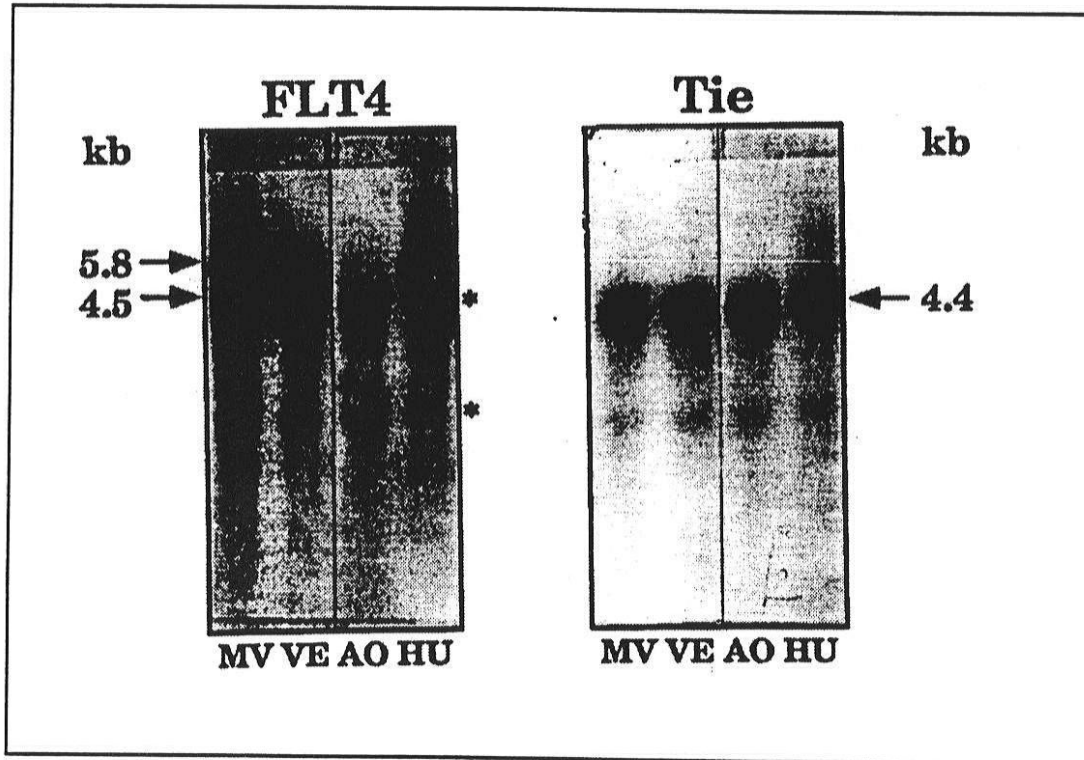
【図 3】



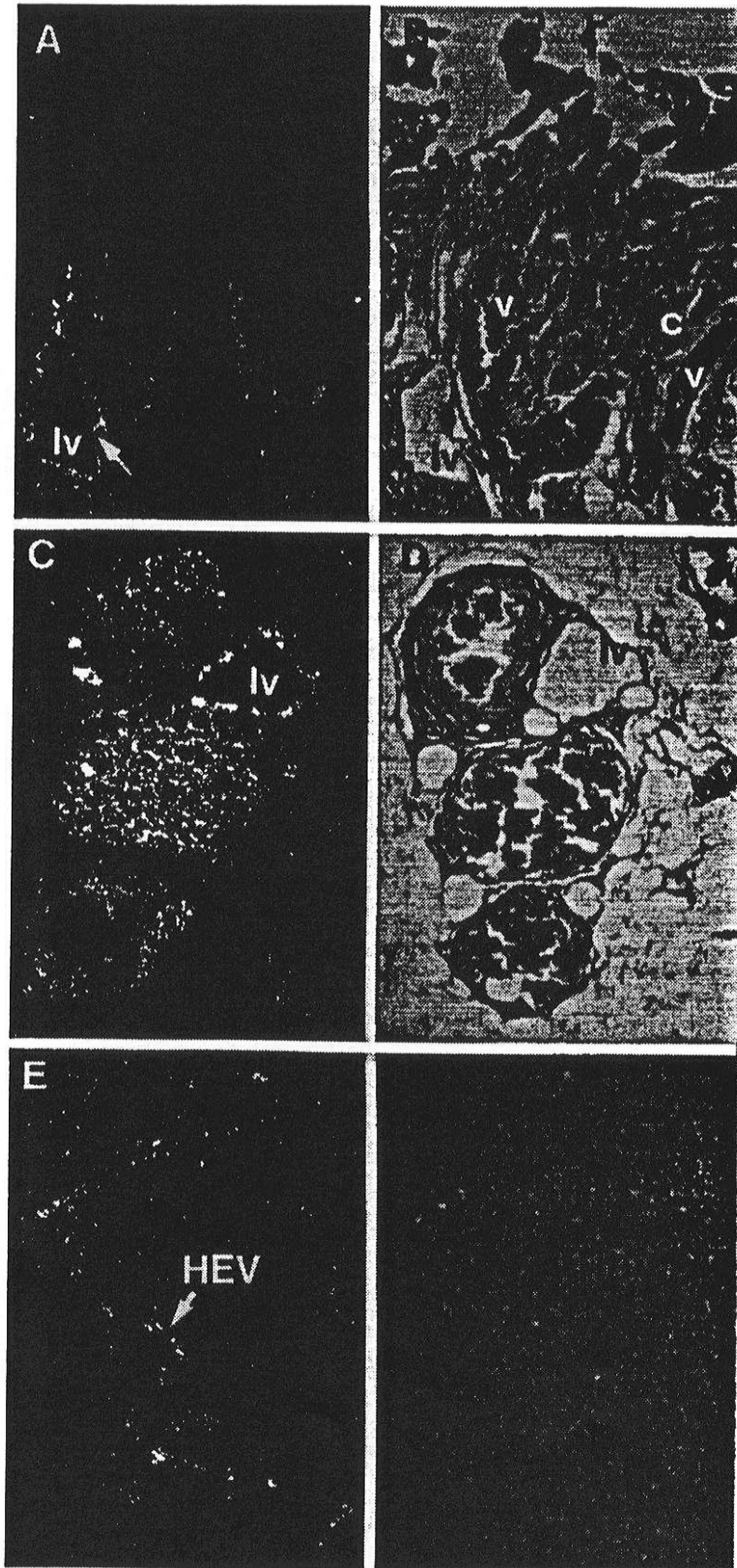
【 図 4 】



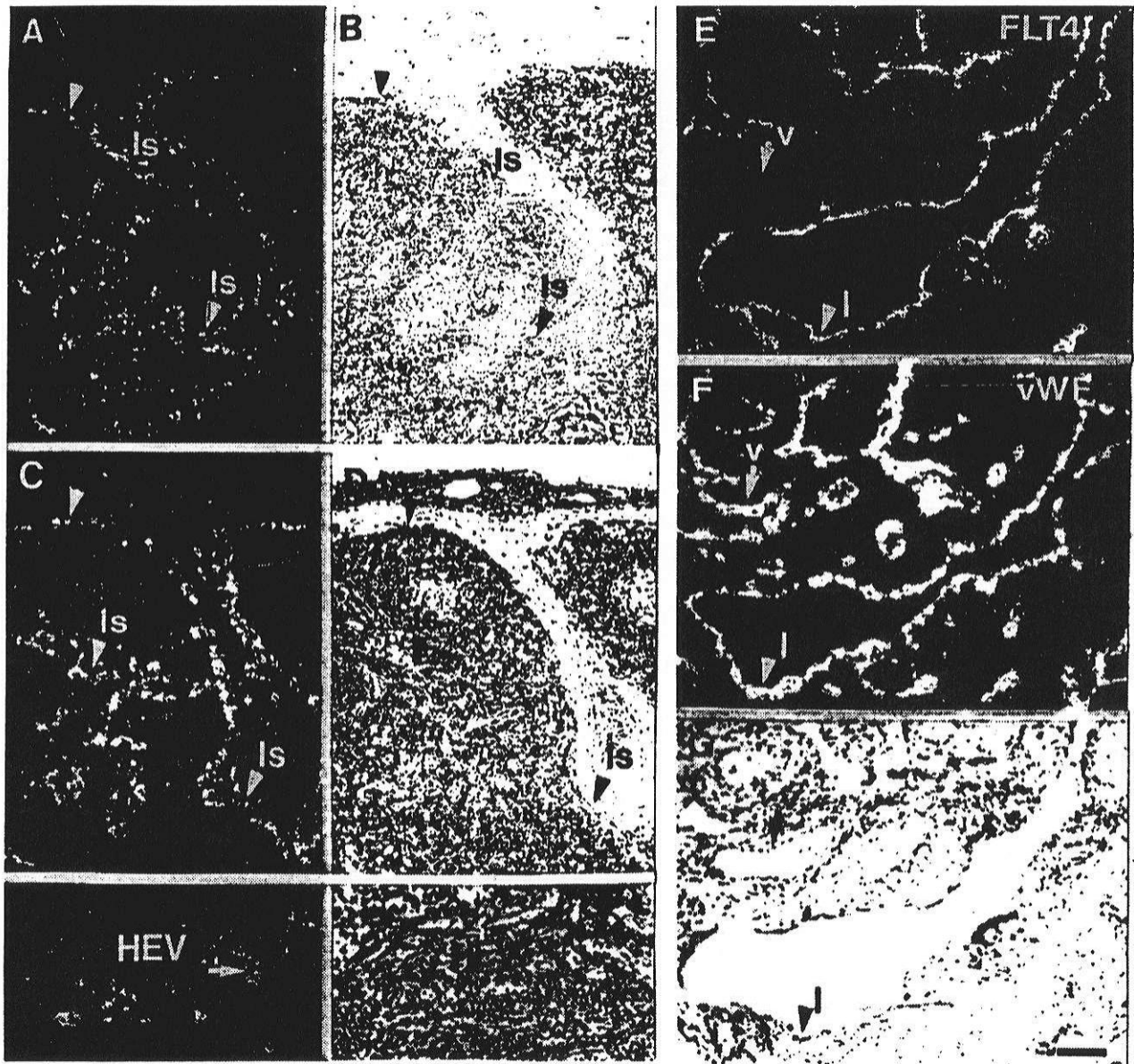
【 図 5 】



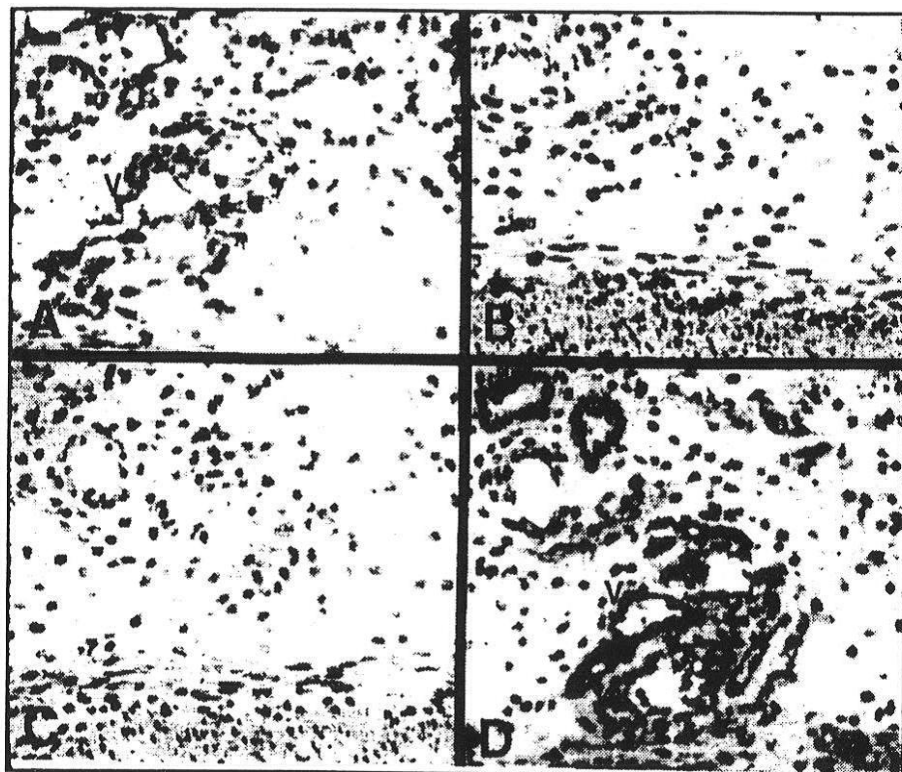
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 配列表 】

2009102415000001.app

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 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 P 37/00	
	C 0 7 K 16/28	Z N A
	C 1 2 N 15/00	A

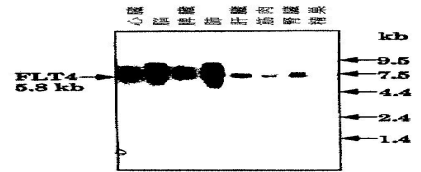
- (72)発明者 カイパイネン、アルヤ
フィンランド共和国、フィン - 0 0 2 5 0 ヘルシンキ、メッセニウクセンカツ 7 ア 9
- (72)発明者 コルホーネン、ヤーナ
フィンランド共和国、フィン - 0 0 5 3 0 ヘルシンキ、アグリコランカツ 7 セー 6 8
- (72)発明者 ムストーネン、ツイヤ
フィンランド共和国、フィン - 0 0 2 7 0 ヘルシンキ、ピハラヤーチエ 8 ア 2
- (72)発明者 パユソラ、カツリ
フィンランド共和国、フィン - 0 0 9 0 0 ヘルシンキ、カステホルマンチエ 4 ア 8
- (72)発明者 マチカイネン、マルヤ - テルツ
フィンランド共和国、フィン - 2 3 1 0 0 ミュネメキ、ランキステンタンファ 1 2
- (72)発明者 カルナーニ、ペイピ
フィンランド共和国、フィン - 2 0 3 0 0 ツルク、ムリンチエ 1 0 ベー 6 2

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 AA13 BA63 CA04 CA12 DA06 EA04 GA11
4C085 AA14 BB31 CC23 DD62 EE01 GG01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA22 EA28 EA51 EA52
FA74 GA26

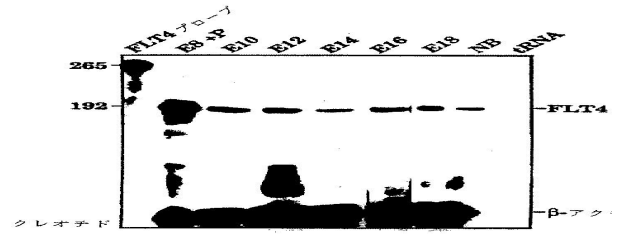
专利名称(译)	flt4受体酪氨酸激酶及其在诊断和治疗中的应用		
公开(公告)号	JP2009102415A	公开(公告)日	2009-05-14
申请号	JP2009023515	申请日	2009-02-04
[标]申请(专利权)人(译)	赫尔辛基Yuniba市牌有限公司乐团纱幸蔡氏 奥赖恩公司		
申请(专利权)人(译)	猎户座公司		
[标]发明人	アリタロカリ カイパイネンアルヤ コルホーネンヤーナ ムストーネンツイヤ パユソラカツリ マチカイネンマルヤテルツ カルナーニペイビ		
发明人	アリタロ、カリ カイパイネン、アルヤ コルホーネン、ヤーナ ムストーネン、ツイヤ パユソラ、カツリ マチカイネン、マルヤ-テルツ カルナーニ、ペイビ		
IPC分类号	A61K39/395 A61P43/00 A61P35/04 A61P35/00 A61P35/02 A61P31/00 A61P37/00 C07K16/28 C12N15/09 C12N15/02 A61K38/00 A61P29/00 A61P31/04 C07K C07K14/71 C12P21/08 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61K2039/505 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P35/02 C07K14/71 C07K16/2863		
FI分类号	A61K39/395.N A61K39/395.T A61K39/395.Q A61P43/00.111 A61P35/04 A61P35/00 A61P35/02 A61P31/00 A61P37/00 C07K16/28.ZNA C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/AA13 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4C085/AA14 4C085/BB31 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/EA52 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	08/257754 1994-06-09 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种诊断工具，用于检测淋巴组织的变化，特别是淋巴管，转移性淋巴结和炎症性疾病以及传染病和免疫性疾病等淋巴管和高内皮微静脉的变化。ŽSOLUTION：单克隆抗FLT4抗体可用作检测淋巴组织变化的诊断工具，特别是淋巴管，转移性淋巴结和炎症性疾病以及感染性和免疫性疾病等淋巴管和高内皮微静脉的变化。淋巴管内皮细胞和高内皮微静脉的特异性标志物。Ž



A



B