(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2005-502066
(P2005-502066A)
(43)公表日　平成17年1月20日(2005.1.20)

(51)Int.Cl.[7]	F I			テーマコード（参考）
G01N 33/53	G01N	33/53	ZNAY	2G045
A61K 45/00	A61K	45/00		4B024
A61K 49/00	A61K	49/00	A	4B063
A61P 1/00	A61P	1/00		4B064
A61P 7/00	A61P	7/00		4B065

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 178 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2003-527424(P2003-527424)
(86)(22)出願日　平成14年9月12日(2002.9.12)
(85)翻訳文提出日　平成16年3月12日(2004.3.12)
(86)国際出願番号　PCT/AU2002/001246
(87)国際公開番号　WO2003/023404
(87)国際公開日　平成15年3月20日(2003.3.20)
(31)優先権主張番号　PR 7618
(32)優先日　平成13年9月12日(2001.9.12)
(33)優先権主張国　オーストラリア(AU)

(71)出願人　500058017
ザ　ウォルター　アンド　エリザ　ホール　インスティテュートオブ　メディカル　リサーチ
オーストラリア国　３０５２　ヴィクトリア州，パークヴィル，ロイヤル　パレード
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100108774
弁理士　橋本　一憲
(74)代理人　100128048
弁理士　新見　浩一
(72)発明者　ビスベイダー　ジェーン　エレン
オーストラリア国　ビクトリア　キュー　ホルロイド　ストリート　１２

最終頁に続く

(54)【発明の名称】診断および治療の方法ならびにそのために有用な作用物質

(57)【要約】
本発明は一般的に、対象における、または前記対象からの生物試料における、異常細胞、より詳細には異常上皮細胞を検出するための方法、およびそのために有用な作用物質に関する。より詳細には、本発明は、異常乳房上皮細胞を検出するための方法に関する。異常細胞または異常細胞の群の存在は、特定の疾患もしくは状態があること、または疾患もしくは状態を発症する性向があることを判定する指標となる。より詳細には、本発明は、LM04タンパク質もしくは関連タンパク質の存在の相対的増加、またはLM04活性の相対的増加、またはLM04タンパク質もしくは関連タンパク質をコードする遺伝子による発現産物の存在の相対的増加を判定することによって、対象または前記対象からの生物試料における、乳癌と関連のある細胞または乳癌へと進展する性向のある細胞を検出するための方法を考えている。本発明はさらに、1個の細胞もしくは細胞の群におけるLM04もしくは関連タンパク質の上方制御、またはLM04もしくは関連タンパク質をコードする遺伝子配列の発現産物の存在の上方制御に関するスクリーニングにより、対象または前記対象からの生物試料における、癌または癌様増殖、特に乳癌の存在を診断するための方法を提供する。本発明は、LM04またはLM04をコードする遺伝物質の発現産物を検出するために有用な診断薬を提供する。このような診断薬は、LM04遺伝子の発現産物を検出するための抗体および遺伝子プローブなどの免疫相互作用性分子を含む。本発明はさらに、LM04レベルの変化を示す遺伝子改変動物も提供する。このような動物は抗癌剤のスクリーニングのための有用なモデルである。本発明はさらにまた、一般的に、LM04に関連のある細胞増殖を調節する方法、およびそのために有用な作用物質に関する。より詳細には、本発明は、LM04核酸の発現お

【特許請求の範囲】
【請求項１】
対象または対象からの生物試料における異常細胞または異常細胞の発生に対する素因を検出するための方法であって、該対象または生物試料からの細胞または細胞抽出物を、LM04またはその抗原性部分に対して特異的な免疫相互作用性分子と接触させること、および免疫相互作用性分子-LM04複合体の形成レベルに関するスクリーニングを行うことを含み、正常細胞と対比して複合体の存在量が多いことによって異常細胞が示されるような方法。
【請求項２】
対象または対象からの生物試料における異常細胞または異常細胞の発生に対する素因を検出するための方法であって、LM04をコードする遺伝子の転写産物のレベルに関するスクリーニングを行うことを含み、正常細胞のレベルと比較して発現産物のレベルが高いことによって異常細胞が示されるような方法。
【請求項３】
対象における異常細胞増殖または異常細胞増殖の発生に対する素因の存在を診断するための方法であって、対象または該対象からの生物試料からの細胞または細胞抽出物を、LM04またはその抗原決定基もしくはエピトープに対する特異性を有する抗体のLM04結合有効量と接触させること、および続いてLM04-抗体複合体のレベルを定量的または定性的に決定することを含み、正常細胞と比較した複合体のレベルの高さの存在によって異常増殖の存在が示されるような方法。
【請求項４】
対象における異常細胞増殖または異常細胞増殖の発生に対する素因の存在を診断するための方法であって、対象の細胞または該対象からの生物試料からmRNAを入手すること、および選択的にはcDNAを作製すること、ならびにmRNAまたはcDNAを、LM04をコードするヌクレオチド配列またはその相補的ヌクレオチド配列の全体または一部とハイブリダイズしうる、および／またはそれを増幅しうる遺伝子プローブと接触させること、および続いて該mRNAまたはcDNAのレベルを検出することを含み、正常対照と比較した該mRNAまたはcDNAのレベルの高さの存在によって異常増殖の存在が示されるような方法。
【請求項５】
異常細胞が新形成細胞である、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。
【請求項６】
新形成細胞が、中枢神経系腫瘍、網膜芽細胞腫、頭頸部癌、肺癌、腎臓癌、膵臓性新形成、結腸直腸癌、子宮頸癌、精巣癌、卵巣癌、リンパ腫、白血病、悪性黒色腫、神経内分泌腫瘍およびカルチノイド腫瘍を特徴づけるものである、請求項5記載の方法。
【請求項７】
新形成細胞が扁平細胞、腎細胞、島細胞、生殖細胞、乳房細胞または上皮細胞である、請求項5記載の方法。
【請求項８】
新形成細胞が乳房細胞である、請求項7記載の方法。
【請求項９】
新形成細胞が上皮細胞である、請求項7記載の方法。
【請求項１０】
LM04またはLM04と相互作用する免疫相互作用性分子である、単離された免疫相互作用性分子またはその誘導体、類似体もしくは変異体。
【請求項１１】
抗体である、請求項10記載の免疫相互作用性分子。
【請求項１２】
LM04に対するモノクローナル抗体によって認識されるエピトープに対する特異性を有する非免疫化抗体分子であって、非免疫化抗体の可変ドメインのCDRの少なくとも1つがLM04に対するモノクローナル抗体に由来し、非免疫化抗体分子の残りの免疫グロブリン由来部分が、抗体を非免疫化しようとする対象である宿主からの免疫グロブリンまたはその類似体

に由来する、抗体分子。
【請求項１３】
モノクローナル抗体である、請求項11記載の抗体。
【請求項１４】
ハイブリドーマ16H2またはその変異体もしくはバリアントによって分泌される、請求項13記載のモノクローナル抗体。
【請求項１５】
ハイブリドーマ20F8またはその変異体もしくはバリアントによって分泌される、請求項13記載のモノクローナル抗体。
【請求項１６】
ハイブリドーマ細胞系16H2またはその変異体もしくはバリアント。
【請求項１７】
ハイブリドーマ細胞系20F8またはその変異体もしくはバリアント。
【請求項１８】
免疫相互作用性分子が請求項10～15のいずれか一項記載の免疫相互作用性分子である、請求項1または3記載の方法。
【請求項１９】
LM04を検出するためのアッセイ法であって、
（i）LM04またはその抗原決定基に対して特異的なモノクローナル抗体を、LM04を含む細胞を含むことが疑われる生物試料と接触させる段階；および
（ii）段階（i）で形成された複合体をシグナル検出の段階に供する段階、
を含むアッセイ法。
【請求項２０】
抗体が請求項13～15のいずれか一項記載の抗体である、請求項17記載の方法。
【請求項２１】
ヒト患者における新形成細胞を検出するための方法であって、請求項12記載の非免疫化型の非ヒト由来モノクローナル抗体をレポーター分子で標識したものを患者に導入すること、標識抗体を循環系全体または循環系の選択された部分に散在させること、および続いて抗体の位置を同定するために該患者をレポーター分子の検出手段に供することを含む方法。
【請求項２２】
試料におけるLM04またはその断片、バリアントもしくは誘導体を検出する方法であって、試料を抗体またはその断片もしくは誘導体と接触させること、ならびに抗体およびLM04またはその断片、バリアントもしくは誘導体を含む複合体のレベルを正常対照と比較して検出することを含み、LM04のレベルが高いことによって癌の増殖が示されるような方法。
【請求項２３】
抗体が請求項11～15のいずれか一項記載の抗体である、請求項22記載の方法。
【請求項２４】
対象における異常細胞増殖の発生または進行をモニターする方法であって、対象からの生物試料におけるLM04またはLM04をコードする遺伝子の転写産物のレベルに関するスクリーニングを行うことを含み、正常細胞のレベルと比較してLM04または転写産物のレベルが高いことによって異常細胞増殖が示されるような方法。
【請求項２５】
異常細胞が新形成細胞である、請求項24記載の方法。
【請求項２６】
新形成細胞が、中枢神経系腫瘍、網膜芽細胞腫、頭頸部癌、肺癌、腎臓癌、膵臓性新形成、結腸直腸癌、子宮頸癌、精巣癌、卵巣癌、リンパ腫、白血病、悪性黒色腫、神経内分泌腫瘍およびカルチノイド腫瘍を特徴づけるものである、請求項25記載の方法。
【請求項２７】
新形成細胞が扁平細胞、腎細胞、島細胞、生殖細胞、乳房細胞または上皮細胞である、請

求項25記載の方法。
【請求項２８】
新形成細胞が乳房細胞である、請求項27記載の方法。
【請求項２９】
新形成細胞が上皮細胞である、請求項27記載の方法。
【請求項３０】
患者からの新形成細胞と疑われるものにおけるLM04の相対レベルを決定するための定量的または半定量的な診断キットの製造における、LM04に対するモノクローナル抗体の使用。
【請求項３１】
抗体が請求項13～15のいずれか一項記載の抗体である、請求項30記載の使用。
【請求項３２】
LM04調節性細胞増殖を調節する方法であって、細胞を、LM04の発現またはLM04の機能活性を調節するのに十分な時間および条件の下で作用物質の有効量と接触させることを含み、発現または活性の阻害または別の様式での拮抗によって細胞増殖が下方制御されるような方法。
【請求項３３】
哺乳動物における、異常な、不要なまたは別の様式で不適切なLM04調節性増殖細胞活性を特徴とする状態の治療および／または予防のための方法であって、LM04の発現またはLM04の機能活性を調節するのに十分な時間および条件の下で、作用物質の有効量を哺乳動物に投与することを含み、発現もしくは活性の阻害または別の様式での拮抗によって細胞増殖が下方制御されるような方法。
【請求項３４】
細胞が新形成細胞である、請求項32または33のいずれか一項記載の方法。
【請求項３５】
新形成細胞が、中枢神経系腫瘍、網膜芽細胞腫、頭頸部癌、肺癌、腎臓癌、膵臓性新形成、結腸直腸癌、子宮頸癌、精巣癌、卵巣癌、リンパ腫、白血病、悪性黒色腫、神経内分泌腫瘍およびカルチノイド腫瘍を特徴づけるものである、請求項34記載の方法。
【請求項３６】
新形成細胞が扁平細胞、腎細胞、島細胞、生殖細胞、乳房細胞または上皮細胞である、請求項34記載の方法。
【請求項３７】
新形成細胞が乳房細胞である、請求項36記載の方法。
【請求項３８】
新形成細胞が上皮細胞である、請求項36記載の方法。
【請求項３９】
LM04の発現またはLM04の機能活性を調節しうる作用物質を検出するための方法であって、LM04またはLM04を含む細胞またはその抽出物を作用物質と推定されるものと接触させること、および相互作用に伴う発現表現型の変化を検出することを含む方法。
【請求項４０】
異常な、不要なまたは別の様式で不適切なLM04調節性細胞増殖を特徴とする状態である、哺乳動物における状態の治療のための医薬品の製造における作用物質の使用であって、作用物質がLM04の発現またはLM04の活性を調節し、発現または活性の阻害または別の様式での拮抗によって細胞増殖が下方制御されるような使用。
【請求項４１】
細胞が新形成細胞である、請求項40記載の使用。
【請求項４２】
新形成細胞が、中枢神経系腫瘍、網膜芽細胞腫、頭頸部癌、肺癌、腎臓癌、膵臓性新形成、結腸直腸癌、子宮頸癌、精巣癌、卵巣癌、リンパ腫、白血病、悪性黒色腫、神経内分泌腫瘍およびカルチノイド腫瘍を特徴づけるものである、請求項41記載の使用。
【請求項４３】

新形成細胞が扁平細胞、腎細胞、島細胞、生殖細胞、乳房細胞または上皮細胞である、請求項41記載の使用。
【請求項４４】
新形成細胞が乳房細胞である、請求項43記載の方法。
【請求項４５】
新形成細胞が上皮細胞である、請求項43記載の方法。
【請求項４６】
請求項40に従って同定された作用物質。
【請求項４７】
請求項39に従って同定された調節性物質を、1つまたは複数の薬学的に許容される担体および／または希釈剤とともに含む、薬学的組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
発明の分野
本発明は一般的に、対象における、または前記対象からの生物試料における、異常細胞、より詳細には異常上皮細胞を検出するための方法、およびそのために有用な作用物質（agent）に関する。より詳細には、本発明は、異常乳房上皮細胞を検出するための方法に関する。異常細胞または異常細胞の群の存在は、特定の疾患もしくは状態があること、または疾患もしくは状態を発症する性向があることを判定する指標となる。より詳細には、本発明は、LM04タンパク質もしくは関連タンパク質の存在の相対的増加、またはLM04活性の相対的増加、またはLM04タンパク質もしくは関連タンパク質をコードする遺伝子による発現産物の存在の相対的増加を判定することによって、対象または前記対象からの生物試料における、乳癌と関連のある細胞または乳癌へと進展する性向のある細胞を検出するための方法を考えている。本発明はさらに、1個の細胞もしくは細胞の群におけるLM04もしくは関連タンパク質の上方制御、またはLM04もしくは関連タンパク質をコードする遺伝子配列の発現産物の存在の上方制御に関するスクリーニングにより、対象または前記対象からの生物試料における、癌または癌性増殖、特に乳癌の存在を診断するための方法を提供する。本発明は、LM04またはLM04をコードする遺伝物質の発現産物を検出するために有用な診断薬を提供する。このような診断薬は、LM04遺伝子の発現産物を検出するための抗体および遺伝子プローブなどの免疫相互作用性分子を含む。本発明はさらに、LM04レベルの変化を示す遺伝子改変動物も提供する。このような動物は抗癌剤のスクリーニングのためのモデルとして有用である。
【０００２】
本発明はさらにまた、一般的に、LM04に関連のある細胞増殖を調節する方法、およびそのために有用な作用物質に関する。より詳細には、本発明は、LM04核酸の発現および／またはLM04の機能を調節することによって乳房細胞の増殖を調節する方法を考えている。本発明の方法は特に、異常な、不要なまたは別の様式で不適切なLM04調節性細胞増殖（LM04 regulated cellular prolification）を特徴とする状態の治療および／または予防に有用である。本発明はさらに、LM04調節性細胞増殖を調節しうる作用物質を同定および／または設計するための方法を対象とする。
【背景技術】
【０００３】
発明の背景
本明細書中に著者および数字の両方によって言及した刊行物の書誌的詳細は、本明細書の末尾に収録してある。
【０００４】
本明細書におけるいずれの先行技術についての言及も、その先行技術がオーストラリアにおける一般的常識の一部をなしているという認識でもいかなる形式での示唆でもなく、そのように解釈されるべきでもない。

【０００５】
LIMドメインは、縦列反復した2つのジンクフィンガーを含む保存されたシステインリッチ構造の範囲を規定しており、数多くの多様なタンパク質に認められる（1、2に総説がある）。このモチーフはLIM-ホメオドメイン転写因子内で最初に同定され、単独で存在することもあれば（1つまたは複数のコピーとして）、プロテインキナーゼまたはホメオボックスドメインなどの異種ドメインを伴って存在することもある。標的遺伝子破壊により、LIMドメインを含むタンパク質が細胞運命の指定および分化に決定的な機能を果たすことが実証されている（3）。
【０００６】
LMOファミリーは4つのメンバー（LMO1～4と命名）からなり、これらはそれぞれ縦列性の2つのLIMドメインを含む。LMO2は胚の造血に不可欠であり、多能性幹細胞のレベルで作用すると考えられている（11）。LMO3は配列相同性に基づいて発見されたが、その機能はほとんどわかっていない。最も最近になって報告されたメンバーであるLMO4は、Ldb1／NL1／CLIMとの相互作用により、自己血清を用いた発現スクリーニングで単離された（12～15）。Ldb1はLMOタンパク質および他の核内LIM含有エレメントと相互作用する多機能アダプタータンパク質である（16～19）。LMO4遺伝子は胚組織および成体組織でともに広く発現される（12、13、15）。このファミリーの他のメンバーと同じく、LMO4は他の因子のドッキング部位として主に働く転写補助因子であると推定される。LMO4はまた、活性化ドメインまたは抑制ドメインが転写活性に影響を及ぼす一因である可能性もある。
【０００７】
本発明に至る研究において、本発明者らはLMO4が乳房発生および乳房の発癌において役割を果たすことを明らかにした。LMO4遺伝子は乳房上皮において発生段階に伴う調節を受けており、LMO4はLdb1とともに乳房上皮分化の負の調節因子として作用することがわかっている。重要なこととして、LMO4遺伝子の過剰発現が原発性乳癌の50％を超える割合に認められており、これはこのタンパク質が乳癌の発生に寄与することを示している。
【発明の開示】
【０００８】
発明の概要
本明細書およびそれに続く特許請求の範囲の全体を通じて、文脈が別のものを要求しない限り、「含む（comprise）」という用語、ならびに「含む（comprises）」および「含む（comprising）」などの変形物は、言及した整数もしくは段階または整数もしくは段階の群を含むものの、他の整数もしくは段階または整数もしくは段階の群を除外しないことを意味するものと解釈される。
【０００９】
本明細書は、プログラムパテントイン・バージョン3（PatentIn Version 3.0）を用いて作成したヌクレオチド配列情報を、本明細書中の参照文献目録の後に提示する形で含んでいる。各ヌクレオチド配列は、配列表において、数字表示<210>とその後ろに続く配列識別子（例えば、<210>1、<210>2など）によって識別される。各ヌクレオチド配列に関する配列の長さ、配列の種類（DNAなど）および起源生物はそれぞれ、数字表示欄<211>、<212>および<213>に記載された情報によって示される。本明細書中に言及するヌクレオチド配列は、配列番号：という表示とその後ろに続く配列識別子によって識別される（例えば、配列番号：1、配列番号：2など）。本明細書中に言及する配列識別子は、配列表における数字表示欄<400>とその後ろに続く配列識別子（例えば、<400>1、<400>2など）に提示された情報と相関している。すなわち、明細書中に列挙された配列番号：1は、配列表に<400>1として示された配列と相関している。
【００１０】
本発明の1つの局面は、対象または前記対象からの生物試料における異常細胞を検出するための方法であって、前記対象または前記対象からの細胞または細胞抽出物を、LMO4またはその抗原性部分に対して特異的な免疫相互作用性分子と接触させること、および免疫相互作用性分子-LMO4複合体の形成レベルに関するスクリーニングを行うことを含み、正常

細胞と対比して前記複合体の存在量が多いことによって異常細胞が示されるような方法を考えている。

【００１１】

本発明のもう1つの局面は、対象または前記対象からの生物試料における異常上皮細胞を検出するための方法であって、前記対象または前記対象からの乳房細胞または乳房細胞抽出物をLM04またはその抗原性部分に対して特異的な免疫相互作用性分子と接触させること、および免疫相互作用性分子-LM04複合体の形成レベルに関するスクリーニングを行うことを含み、正常上皮細胞と対比して前記複合体の存在量が多いことによって異常上皮細胞が示されるような方法を考えている。

【００１２】

本発明のさらにもう1つの局面は、対象または前記対象からの生物試料における異常乳房細胞を検出するための方法であって、前記対象または前記対象からの乳房細胞または乳房細胞抽出物をLM04またはその抗原性部分に対して特異的な免疫相互作用性分子と接触させること、および免疫相互作用性分子-LM04複合体の形成レベルに関するスクリーニングを行うことを含み、正常乳房細胞と対比して前記複合体の存在量が多いことによって異常乳房細胞が示されるような方法を考えている。

【００１３】

1つの関連した局面において、本発明は、対象または前記対象からの生物試料における異常細胞を検出するための方法であって、LM04をコードする遺伝子の転写産物のレベルに関するスクリーニングを行うことを含み、正常細胞と比較して前記発現産物のレベルが高いことによって異常細胞が示されるような方法を提供する。

【００１４】

もう1つの局面においては、対象または前記対象からの生物試料における異常上皮細胞を検出するための方法であって、LM04をコードする遺伝子の転写産物のレベルに関するスクリーニングを行うことを含み、正常上皮細胞と比較して前記発現産物のレベルが高いことによって異常上皮細胞が示されるような方法が提供される。

【００１５】

さらにもう1つの局面においては、対象または前記対象からの生物試料における異常乳房細胞を検出するための方法であって、LM04をコードする遺伝子の転写産物のレベルに関するスクリーニングを行うことを含み、正常乳房細胞と比較して前記発現産物のレベルが高いことによって異常乳房細胞が示されるような方法が提供される。

【００１６】

本発明のさらにまたもう1つの局面は、対象における新生物または新生物様増殖の存在を診断するための方法であって、前記対象または前記対象からの生物試料からの細胞または細胞抽出物を前記LM04またはその抗原決定基もしくはエピトープに対する特異性を有する抗体のLM04結合有効量を接触させること、および続いてLM04-抗体複合体のレベルを定量的または定性的に決定することを含み、正常細胞と比較した前記複合体のレベルの高さの存在によって新生物の存在が示されるような方法を考えている。

【００１７】

本発明のさらにまたもう1つの局面は、対象における新生物の存在を診断するための方法であって、前記対象の細胞または前記対象からの生物試料からmRNAを入手すること、および選択的にはcDNAを作製すること、ならびに前記mRNAまたはcDNAを、LM04をコードするヌクレオチド配列またはその相補的ヌクレオチド配列の全体または一部とハイブリダイズしうる、および／またはそれを増幅しうる遺伝子プローブと接触させること、および続いて前記mRNAまたはcDNAのレベルを検出することを含み、正常対照と比較した前記mRNAまたはcDNAのレベルの高さの存在によって新生物の存在が示されるような方法を提供する。

【００１８】

本発明のさらにもう1つの局面は、LM04に関する免疫学的アッセイ法のため、またはインビボでの癌の画像化のための抗体、特にモノクローナル抗体を提供する。抗体は例えば、LM04タンパク質またはLM04 mRNAのいずれを標的としてもよい。

【００１９】
もう1つの局面において、本抗体は16H2または20F8、またはそれらの誘導体、相同体、類似体、化学的等価物、変異体もしくは模倣物である。
【００２０】
本発明のさらにまたもう1つの局面は、LM04に対するモノクローナル抗体によって認識されるエピトープに対する特異性を有する、非免疫化（deimmunized）抗体分子であって、前記非免疫化抗体の可変ドメインのCDRのうち少なくとも1つが前記LM04に対するモノクローナル抗体に由来し、非免疫化抗体分子の残りの免疫グロブリン由来部分が、抗体を非免疫化しようとする対象である宿主からの免疫グロブリンまたはその類似体に由来する、抗体分子を考えている。
【００２１】
本発明のさらにもう1つの局面は、LM04を検出するためのアッセイ法であって、
（1）LM04またはその抗原決定基に対して特異的なモノクローナル抗体を、前記LM04を含む細胞を含むことが疑われる生物試料と接触させる段階；および
（2）段階（1）で形成された複合体をシグナル検出の段階に供する段階、
を含むアッセイ法を考えている。
【００２２】
本発明のもう1つの局面は、ヒト患者における新形成細胞（neoplastic cell）を検出するための方法であって、ヒトLM04またはその抗原決定基に対して特異的な非免疫化型の非ヒト由来モノクローナル抗体をレポーター分子で標識したものを前記患者に導入すること、標識抗体を循環系全体または循環系の選択された部分に散在させること、および続いて抗体の位置を同定するために前記患者をレポーター分子の検出手段に供することを含む方法を考えている。
【００２３】
本発明のさらにもう1つの局面は、試料におけるLM04またはその断片、バリアントもしくは誘導体を検出する方法であって、試料を抗体またはその断片もしくは誘導体と接触させること、ならびに前記抗体およびLM04またはその断片、バリアントもしくは誘導体を含む複合体のレベルを正常対照と比較して検出することを含み、LM04のレベルが高いことによって癌の増殖が示されるような方法を提供する。
【００２４】
本発明のさらにもう1つの局面は、対象における新生物の発生または進行をモニターする方法であって、前記対象からの生物試料におけるLM04またはLM04をコードする遺伝子の転写産物のレベルに関するスクリーニングを行うことを含み、正常細胞のレベルと比較して前記LM04または転写産物のレベルが高いことによって新生物が示されるような方法を提供する。
【００２５】
本発明のさらにまたもう1つの局面は、患者からの新形成細胞と疑われるものにおけるLM04の相対レベルを決定するための定量的または半定量的な診断キットの製造における、LM04に対するモノクローナル抗体の使用を考えている。
【００２６】
本発明のさらにまたもう1つの局面は、LM04調節性細胞増殖を調節する方法であって、前記細胞を、LM04の発現またはLM04の機能活性を調節するのに十分な時間および条件の下で作用物質の有効量と接触させることを含み、前記発現または活性の阻害または別の様式での拮抗によって前記細胞増殖が下方制御されるような方法を提供する。
【００２７】
本発明は、より詳細には、LM04調節性乳房細胞増殖を調節する方法であって、前記細胞を、LM04の発現またはLM04の機能活性を調節するのに十分な時間および条件の下で作用物質の有効量と接触させることを含み、前記発現または活性の阻害または別の様式での拮抗によって前記細胞増殖が下方制御されるような方法を提供する。
【００２８】

本発明のさらにもう1つの局面は、LM04の発現またはLM04の機能活性を調節しうる作用物質を検出するための方法であって、前記LM04またはLM04を含む細胞またはその抽出物を作用物質と推定されるものと接触させること、および前記相互作用に伴う発現表現型の変化を検出することを含む方法を提供する。

【００２９】

本発明のさらにもう1つの局面は、哺乳動物における、異常な、不要なまたは別の様式で不適切なLM04調節性増殖活性を特徴とする状態の治療および／または予防のための方法であって、LM04の発現またはLM04の機能活性を調節するのに十分な時間および条件の下で、作用物質の有効量を前記哺乳動物に投与することを含み、前記発現または活性の阻害または別の様式での拮抗によって前記細胞増殖が下方制御されるような方法を対象とする。

【００３０】

さらにまたもう1つの局面においては、腫瘍性状態の治療および／または予防のための方法であって、LM04の発現またはLM04の機能活性を下方制御するのに十分な時間および条件の下で作用物質の有効量を前記哺乳動物に投与することを含み、前記発現または活性の阻害または別の様式での拮抗によって細胞増殖が下方制御されるような方法が提供される。

【００３１】

本発明のさらにまたもう1つの局面は、異常な、不要なまたは別の様式で不適切なLM04調節性細胞増殖を特徴とする状態である、哺乳動物における状態の治療のための医薬品の製造における、本明細書中に以前に定義した作用物質の使用であって、前記作用物質がLM04の発現またはLM04の活性を調節し、前記発現または活性の阻害または別の様式での拮抗によって前記細胞増殖が下方制御されるような使用を考えている。

【００３２】

さらにまたもう1つの局面において、本発明は、本明細書中に以前に定義した調節性物質を、1つまたは複数の薬学的に許容される担体および／または希釈剤とともに含む、薬学的組成物を考えている。前記作用物質は活性成分と呼ばれる。

【００３３】

本発明のさらにもう1つの局面は、本発明の方法に用いる場合の、本明細書中に以前に定義した作用物質に関する。

【００３４】

発明の詳細な説明

本発明は、一部には、癌細胞、特に上皮癌細胞、最も具体的には乳癌細胞において、正常乳房細胞と対比してLM04発現が上方制御されているという判定所見を根拠に置く。この癌特異的マーカーの同定により、癌造影剤および治療的に有用な癌標的指向性薬剤（cancer targeting agent）を含むさまざまな診断薬の開発が可能になる。これらの判定所見により、異常なまたは不要なLM04調節性増殖を特徴とするものなどの状態を治療するための治療的および／または予防的方法の合理的設計も可能になる。

【００３５】

したがって、本発明の1つの局面は、対象または前記対象からの生物試料における異常細胞を検出するための方法であって、前記対象または前記対象からの細胞または細胞抽出物を、LM04またはその抗原性部分に対して特異的な免疫相互作用性分子と接触させること、および免疫相互作用性分子-LM04複合体の形成レベルに関するスクリーニングを行うことを含み、正常細胞との対比による前記複合体の存在の増加によって異常細胞が示されるような方法を考えている。

【００３６】

「異常」細胞に対する言及は、望ましくない、不要なまたは別の様式で不適切な機能活性を示す細胞に対する言及として解釈される必要がある。本機能活性は不適切な増殖または分化であることが好ましい。最も好ましくは、不適切な機能活性は、例えば新形成細胞によって示されるような不適切な増殖である。

【００３７】

「新生物（neoplasm）」に対する言及は、新形成細胞を含む、病変、腫瘍または他の被包

性もしくは非被包性の塊または他の形態の増殖物に対する言及と解釈される必要がある。「新形成細胞」は、異常な増殖を示す細胞に対する言及と解釈される必要がある。「増殖（growth）」という用語はその最も広義に解釈される必要があり、これには増殖（proliferation）が含まれる。この点に関して、異常な細胞増殖（cell growth）の例は、細胞の無秩序な増殖（proliferation）である。新形成細胞は良性細胞でも悪性細胞でもよい。本新形成細胞は上皮細胞または非上皮細胞などの任意の細胞種でよい。

【００３８】

「新形成（neoplasia）」という用語の一般的な医学的意味は、正常な増殖制御に対する応答性の欠如に起因する「新生細胞増殖」のこと、例えば新形成細胞増殖のことを指す。「過形成」とは、異常に急速に増殖している細胞のことを指す。しかし、本明細書で用いる場合、「新形成」および「過形成」という用語は互換的に用いることができ、異常な細胞増殖速度を呈する細胞を全般的に指す。新形成および過形成には「腫瘍（tumor）」が含まれ、これは良性、前癌性または悪性のいずれでもよい。

【００３９】

本明細書で用いる場合、「過剰増殖性」および「新形成性」という用語は互換的に用いられ、急速増殖または新生物を特徴とする異常な状況または状態にある細胞のことを指す。これらの用語には、組織病理学的な型および浸潤性の状態にかかわらず、あらゆる種類の癌性増殖または発癌過程、転移性組織または悪性転換した細胞、組織もしくは臓器が含まれるものとする。「病的な過剰増殖性」細胞は、悪性腫瘍増殖を特徴とする疾病状態でみられる。

【００４０】

「癌腫（carcinoma）」という用語は当業者に認識されており、呼吸器系癌、消化器系癌、泌尿生殖器系癌、精巣癌、乳癌、前立腺癌、内分泌系癌および黒色腫を含む、上皮組織または内分泌組織の悪性腫瘍のことを指す。癌腫の例には、乳房組織から形成されるものが含まれる。この用語には癌肉腫も含まれ、これには例えば、癌性および肉腫性の組織から構成される悪性腫瘍が含まれる。「腺癌」とは、腺組織に由来する癌腫、または腫瘍細胞が認識しうる腺構造を形成する癌腫のことを指す。

【００４１】

本明細書中に以前に詳述したように、「新生物」という用語は、本明細書で用いる場合、この前の3つの段落で考察した用語のすべてを含む。

【００４２】

本発明に含まれる新生物および新形成細胞の例には、中枢神経系腫瘍、網膜芽細胞種、頭頸部癌（例えば、扁平細胞癌）、肺癌（小細胞肺癌および非小細胞肺癌の両方）、腎臓癌（例えば、腎細胞腺癌）、膵臓性新形成（例えば、腺癌および島細胞腫瘍）、結腸直腸癌、子宮頸癌、精巣癌（例えば、生殖細胞腫瘍）、卵巣癌（例えば、卵巣上皮癌および卵巣生殖細胞腫瘍）、リンパ腫、白血病、悪性黒色腫、神経内分泌腫瘍およびカルチノイド腫瘍が非制限的に含まれる。

【００４３】

1つの好ましい態様において、本異常細胞は上皮細胞である。

【００４４】

「上皮細胞」に対する言及は、上皮を形成することができ、しかも内胚葉または外胚葉のいずれかに由来する細胞種に対する言及と解釈される必要がある。上皮はシートを形成する密に充填された細胞からなり、一般に細胞間物質はほとんど含まれない。上皮細胞の種類はさまざまであり、このため、扁平上皮、立方上皮、柱状上皮および線毛上皮を含むさまざまな種類の上皮が生じる。上皮組織には主に3つの種類があり、これらは被覆／裏打ち上皮（これは一般に、身体の外表面、ならびに消化管および気道などの内腔壁を覆う膜を形成する）、腺上皮および感覚上皮（これは感覚器の部分を形成しうる上皮である）である。「上皮細胞」という語句も、上皮細胞の形態、表現型および／または機能活性の1つまたは複数を示す細胞に対する言及、ならびにそれらの変異体またはバリアントに対する言及と解釈される必要がある。「バリアント」には、発生のいずれかの分化段階で上皮

細胞の形態的もしくは表現型上の特徴または機能活性の一部（すべてではない）を示す細胞が非制限的に含まれる。「変異体」には、遺伝子改変がなされた細胞などの、天然または非天然に改変された上皮細胞が非制限的に含まれる。

【００４５】

また、本発明の細胞は発生の任意の分化段階にあってよいことも理解される必要がある。したがって、これらの細胞は未熟であり、このためさらに分化しなければ機能的な能力はない。この点に関して、上皮細胞または乳房細胞などの特定の細胞種に分化する能力を保っている幹細胞などの高度に未熟な細胞は、特定の条件下でこれらの細胞種に分化する能力があるため、本明細書で用いる場合には「上皮細胞」または「乳房細胞」の定義をやはり満たすと解釈される必要がある。

【００４６】

したがって、1つの好ましい態様において本発明は、対象または前記対象からの生物試料における異常上皮細胞を検出するための方法であって、前記対象または前記対象からの乳房細胞または乳房細胞抽出物を、LM04またはその抗原性部分に対して特異的な免疫相互作用性分子と接触させること、および免疫相互作用性分子-LM04複合体の形成レベルに関するスクリーニングを行うことを含み、正常上皮細胞との対比による前記複合体の存在の増加によって異常上皮細胞が示されるような方法を考えている。

【００４７】

もう1つの好ましい態様において、本異常細胞は乳房細胞である。

【００４８】

本発明を何らかの1つの理論または作用機序に限定するわけではないが、乳腺は年齢、月経周期および生殖状態によって変化する構造的に動的な器官である。これは分泌性腺房を認める分枝性の管状胞状腺であり、腺房は内小葉によってまとまって葉内導管へと流れ込み、これはさらに小葉間導管へと流れ込む。小葉は15～20個の葉（lobe）へと組織化され、これらはそれぞれ別々の乳管洞に流れ込み、さらにそこから乳管へと流れ込む。小葉内基質は疎性結合組織からなり、これには小葉上皮の構成要素を取り囲むホルモン感受性線維芽細胞の帯域がある。これらは形態形成および分化過程における上皮／基底膜／基質誘導性相互作用に関与すると考えられている。乳腺は個体のさまざまなライフサイクル段階で独特な分化性および増殖性の発生を行う。したがって、乳房細胞に対する言及は、思春期前、思春期、出生前、出生後／授乳期および閉経後の段階を含む、その発生の任意の段階にある乳腺を含む上皮細胞に対する言及であると解釈される必要がある。この点に関して、目的の上皮細胞の任意の所定の集団は、乳汁分泌を促進する目的で妊娠期間中に生じるもののように、乳腺に一過性にのみ存在してもよい。

【００４９】

したがって、もう1つの好ましい態様において、本発明は、対象または前記対象からの生物試料における異常乳房細胞を検出するための方法であって、前記対象または前記対象からの乳房細胞または乳房細胞抽出物を、LM04またはその抗原性部分に対して特異的な免疫相互作用性分子と接触させること、および免疫相互作用性分子-LM04複合体の形成レベルに関するスクリーニングを行うことを含み、正常乳房細胞との対比による前記複合体の存在の増加によって異常乳房細胞が示されるような方法を考えている。

【００５０】

本明細書における「乳房」細胞または組織に対する言及は、上皮性および非上皮性の細胞組織のいずれにも及ぶと解釈される必要がある。このような組織には、乳房上皮細胞、間質細胞、乳管、膨大部、腺組織、乳輪および乳頭が非制限的に含まれる。乳腺はしばしば、ヒトにおける「乳房」などの代替的な用語によって呼ばれる。「乳房の（mammary）」および「乳房（breast）」という用語は互換的に用いられる。「乳房細胞」に対する言及は、上皮細胞全般に関して本明細書中に以前に定義したものと同じ文脈で、前記乳房細胞のバリアントおよび変異体にも及ぶと解釈される必要がある。

【００５１】

1つの関連した局面において、本発明は、対象または前記対象からの生物試料における異

常細胞を検出するための方法であって、LM04をコードする遺伝子の転写産物のレベルに関するスクリーニングを行うことを含み、正常細胞と比較して前記発現産物のレベルが高いことによって異常細胞が示されるような方法を提供する。

【００５２】

前記異常細胞は、中枢神経系腫瘍、網膜芽細胞種、頭頸部癌（例えば、扁平細胞癌）、肺癌（小細胞肺癌および非小細胞肺癌の両方）、腎臓癌（例えば、腎細胞腺癌）、膵臓性新形成（例えば、腺癌および島細胞腫瘍）、結腸直腸癌、子宮頸癌、精巣癌（例えば、生殖細胞腫瘍）、卵巣癌（例えば、卵巣上皮癌および卵巣生殖細胞腫瘍）、リンパ腫、白血病、悪性黒色腫、神経内分泌腫瘍およびカルチノイド腫瘍に特徴的なものであることが好ましい。

【００５３】

もう1つの好ましい態様においては、対象または前記対象からの生物試料における異常上皮細胞を検出するための方法であって、LM04をコードする遺伝子の転写産物のレベルに関するスクリーニングを行うことを含み、正常上皮細胞と比較して前記発現産物のレベルが高いことによって異常上皮細胞が示されるような方法が提供される。

【００５４】

さらにもう1つの局面においては、対象または前記対象からの生物試料における異常乳房細胞を検出するための方法であって、LM04をコードする遺伝子の転写産物のレベルに関するスクリーニングを行うことを含み、正常乳房細胞と比較して前記発現産物のレベルが高いことによって異常乳房細胞が示されるような方法が提供される。

【００５５】

「生物試料」に対する言及は、個体に由来する生物材料、例えば、非制限的には粘液、便、尿、血液、血清、細胞抽出物、生検標本、および、例えば肺洗浄後に肺から取り出した食塩液または注腸洗浄によって回収した溶液のように個体の体内に導入された後に採取した液体などの、任意の試料に対する言及と解釈される必要がある。本発明の方法に従って検査される生物材料は直接検査してもよく、または検査の前に何らかの形態の処理を必要としてもよい。例えば、生検試料は検査の前にホモジネート化または切片化を必要とすることがある。または、試料が核酸材料を露出させるための処理を必要とすることもある。

【００５６】

「正常」細胞に対する言及は、異常とも癌性ともみなされない細胞を含み、これを正常な細胞種の「平均」と考えることもできる。

【００５７】

「免疫相互作用性分子」とは、LM04またはその抗原性部分もしくは誘導体に対する特異性および結合親和性を有する任意の分子のことである。好ましい免疫相互作用性分子は免疫グロブリン分子であるが、本発明は、抗体断片、一本鎖抗体、ヒト化抗体を含む非免疫化抗体およびT細胞関連抗原結合分子（TABM）などの他の免疫相互作用性分子に対しても適用される。最も好ましくは、免疫相互作用性分子は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体などの抗体である。本免疫相互作用性分子は何らかの他のタンパク質性もしくは非タンパク質性の分子または細胞に制約、結合または別の様式で会合していてもよいことが理解される必要がある。最も好ましくは、抗体はモノクローナル抗体である。

【００５８】

免疫相互作用性分子は、LM04、またはより詳細にはLM04の抗原決定基またはエピトープに対する特異性を示す。LM04の抗原決定基またはエピトープは、免疫応答を誘発しうる対象となる、この分子の部分を含む。抗原決定基またはエピトープはB細胞エピトープでもよく、または必要に応じてT細胞受容体結合分子であってもよい。「抗原性部分」という用語には抗原決定基またはエピトープが含まれる。

【００５９】

「転写産物」は一般にmRNAであるが、本発明はmRNA分子の全体または部分から逆転写されたcDNAに対しても適用されることが理解される必要がある。転写産物の量はLM04遺伝子の発現レベルの指標となり、このため、LM04の存在に関する間接的な証拠となる。mRNAまた

はcDNAのプールを入手すること、または全mRNAを含む細胞抽出物、およびLM04遺伝子特異的なmRNAまたはcDNAの全体または部分に対して相補的な遺伝子プローブを入手することが好都合である。その後のプローブの結合は定量的でも半定量的でもよい。

【００６０】

本明細書におけるLM04に対する言及は、すべての形態のLM04またはその相同体もしくは誘導体に対する言及を含む。「LM04」に対する言及は、LM04 mRNAの選択的スプライシングによって生じる任意のアイソフォーム、またはLM04の変異体もしくは多型バリアントに対する言及を含むと解釈される必要がある。また、これは、当該分子が1つまたは複数のLM04細胞増殖関連活性を模倣する程度にLM04機能活性を示す任意の他の分子に対する言及も含むと解釈される必要がある。例えば、個体に導入された場合に不要な細胞増殖を誘導すると考えられる天然または非天然のLM04模倣物（例えば、毒素または薬剤）が存在する可能性を想定することができる。イタリック体の「LM04」に対する言及は、LM04をコードする核酸分子に対する言及であると解釈される必要があり、これに対して、イタリック体でない「LM04」はLM04タンパク質に対する言及である。

【００６１】

LM04の「レベル」に対する言及は、定量的、半定量的または定性的に決定される量を含む。

【００６２】

本発明によれば、悪性または非悪性の新形成細胞、特に上皮癌細胞または乳房細胞を含む、新生物と関連のある細胞では、LM04の産生レベルが上昇していることを提唱する。このため、LM04またはLM04をコードする遺伝物質の発現産物のレベルの定量的または定性的な検出は、細胞が異常であって新形成と関連があること、または新形成へと進展する性向があることの指標となる。

【００６３】

本明細書における「対象」に対する言及は、ヒト、霊長動物、家畜動物（例えば、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ロバ）、試験検査用動物（例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモット）、伴侶動物（例えば、イヌ、ネコ）および捕獲された野生動物（例えば、キツネ、カンガルー、シカ）を含むものと解釈される必要がある。哺乳動物はヒトであることが好ましい。

【００６４】

したがって、本発明のもう1つの局面は、対象における新生物または新生物様増殖の存在を診断するための方法であって、前記対象または前記対象からの生物試料からの細胞または細胞抽出物を、前記LM04またはその抗原決定基もしくはエピトープに対する特異性を有する抗体のLM04結合有効量を接触させること、および続いてLM04-抗体複合体のレベルを定量的または定性的に決定することを含み、正常細胞と比較して前記複合体のレベルの上昇の存在によって新生物の存在が示されるような方法を考えている。

【００６５】

前記新形成細胞は、中枢神経系腫瘍、網膜芽細胞種、頭頸部癌（例えば、扁平細胞癌）、肺癌（小細胞肺癌および非小細胞肺癌の両方）、腎臓癌（例えば、腎細胞腺癌）、膵臓性新形成（例えば、腺癌および島細胞腫瘍）、結腸直腸癌、子宮頸癌、精巣癌（例えば、生殖細胞腫瘍）、卵巣癌（例えば、卵巣上皮癌および卵巣生殖細胞腫瘍）、リンパ腫、白血病、悪性黒色腫、神経内分泌腫瘍およびカルチノイド腫瘍に特徴的なものであることが好ましい。

【００６６】

より好ましくは、前記新生物は上皮細胞新生物または乳房細胞新生物である。

【００６７】

最も具体的には、前記乳房細胞新生物は乳房細胞癌である。

【００６８】

1つの関連した態様において、本発明は、対象における新生物の存在を診断するための方法であって、前記対象の細胞または前記対象からの生物試料からmRNAを入手すること、お

よび選択的にはcDNAを作製すること、ならびに前記mRNAまたはcDNAを、LM04をコードするヌクレオチド配列またはその相補的ヌクレオチド配列の全体または一部とハイブリダイズしうる、および／またはそれを増幅しうる遺伝子プローブと接触させること、および続いて前記mRNAまたはcDNAのレベルを検出することを含み、正常対照と比較して前記mRNAまたはcDNAのレベルの上昇の存在によって新生物の存在が示されるような方法を提供する。

【００６９】

前記新生物は、中枢神経系腫瘍、網膜芽細胞種、頭頸部癌（例えば、扁平細胞癌）、肺癌（小細胞肺癌および非小細胞肺癌の両方）、腎臓癌（例えば、腎細胞腺癌）、膵臓性新形成（例えば、腺癌および島細胞腫瘍）、結腸直腸癌、子宮頸癌、精巣癌（例えば、生殖細胞腫瘍）、卵巣癌（例えば、卵巣上皮癌および卵巣生殖細胞腫瘍）、リンパ腫、白血病、悪性黒色腫、神経内分泌腫瘍およびカルチノイド腫瘍であることが好ましい。

【００７０】

より詳細には、前記新生物は上皮細胞新生物または乳房細胞新生物である。

【００７１】

最も具体的には、前記乳房細胞新生物は乳房細胞癌である。

【００７２】

LM04を検出するために抗体、特にモノクローナル抗体を用いることは本発明の好ましい方法である。抗体はさまざまな手段のうち任意のものによって調製しうる。ヒトLM04の検出のための抗体は一般に（必然的ではないが）、霊長動物、家畜動物（例えば、ヒツジ、ウシ、ブタ、ヤギ、ウマ）、試験検査用動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ）および伴侶動物（例えば、イヌ、ネコ）などの非ヒト動物に由来する。一般には、抗体を用いるアッセイ法を細胞または生検組織に対してインビトロで行う。しかし、抗体が適切な様式で非免疫化されていれば、またはヒトへの使用の場合にはヒト化されていれば、抗体を例えば核標識用タグによって標識して患者に投与し、核標識の蓄積部位を放射線学的な方法によって決定することができる。このため、LM04抗体は癌標的指向性薬剤とみなすことができる。したがって、本発明は、ヒトおよび非ヒト罹患生物における癌画像化に用いるための非免疫化型の抗体に対しても適用される。これについては以下にさらに説明する。

【００７３】

したがって、本発明は、LM04に関する免疫学的アッセイ法またはインビボでの癌画像化のために用いるための抗体、特にモノクローナル抗体を提供する。抗体はLM04タンパク質を標的としてもよく、または例えばLM04 mRNAを標的としてもよい。

【００７４】

LM04に対する抗体の作製のためには、この分子を、これがヒト組織を含む動物由来のものであれば生物試料から、または組換え手段によって産生された場合には細胞培養物から、抽出する必要がある。LM04は任意の適した手段によって生物試料から分離しうる。例えば、LM04の表面荷電特性、サイズ、密度、生物活性および別の実体（例えば、それと結合するか別の様式で会合する別のタンパク質または化合物）に対する親和性のうち任意の1つまたは複数を分離に利用してもよい。このため、例えば、生体液からのLM04の分離を、超遠心分離、イオン交換クロマトグラフィー（例えば、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー）、電気泳動（例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動）、サイズ分離（例えば、ゲル濾過、限外濾過）および親和性を介した分離（例えば、免疫親和性分離、ダイナビーズ（Dynabead）（商標）分離などの磁気ビーズ分離、免疫クロマトグラフィー、免疫沈降など）の任意の1つまたは複数によって行うことができる。用いる分離法の選択は、求めているLM04の生物活性もしくは物理的特性、またはそれを入手しようとする組織に依存すると思われる。

【００７５】

生体液からのLM04の分離の際にはタンパク質に存在する高次構造エピトープが保たれることが好ましく、このため、酵素の変性を引き起こす方法を避けることが適切である。当業者は、動物に対して曝露されるLM04上の抗原決定基または活性部位が天然タンパク質のも

のと構造的に同一であることを確実にするために、LM04にとって固有の生理的条件（例えば、それを入手した生体液）にできるだけ近い条件を維持または模倣する重要性を認識していると考えられる。これにより、免疫処置を受けた動物における、天然タンパク質を認識すると考えられる適切な抗体の産生が確かなものとなる。1つの好ましい態様においては、アフィニティー分離、ゲル濾過および限外濾過のうち任意の1つまたは複数を用いて、LM04を生体液から分離する。

【００７６】

免疫処置およびその後のモノクローナル抗体の産生は、例えばKohlerおよびMilstein（1975、1976）、Coliganら（1991-1997）またはToyamaら（1987）によって記載された標準的なプロトコールを用いて行うことができる。本質的には、標準的な方法により、LM04を含む生体液またはその画分による免疫処置を動物に行い、抗体産生細胞、特に抗体産生性体細胞（例えば、Bリンパ球）を産生させる。続いて、これらの細胞を免疫処置動物から採取して不死化させる。

【００７７】

LM04の断片を抗体の作製のために用いる場合には、それをまず担体と会合させることが必要なことがある。「担体」とは、免疫原性がないか乏しい物質（例えば、ハプテン）と自然にまたは人為的に結合することによってその免疫原性を高める、典型的には高分子量である任意の物質のことを意味する。

【００７８】

抗体産生細胞の不死化は、当技術分野で周知の方法を用いて実現しうる。例えば、不死化は、エプスタイン-バーウイルス（EBV）を用いる形質転換法（Kozborら、1986）によって行いうる。1つの好ましい態様においては、抗体産生細胞を細胞融合法（（Coliganら、1991-1997）に記載されている）を用いて不死化させるが、これはモノクローナル抗体の作製のために広く用いられている。この方法では、抗体産生能力のある抗体産生性体細胞、特にB細胞を骨髄腫細胞株と融合させる。これらの体細胞は、感作動物、好ましくはマウスおよびラットなどの齧歯類動物のリンパ節、脾臓および末梢血に由来するものでよい。マウス脾細胞が特に有用である。しかし、ラット、ウサギ、ヒツジまたはヤギの細胞、または他の動物種由来の細胞を代わりに用いることも可能と考えられる。

【００７９】

ハイブリドーマを作製する融合手順に用いるために特化した骨髄腫細胞株がリンパ球性腫瘍から開発されている（KohlerおよびMilstein、1976；Shulmanら、1978；Volkら、1982）。これらの細胞株は少なくとも3つの理由から開発されている。第1の理由は、融合しておらず同じように無限に自己増殖を行う骨髄腫細胞からのハイブリドーマの選択を容易にするためである。これは通常、ハイブリドーマの増殖を支えるある種の選択培地における増殖を不可能にする酵素欠損のある骨髄腫を用いることによって達成される。第2の理由は、リンパ球性腫瘍細胞が自らの抗体を産生する固有の能力に起因する。ハイブリドーマによる腫瘍細胞抗体の産生が起こらないように、内因性免疫グロブリン軽鎖または重鎖を産生することができない骨髄腫細胞株を用いる。これらの細胞株の選択に関する第3の理由は、それらに融合に対する適性があり、効率が高いことによる。

【００８０】

融合雑種細胞の作製には、例えば、P3X63-Ag8、P3X63-AG8.653、P3／NS1-Ag4-1（NS-1）、Sp2／0-Ag14およびS194／5.XXO.Bu.1を含む、多くの骨髄腫細胞株を用いうる。P3X63-Ag8およびNS-1細胞株はKohlerおよびMilstein（1976）によって記載されている。Shulmanら（1978）は、Sp2／0-Ag14骨髄腫株を開発した。S194／5.XXO.Bu.1株はTrowbridge（1978）によって報告されている。

【００８１】

抗体産生性脾細胞またはリンパ節細胞と骨髄腫細胞との雑種を作製するための方法は、通常、細胞膜の融合を促進する1つまたは複数の作用因子（化学的、ウイルス的または電気的）の存在下で、体細胞と骨髄腫細胞をそれぞれ10：1の割合（この割合は約20：1～約1：1の範囲で変化させうる）で混合することを含む。融合方法は以前に記載されている（K

ohlerおよびMilstein、1975；1976；Gafterら、1977；Volkら、1982）。このような研究者によって用いられている融合促進性の作用因子はセンダイウイルスおよびプロピレングリコール（PEG）であった。

【００８２】

融合手順によって雑種が生じるのは極めて低い頻度であるため（例えば、脾臓を体細胞の供給源として用いる場合には、概ね1×10^5個の脾細胞当たり1個の雑種細胞しか得られない）、融合していない残りの細胞、特に融合していない骨髄腫細胞から融合雑種細胞を選択するための手段があることが好ましい。所望の抗体産生性ハイブリドーマを、生じた他の融合雑種細胞の中から検出するための手段も必要である。一般に、融合雑種細胞の選択は、ハイブリドーマの増殖は支持するが、通常は無限に分裂を続けると考えられる融合していない骨髄腫細胞の増殖は阻止する培地中で、細胞を培養することによって行われる。融合に用いる体細胞はインビトロ培養下では長期的な生存性を維持せず、このため問題とはならない。本発明の実施例においては、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼを欠く（HPRT陰性の）骨髄腫細胞を用いた。これらの細胞に対する除外選択は、ヒポキサンチン／アミノプテリン／チミジン（HAT）培地中で行われ、融合雑種細胞はこの培地中で脾細胞のHPRT陽性遺伝子型のために生存しうる。遺伝子型の点で適格性のある雑種細胞の増殖を支える培地中で除外選択しうる、さまざまな遺伝的欠陥（薬剤感受性など）を有する骨髄腫細胞を用いることも可能である。

【００８３】

融合雑種細胞を選択的に培養するためには数週間を要する。この期間の初期には、その後にクローニングおよび増殖を行わせる、所望の抗体を産生する雑種細胞を同定することが必要である。一般に、得られた雑種細胞の10％前後が所望の抗体を産生するが、これは約1～約30％の範囲であることが稀ではない。抗体を産生する雑種細胞の検出は、固相酵素免疫アッセイ法およびラジオイムノアッセイ法、例えばKennetら（1980）に記載されたものを含む、いくつかの標準的なアッセイ方法のいずれか1つによって、ならびにFACS分析（1998）によって行いうる。

【００８４】

ひとたび所望の融合雑種細胞を選択し、個々の抗体産生性細胞系へのクローニングを行えば、各細胞系を2種類の標準的な手法のいずれかによって増殖させることができる。まず、ハイブリドーマ細胞の浮遊液を組織適合性のある動物に注入する。その後、注入した動物には、融合雑種細胞によって産生される特異的モノクローナル抗体を分泌する腫瘍が発生するはずである。血清または腹水などの動物の体液を採取することにより、高濃度のモノクローナル抗体が得られる。または、個々の細胞系をインビトロにおいて実験用の培養容器内で増殖させる。単一の特異的モノクローナル抗体を高濃度に含む培地をデカンテーション、濾過または遠心分離によって収集し、その後に精製することができる。

【００８５】

細胞系を、LM04を検出する特異性に関して、任意の適した免疫検出手段によって試験する。例えば、細胞系を多数のウェルに分けて入れ、インキュベートした上で、各ウェルからの上清を、固相酵素免疫アッセイ法（ELISA）、間接蛍光抗体法などによって分析することができる。標的LM04を認識しうるが標的でないエピトープは認識しないモノクローナル抗体を産生する細胞系を同定し、その後にインビトロで直接培養するか、または組織適合性のある動物に注入して腫瘍を形成させ、求める抗体を産生させ、収集した上で精製する。

【００８６】

これらの抗体はLM04特異的である。このことは、抗体がLM04を他の分子と区別しうることを意味する。正常細胞内の分子と交差反応しない限り、さらに広域性の抗体を用いることもできる。

【００８７】

1つの好ましい態様において、本抗体は16H2または20F8、またはそれらの誘導体、相同体、類似体、化学、変異体もしくは模倣物である。

【００８８】
16H2および20F8を分泌するハイブリドーマ細胞系は、ECACCに（日付を挿入すること）に寄託されている。
【００８９】
本発明はまた、主題免疫相互作用性分子を発現する細胞系、特にモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマに対しても適用されると解釈される必要がある。最も好ましくは、前記ハイブリドーマはハイブリドーマ細胞系16H2または20F8、またはそれらの変異体もしくはバリアントである。
【００９０】
モノクローナル抗体をインビボでの癌の画像化または治療に用いることを予定している場合には、それを導入しようとする宿主（例えば、ヒト）に対してそれを非免疫化することが必要と考えられる。非免疫化処置の工程は、本発明に従って調製されたモノクローナル抗体と同じまたは類似の特異性を有するキメラ抗体の調製を含む、さまざまな形態のいずれをとってもよい。キメラ抗体とは、その軽鎖および重鎖遺伝子が、異なる種に属する免疫グロブリン可変領域遺伝子および定常領域遺伝子から、典型的には遺伝子操作によって構築された抗体のことである。すなわち、本発明によれば、所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得たところで、1つの種の結合領域が別の種の抗体の非結合領域と組み合わされた種間（interspecific）モノクローナル抗体を作製するための技術を用いる（Liuら、1987）。例えば、非ヒト（例えば、マウス）モノクローナル抗体由来の相補性決定領域（CDR）をヒト抗体とつなぎ合わせ、それによってマウス抗体を「ヒト化」することができる（欧州特許公開公報（EP Patent Publication）第0 239 400号；Jonesら、1986；Verhoeyenら、1988；Richmannら、1988）。この場合には、非免疫化工程はヒトに対して特異的である。より詳細には、CDRを、ヒト定常領域を有するまたは有しないヒト抗体の可変領域とつなぎ合わせる。CDRを提供する非ヒト抗体は一般に「ドナー」と呼ばれ、フレームワークを提供するヒト抗体は一般に「アクセプター」と呼ばれる。定常領域は必ずしも存在しなくてよいが、存在する場合には、それらはヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一でなければならず、すなわち、少なくとも約85～90％同一、好ましくは約95％またはそれ以上同一でなければならない。このため、おそらくはCDRを除く、ヒト化抗体のすべての部分は、天然のヒト免疫グロブリン配列の対応部分と実質的に同一である。したがって、「ヒト化抗体」は、ヒト化された軽鎖およびヒト化された重鎖免疫グロブリンを含む抗体である。ドナー抗体は「ヒト化」の工程によって「ヒト化」されたと言われるが、これは結果として生じるヒト化抗体が、CDRを提供するドナー抗体と同じ抗原と結合すると予想されるためである。本明細書における「ヒト化」に対する言及は、特定の宿主、この場合にはヒト宿主に対して非免疫化された抗体に対する言及を含む。
【００９１】
非免疫化抗体が、抗原結合または他の免疫グロブリン機能に対して実質的に影響を及ぼさない、さらなる保存的アミノ酸置換を有してもよいことは理解されると考えられる。表1に従って範例的な保存的置換を作製することができる。
【００９２】
【表１】

元の残基	置換の例
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

【００９３】
本発明による非免疫化抗体を作製するために用いうる方法の例は、例えば、Richmannら、1988；欧州特許公開公報第0 239 400号；Chouら；Queenら；Morganらによる参照文献に記載されている。
【００９４】
したがって、1つの態様において、本発明は、LM04に対するモノクローナル抗体によって認識されるエピトープに対する特異性を有する非免疫化抗体分子であって、前記非免疫化抗体の可変ドメインのCDRのうち少なくとも1つが前記LM04に対するモノクローナル抗体に由来し、非免疫化抗体分子の残りの免疫グロブリン由来部分が、抗体を非免疫化しようとする対象である宿主からの免疫グロブリンまたはその類似体に由来する、抗体分子を考えている。
【００９５】
本発明のこの局面は、非ヒト抗体のフレームワーク領域の操作を含む。
【００９６】
本発明は、LM04に対する特異性を依然として保っている、主題抗体の変異体、類似体および誘導体に対しても適用される。
【００９７】
「変異体」または「誘導体」という用語には、1つまたは複数のアミノ酸置換物、付加物

および／または欠失物が含まれる。

【００９８】

本明細書で用いる場合、「CDR」という用語には、分子の結合部分にあるβ鎖を架橋する、抗体フレームワーク領域の可変部分における3つの軽鎖領域および3つの重鎖領域にわたるCDR構造ループが含まれる。これらのループは特徴的な限界構造を有する（Chothiaら、1987；Chothiaら、1992）。

【００９９】

「フレームワーク領域」とは、CDRとも呼ばれる3つの超可変領域によって分断された免疫グロブリン軽鎖または重鎖可変領域の領域を意味する。フレームワーク領域およびCDRの範囲は厳密に規定されている（例えば、Kabatら、1983を参照のこと）。異なる軽鎖または重鎖のフレームワーク領域の配列は種の内部では比較的保存されている。本明細書で用いる場合、「ヒトフレームワーク領域」とは、天然のヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域と実質的に同一（約85％またはそれ以上、通常は90～95％またはそれ以上）であるフレームワーク領域のことである。抗体のフレームワーク領域、すなわち構成要素である軽鎖および重鎖による複合的なフレームワーク領域は、CDRの配置および整列化に役立つ。CDRは、LM04のエピトープに対する結合の主な原因となる。

【０１００】

本明細書で用いる場合、「重鎖可変領域」という用語は、アミノ酸配列が、重鎖のアミノ末端（N末端）アミノ酸残基から始まる本発明のモノクローナル抗体の重鎖に対応する、約110～125アミノ酸残基長のポリペプチドのことを意味する。同様に、「軽鎖可変領域」という用語は、アミノ酸配列が、軽鎖のN末端アミノ酸残基から始まる本発明のモノクローナル抗体の軽鎖に対応する、約95～130アミノ酸残基長のポリペプチドのことを意味する。完全長の免疫グロブリン「軽鎖」（約25Kdまたは214アミノ酸）は、NH_2末端の可変領域遺伝子（約110アミノ酸）およびCOOH末端のκまたはλ定常領域遺伝子によってコードされる。完全長の免疫グロブリン「重鎖」（約50Kdまたは446アミノ酸）は同様に、可変領域遺伝子（約116アミノ酸）および他の前述の定常領域遺伝子の1つ、例えばγ（約330アミノ酸をコードする）によってコードされる。

【０１０１】

「免疫グロブリン」または「抗体」という用語は、本明細書において、免疫グロブリン遺伝子によって実質的にコードされる1つまたは複数のポリペプチドからなるタンパク質を指して用いられる。認知されている免疫グロブリン遺伝子には、κ、λ、α、γ（IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4）、δ、εおよびμ定常領域遺伝子のほか、無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。1つの形態の免疫グロブリンが抗体の基本的な構造単位を構成する。この形態は四量体であり、2つの同一な免疫グロブリン鎖の対からなり、それぞれの対は1つの軽鎖および1つの重鎖を有する。各対における軽鎖および重鎖可変領域はともに抗原に対する結合を担い、定常領域は抗体エフェクター機能を担う。免疫グロブリンは抗体のほかにも、例えばFv、Fab、Fab'および$(Fab')_2$を含む、さまざまな他の形態で存在しうる。

【０１０２】

本発明は、例えばFv、Fab、Fab'および$F(ab')_2$断片を含む、本発明の方法によって作製されたモノクローナル抗体の断片の使用および作製も考えている。このような断片は、例えばColiganら（1991-1997）によって記載された、標準的な方法によって調製しうる。

【０１０３】

本発明はまた、本発明のモノクローナル抗体と同じまたは類似の特異性を有する合成または組換え型の抗原結合分子も考えている。この種の抗原結合分子には、安定化された合成Fv断片が含まれうる。この種の断片の例には、ペプチドリンカーを用いてV_HドメインのN末端またはC末端をV_LドメインのそれぞれC末端またはN末端と架橋させた一本鎖Fv断片（sFv、しばしばscFvと呼ばれる）が含まれる。ScFvは抗体全体の中の定常部分をすべて欠いており、補体を活性する能力がない。V_HおよびV_Lドメインを連結させるのに適したペプチドリンカーは、V_HドメインおよびV_Lドメインが折り畳まれて、Fv断片の由来となった抗体

全体の抗原結合部位と類似した三次元構造を備えた抗原結合部位を有する単一のポリペプチド鎖となることが可能なものである。所望の特性を有するリンカーは、米国特許第4,946,778号に開示された方法によって入手しうる。しかし、場合によってはリンカーが存在しない。ScFvは、例えば、Krebberら（Krebberら、1997）に概説された方法に従って調製しうる。または、米国特許第5,091,513号、欧州特許第239,400号、またはWinterおよびMilstein（WinterおよびMilstein、1991）ならびにPluckthunら（Pluckthumら、1996）によるによる論文に記載された方法によってそれらを調製することもできる。

【０１０４】

または、安定化された合成Fv断片には、V_HおよびV_Lドメイン内にシステイン残基が、完全に折り畳まれたFv分子内の2つの残基の間にジスルフィド結合が形成されるように導入されている、ジスルフィド安定化Fv（dsFv）も含まれる。dsFvを作製するために適した方法は、例えば、（Glockshuberら、1990；Reiterら、1994；Reiterら、1994；Reiterら、1994；Webberら、1995）に記載されている。

【０１０５】

合成または組換え型の抗原結合分子として同じく考えているのは、例えば、（Wardら、1989；Hamers-Castermanら、1993；Davies & Reichmann、1994）に開示された、単一の可変領域ドメイン（dAbと呼ばれる）である。

【０１０６】

または、合成または組換え型の抗原結合分子には「ミニボディ（minibody）」も含まれうる。この点に関して、ミニボディは抗体全体の小型版であり、抗体全体の中の必須因子を一本鎖としてコードしている。ミニボディは、例えば米国特許第5,837,821号に開示されているように、天然抗体のV_HおよびV_Lドメインが免疫グロブリン分子のヒンジ領域およびCH3ドメインと融合されたものを含むことが適している。

【０１０７】

1つの代替的な態様において、合成または組換え型の抗原結合分子には、非免疫グロブリン由来のタンパク質フレームワークが含まれうる。例えば（Ku & Schutz、1995）に対して言及することができ、これは抗原結合のために選択されたCDRを生じるようにランダム化された2つのループを有する4ヘリックス束化タンパク質シトクロムb562を開示している。

【０１０８】

合成または組換え型の抗原結合分子は多価（すなわち、複数の抗原結合部位を有する）であってもよい。このような多価分子は1つまたは複数の抗原に対して特異的でありうる。この種の多価分子は、例えば（Adamsら、1993；Cumberら、1992）によって開示されたように、システイニル含有ペプチドを介した2つの抗体断片の二量体化によって調製しうる。または、二量体化を、抗体断片と、自然に二量体化する両親媒性ヘリックスとの融合（Plunckthun、1992）によって、または優先的にヘテロ二量体化するドメイン（ロイシンジッパーjunおよびfosなど）の使用（Kostelnyら、1992）によって促進させてもよい。

【０１０９】

本発明はさらに、本抗体におけるアミノ酸の化学的類似体も含む。アミノ酸の化学的類似体の使用は、特に、対象に投与する必要がある場合などに分子を安定化するために有用である。本明細書で考えているアミノ酸の類似体には、側鎖の修飾、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の合成時における非天然アミノ酸および／またはその誘導体の組み入れ、ならびにタンパク質性分子またはその類似体に対して高次構造上の制約を課す架橋剤および他の方法の使用が非制限的に含まれる。

【０１１０】

本発明によって考えている側鎖修飾の例には、アルデヒドとの反応後に$NaBH_4$で還元することによる還元的アルキル化；メチルアセトイミデートを用いるアミド化；無水酢酸によるアシル化；シアネートによるアミノ基のカルバモイル化；2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）によるアミノ基のトリニトロベンジル化；無水コハク酸および無水テトラヒドロフタル酸によるアミノ基のアシル化；ならびにピリドキサル-5-ホスフェートに

よるリジンのピリドキシル化の後にNaBH4で還元することといったアミノ基の修飾が含まれる。

【０１１１】

アルギニン残基のグアニジン基は、2,3-ブタンジオン、フェニルグリオキサールおよびグリオキサールなどの試薬を用いた複素環式縮合産物の形成により修飾されうる。

【０１１２】

カルボキシル基は、O-アシルイソウレアの形成を経るカルボジイミドの活性化の後に、例えば、対応するアミドへの誘導化により修飾されうる。スルフヒドリル基は、ヨード酢酸またはヨードアセトアミドによるカルボキシメチル化；システイン酸への過ギ酸酸化；他のチオール化合物による混合ジスルフィドの形成；マレイミド、無水マレイン酸または他の置換型マレイミドとの反応；4-クロロメルクリベンゾエート、4-クロロメルクリフェニルスルホン酸、フェニルメルクリクロライド、2-クロロメルクリ-4-ニトロフェノールおよび他の水銀剤を用いる水銀誘導体の形成；アルカリ性pHでのシアネートによるカルバモイル化などの方法により修飾されうる。

【０１１３】

トリプトファン残基は、例えば、N-ブロモスクシンイミドによる酸化または2-ヒドロキシ-5-ニトロベンジルブロミドもしくはスルフェニルハライドを用いるインドール環のアルキル化により修飾されうる。一方、チロシン残基はテトラニトロメタンによるニトロ化により改変されて3-ニトロチロシン誘導体を形成しうる。

【０１１４】

ヒスチジン残基のイミダゾール環の修飾は、ヨード酢酸誘導体によるアルキル化またはジエチルピロカルボネートによるN-カルベトキシル化によって行いうる。

【０１１５】

ペプチド合成中に非天然アミノ酸および誘導体を組み入れる例には、ノルロイシン、4-アミノ酪酸、4-アミノ-3-ヒドロキシ-5-フェニルペンタン酸、6-アミノヘキサン酸、t-ブチルグリシン、ノルバリン、フェニルグリシン、オルニチン、サルコシン、4-アミノ-3-ヒドロキシ-6-メチルヘプタン酸、2-チエニルアラニンおよび／またはアミノ酸のD-異性体の使用が非制限的に含まれる。本明細書で考えている非天然アミノ酸の一覧は表2に示されている。

【０１１６】

【表２】

非保存的アミノ酸	記号	非保存的アミノ酸	記号
α-アミノ酪酸	Abu	L-N-メチルアラニン	Nmala
α-アミノ-α-メチル酪酸	Mgabu	L-N-メチルアルギニン	Nmarg
アミノシクロプロパン-	Cpro	L-N-メチルアスパラギン	Nmasn
カルボキシレート		L-N-メチルアスパラギン酸	Nmasp
アミノイソ酪酸	Aib	L-N-メチルシステイン	Nmcys
アミノノルボルニル-	Norb	L-N-メチルグルタミン	Nmgln
カルボキシレート		L-N-メチルグルタミン酸	Nmglu
シクロヘキシルアラニン	Chexa	L-Nメチルヒスチジン	Nmhis
シクロペンチルアラニン	Cpen	L-N-メチルイソロイシン	Nmile
D-アラニン	Dal	L-N-メチルロイシン	Nmleu
D-アルギニン	Darg	L-N-メチルリジン	Nmlys
D-アスパラギン酸	Dasp	L-N-メチルメチオニン	Nmmet
D-システイン	Dcys	L-N-メチルノルロイシン	Nmnle
D-グルタミン	Dgln	L-N-メチルノルバリン	Nmnva
D-グルタミン酸	Dglu	L-N-メチルオルニチン	Nmorn
D-ヒスチジン	Dhis	L-N-メチルフェニルアラニン	Nmphe
D-イソロイシン	Dile	L-N-メチルプロリン	Nmpro
D-ロイシン	Dleu	L-N-メチルセリン	Nmser
D-リジン	Dlys	L-N-メチルトレオニン	Nmthr
D-メチオニン	Dmet	L-N-メチルトリプトファン	Nmtrp
D-オルニチン	Dorn	L-N-メチルチロシン	Nmtyr
D-フェニルアラニン	Dphe	L-N-メチルバリン	Nmval
D-プロリン	Dpro	L-N-メチルエチルグリシン	Nmetg
D-セリン	Dser	L-N- メチル -t-ブチルグリシン	Nmtbug
D-トレオニン	Dthr	L-ノルロイシン	Nle
D-トリプトファン	Dtrp	L-ノルバリン	Nva

D-チロシン	Dtyr	α- メチル -アミノイソ酪酸	Maib
D-バリン	Dval	α- メチル -γ-アミノ酪酸	Mgabu
D-α-メチルアラニン	Dmala	α-メチルシクロヘキシルアラニン	Mchexa
D-α-メチルアルギニン	Dmarg	α-メチルシクロペンチルアラニン	Mcpen
D-α-メチルアスパラギン	Dmasn	α- メチル -α-ナフチルアラニン	Manap
D-α-メチルアスパラギン酸	Dmasp	α-メチルペニシラミン	Mpen
D-α-メチルシステイン	Dmcys	N-(4-アミノブチル)グリシン	Nglu
D-α-メチルグルタミン	Dmgln	N-(2-アミノエチル)グリシン	Naeg
D-α-メチルヒスチジン	Dmhis	N-(3-アミノプロピル)グリシン	Norn
D-α-メチルイソロイシン	Dmile	N- アミノ-α-メチル酪酸	Nmaabu
D-α-メチルロイシン	Dmleu	α-ナフチルアラニン	Anap
D-α-メチルリジン	Dmlys	N-ベンジルグリシン	Nphe
D-α-メチルメチオニン	Dmmet	N-(2-カルバミルエチル)グリシン	Ngln
D-α-メチルオルニチン	Dmorn	N-(カルバミルメチル)グリシン	Nasn
D-α-メチルフェニルアラニン	Dmphe	N-(2-カルボキシエチル)グリシン	Nglu
D-α-メチルプロリン	Dmpro	N-(カルボキシメチル)グリシン	Nasp
D-α-メチルセリン	Dmser	N-シクロブチルグリシン	Ncbut
D-α-メチルトレオニン	Dmthr	N-シクロヘプチルグリシン	Nchep
D-α-メチルトリプトファン	Dmtrp	N-シクロヘキシルグリシン	Nchex
D-α-メチルチロシン	Dmty	N-シクロデシルグリシン	Ncdec
D-α-メチルバリン	Dmval	N-シクロドデシルグリシン	Ncdod
D-N-メチルアラニン	Dnmala	N-シクロオクチルグリシン	Ncoct
D-N-メチルアルギニン	Dnmarg	N-シクロプロピルグリシン	Ncpro
D-N-メチルアスパラギン	Dnmasn	N-シクロウンデシルグリシン	Ncund
D-N-メチルアスパラギン酸	Dnmasp	N-(2,2-ジフェニルエチル)グリシン	Nbhm
D-N-メチルシステイン	Dnmcys	N-(3,3-ジフェニルプロピル)グリシン	Nbhe
D-N-メチルグルタミン	Dnmgln	N-(3-グアニジノプロピル)グリシン	Narg
D-N-メチルグルタミン酸	Dnmglu	N-(1-ヒドロキシエチル)グリシン	Nthr
D-N-メチルヒスチジン	Dnmhis	N-(ヒドロキシエチル))グリシン	Nser
D-N-メチルイソロイシン	Dnmile	N-(イミダゾリルエチル))グリシン	Nhis

D-N-メチルロイシン	Dnmleu	N-(3-インドリルエチル)グリシン	Nhtrp
D-N-メチルリジン	Dnmlys	N- メチル -γ-アミノ酪酸	Nmgabu
N-メチルシクロヘキシルアラニン	Nmchexa	D-N-メチルメチオニン	Dnmmet
D-N-メチルオルニチン	Dnmorn	N-メチルシクロペンチルアラニン	Nmcpen
N-メチルグリシン	Nala	D-N-メチルフェニルアラニン	Dnmphe
N-メチルアミノイソ酪酸	Nmaib	D-N-メチルプロリン	Dnmpro
N-(1-メチルプロピル)グリシン	Nile	D-N-メチルセリン	Dnmser
N-(2-メチルプロピル)グリシン	Nleu	D-N-メチルトレオニン	Dnmthr
D-N-メチルトリプトファン	Dnmtrp	N-(1-メチルエチル)グリシン	Nval
D-N-メチルチロシン	Dnmtyr	N- メチル a-ナフチルアラニン	Nmanap
D-N-メチルバリン	Dnmval	N-メチルペニシラミン	Nmpen
γ-アミノ酪酸	Gabu	N-(*p*-ヒドロキシフェニル)グリシン	Nhtyr
L-*t*-ブチルグリシン	Tbug	N-(チオメチル)グリシン	Ncys
L-エチルグリシン	Etg	ペニシラミン	Pen
L-ホモフェニルアラニン	Hphe	L-α-メチルアラニン	Mala
L-α-メチルアルギニン	Marg	L-α-メチルアスパラギン	Masn
L-α-メチルアスパラギン酸	Masp	L-α- メチル -*t*-ブチルグリシン	Mtbug
L-α-メチルシステイン	Mcys	L-メチルエチルグリシン	Metg
L-α-メチルグルタミン	Mgln	L-α-メチルグルタミン酸	Mglu
L-α-メチルヒスチジン	Mhis	L-α-メチルホモフェニルアラニン	Mhphe
L-α-メチルイソロイシン	Mile	N-(2-メチルチオエチル)グリシン	Nmet
L-α-メチルロイシン	Mleu	L-α-メチルリジン	Mlys
L-α-メチルメチオニン	Mmet	L-α-メチルノルロイシン	Mnle
L-α-メチルノルバリン	Mnva	L-α-メチルオルニチン	Morn
L-α-メチルフェニルアラニン	Mphe	L-α-メチルプロリン	Mpro
L-α-メチルセリン	Mser	L-α-メチルトレオニン	Mthr
L-α-メチルトリプトファン	Mtrp	L-α-メチルチロシン	Mtyr
L-α-メチルバリン	Mval	L-N-メチルホモフェニルアラニン	Nmhphe
N-(N-(2,2-ジフェニルエチル)カルバミルメチル)グリシン	Nnbhm	N-(N-(3,3-ジフェニルプロピル)カルバミルメチル)グリシン	Nnbhe

1-カルボキシ-1-(2,2-ジフェニル- Nmbc

エチルアミノ)シクロプロパン

【０１１７】
架橋剤は例えば、n＝1からn＝6までの（CH_2）$_n$スペーサー基を有する二官能性イミドエステル類などのホモ二官能性架橋剤、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステルならびにN-ヒドロキシスクシンイミドなどのアミノ反応性部分とマレイミドもしくはジチオ部分（SH）もしくはカルボジイミド（COOH）などの別の基に特異的な反応性部分とを通常含むヘテロ二官能性試薬を用いて、3D高次構造を安定化するために用いうる。さらに、ペプチドを、例えばC_αおよびN_α-メチルアミノ酸の組み入れ、アミノ酸のC_α原子とC_β原子との間への二重結合の導入、ならびにN末端とC末端の間、二つの側鎖の間または側鎖とN末端もしくはC末端との間にアミド結合を形成するなどの共有結合の導入による環状ペプチドまたは類似体の形成により、高次構造を拘束することができる。
【０１１８】
本発明はさらに、LM04を検出するためのアッセイ法であって、
（3）LM04またはその抗原決定基をに対して特異的なモノクローナル抗体を、前記LM04を含む細胞を含むことが疑われる生物試料と接触させる段階；および
（4）段階（3）で形成された複合体をシグナル検出の段階に供する段階、を含むアッセイ法を考えている。
【０１１９】
シグナル検出の段階は、ELISAまたは任意の他のレポーター分子に基づくアッセイ法が含まれうる。この検出段階の一部として、シグナルをまず増幅することが必要なこともある。
【０１２０】
本発明の非免疫化モノクローナル抗体も、インビボでの癌の画像化のため、ならびに、癌細胞を細胞増殖遅延剤または殺細胞剤、すなわち細胞分裂停止剤または細胞死誘導剤と接触させることを目的とする癌細胞のターゲティングのために有用と思われる。
【０１２１】
癌の画像化に関しては、レポーター分子を非免疫化モノクローナル抗体と結合させ、これを続いてヒトなどの宿主に導入する。レポーター分子を検出することにより、癌の増殖を影像化することができる。特に有用な形態のレポーター分子の一つは核標識タグ（nuclear tag）である。
【０１２２】
したがって、本発明のもう1つの局面は、ヒト患者における新形成細胞を検出するための方法であって、ヒトLM04またはその抗原決定基に対して特異的な非免疫化型の非ヒト由来モノクローナル抗体をレポーター分子で標識したものを前記患者に導入すること、標識抗体を循環系全体または循環系の選択された部分に散在させること、および続いて抗体の位置を同定するために前記患者をレポーター分子の検出手段に供することを含む方法を考えている。
【０１２３】
前記新形成細胞は、中枢神経系腫瘍、網膜芽細胞種、頭頸部癌（例えば、扁平細胞癌）、肺癌（小細胞肺癌および非小細胞肺癌の両方）、腎臓癌（例えば、腎細胞腺癌）、膵臓性新形成（例えば、腺癌および島細胞腫瘍）、結腸直腸癌、子宮頸癌、精巣癌（例えば、生殖細胞腫瘍）、卵巣癌（例えば、卵巣上皮癌および卵巣生殖細胞腫瘍）、リンパ腫、白血病、悪性黒色腫、神経内分泌腫瘍およびカルチノイド腫瘍に特徴的なものであることが好ましい。
【０１２４】

前記新形成細胞は、新形成性上皮細胞または新形成性乳房細胞であることが好ましい。より詳細には、前記新形成性乳房細胞は悪性乳房細胞である。

【０１２５】

免疫学に基づくLM04検出プロトコールはさまざまな形態をとりうる。例えば、LM04を含む特定の抗原または癌細胞に対して異なる特異性をそれぞれが有する多数の抗体をアレイ内に固定化してもよい。続いて生検標本由来の細胞を抗体アレイと接触させ、固定化された細胞に基づいて癌の種類に関する診断を下すことができる。

【０１２６】

ELISA、ウエスタンブロット分析、免疫沈降分析、免疫蛍光分析、免疫化学分析またはFACS分析などによる、その他のより伝統的なアッセイ法を行うこともできる。

【０１２７】

したがって、本発明は、試料におけるLM04またはその断片、バリアントもしくは誘導体を検出する方法であって、試料を抗体またはその断片もしくは誘導体と接触させること、ならびに前記抗体およびLM04またはその断片、バリアントもしくは誘導体を含む複合体のレベルを正常対照と比較して検出することを含み、LM04のレベルが高いことによって癌の増殖が示されるような方法を提供する。

【０１２８】

以上に考察した通り、複合体の形成を判定するための任意の適した方法を用いうる。例えば、レポーター分子を会合させた本発明による抗体をイムノアッセイ法に用いてもよい。このようなイムノアッセイ法には、当業者には周知であるラジオイムノアッセイ法（RIA）、固相酵素免疫アッセイ法（ELISA）および免疫クロマトグラフィー法（ICT）、ウエスタンブロット法が非制限的に含まれる。例えば、本発明に従って用いうる種々のイムノアッセイ法を開示している「Current Protocols in Immunology」、1994に対して言及することができる。イムノアッセイ法には競合アッセイ法が含まれうる。本発明が定性的および定量的なイムノアッセイ法を含むことは理解されると考えられる。

【０１２９】

適したイムノアッセイ法は、例えば、米国特許第4,016,043号、米国特許第4,424,279号および米国特許第4,018,653号に記載されている。これらには、非競合型の一部位および二部位アッセイ法、ならびに従来の競合結合アッセイ法が含まれる。これらのアッセイ法には、標識した抗原結合分子の標的抗原との直接結合も含まれる。この場合には抗原はLM04またはその断片である。

【０１３０】

二部位アッセイ法は本発明における使用に特に好ましい。これらのアッセイ法にはさまざまな変法が存在し、これらはすべて本発明に含まれるものとする。簡潔に述べると、典型的な順方向アッセイ法では、標識していない抗体などの非標識抗原結合分子を固体基質上に固定化し、検査しようとする試料を結合分子と接触させる。抗体-抗原複合体の形成を許容する期間にわたる、適した期間のインキュベーションの後に、もう1つの抗原結合分子（抗原に対して特異的な第2の抗体が適している）を検出可能なシグナルを生じるレポーター分子で標識したものを添加してインキュベートし、抗体-抗原-標識抗体という別の複合体が形成されるのに十分な期間をおく。反応しなかった材料を洗い流し、レポーター分子によって生じるシグナルのモニターによって抗原の存在を判定する。結果は視認しうるシグナルの単純な観察による定性的なものでもよく、既知の量の抗原を含む対照試料との比較によって定量化してもよい。順方向アッセイ法の変法には、結合した抗体に対して試料および標識抗体の両方を同時に添加する、同時アッセイ法が含まれる。直ちに明らかであると考えられるわずかな変更を含め、これらの技術は当業者には周知である。

【０１３１】

典型的な順方向アッセイ法では、抗原またはその抗原性部分に対する特異性を有する第1の抗体を、固体表面に対して共有的または受動的に結合させる。固体表面は典型的にはガラスまたはポリマーであり、最もよく用いられるポリマーはセルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、塩化ポリビニルまたはポリプロピレンである。固体支持

体はチューブ、ビーズ、マイクロプレートのディスク、またはイムノアッセイ法を行うのに適したあらゆる他の表面の形態をとることができる。結合工程は当技術分野で周知であり、一般に架橋共有結合または物理的吸着からなり、被験試料の調製においてポリマー-抗体複合体を洗浄する。続いて被験試料のアリコートを固相複合体に添加し、十分な期間にわたって適当な条件下でインキュベートして、存在する抗原を抗体に結合させる。インキュベーション期間の後に、抗原-抗体複合体を洗浄して乾燥させた上で、抗原の一部分に対して特異的な第2の抗体とともにインキュベートする。第2の抗体には一般に、第2の抗体と抗原との結合を示すために用いられるレポーター分子が付随している。付随するレポーター分子によって測定される、結合する標識抗体の量は、固定化された第1の抗体と結合した抗原の量に比例する。

【０１３２】

1つの代替的な方法は、生物試料中の抗原を固定化すること、および続いて固定化抗原を特異抗体（これはレポーター分子で標識してもしなくともよい）に対して曝露することを含む。標的の量およびレポーター分子のシグナルの強さに依存して、結合した標的はこの抗体による直接標識化により検出することができる。または、第1の抗体に対して特異的な第2の標識抗体を標的-第1抗体複合体に対して曝露させ、標的-第1抗体-第2抗体という三元性複合体を形成させる。この複合体はレポーター分子が発するシグナルにより検出される。

【０１３３】

以上のことから、抗原結合分子に付随するレポーター分子には以下が含まれうることは理解されると考えられる：

（a）レポーター分子の抗体との直接的な結合；

（b）レポーター分子の抗体との間接的な結合；すなわち、レポーター分子と、後に抗体に結合させる別のアッセイ試薬との結合；および

（c）抗体の以後の反応産物との結合。

【０１３４】

レポーター分子は、色素原、触媒、酵素、蛍光色素、化学発光分子、常磁性イオン、ユーロピウム（Eu^{34}）などのランタニドイオン、、他の核標識タグを含む放射性同位体、および直接観察用標識を含む群より選択しうる。

【０１３５】

直接観察用標識の場合には、コロイド状の金属性もしくは非金属性粒子、色素粒子、酵素もしくは基質、有機ポリマー、ラテックス粒子、リポソーム、またはシグナル生成物質を含む他の小胞などを用いうる。

【０１３６】

レポーター分子として用いるのに適した数多くの酵素が、米国特許第4,366,241号、米国特許第4,843,000号および米国特許第4,849,338号に開示されている。本発明において有用な適した酵素には、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、β-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、リゾチーム、リンゴ酸デヒドロゲナーゼなどが含まれる。酵素は単独で用いてもよく、溶液中にある第2の酵素と組み合わせて用いてもよい。

【０１３７】

適した蛍光色素には、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、テトラメチルローダミンイソチオシアネート（TRITC）、R-フィコエリトリン（RPE）およびテキサスレッドが非制限的に含まれる。蛍光色素のその他の例には、Dowerら、国際公開公報第93／06121号によって考察されたものが含まれる。米国特許第5,573,909号（Singerら）、米国特許第5,326,692号（Brinkleyら）に記載された蛍光色素に対する言及も行いうる。または、米国特許第5,227,487号、米国特許第5,274,113号、米国特許第5,405,975号、米国特許第5,433,896号、米国特許第5,442,045号、米国特許第5,451,663号、米国特許第5,453,517号、米国特許第5,459,276号、米国特許第5,516,864号、米国特許第5,648,270号および米国特許第5,723,218号に記載された蛍光色素に対する言及も行いうる。

【０１３８】
酵素イムノアッセイ法の場合には、一般的にはグルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩により、酵素を第二抗体と結合させる。しかし、容易に認識されるように、当業者が容易に利用しうる結合技術は広範囲にわたってさまざまなものが存在する。特異的な酵素とともに用いられる基質は、一般に、対応する酵素による加水分解により、検出可能な色の変化を生じるように選択される。適した酵素の例には前記のものが含まれる。また、上記の色素原性基質ではなく、蛍光性生成物を生じる蛍光基質を用いることもできる。いずれの場合にも、酵素-標識抗体を第1抗体-抗原複合体に対して添加し、結合させた後に、過剰な試薬を洗い流す。続いて適切な基質を含む溶液を抗体-抗原-抗体という複合体に対して添加する。この基質は第2の抗体と結合した酵素と反応して定性的な視覚シグナルを生じ、これをさらに定量すること（通常は分光測定で）により、試料中に存在した抗原の量に関する指標が得られる。

【０１３９】
または、フルオレセイン、ローダミンおよびランタニドであるユーロピウム（EU）などの蛍光化合物を、抗体に対して、その結合能力を変化させることなく化学的に結合させることもできる。特定の波長の光を照射することによって活性化されると、蛍光色素標識抗体は光エネルギーを吸収して分子の励起状態を誘導し、その後に、光学的顕微鏡による視覚的検出が可能な特徴的な色調の光を放射する。蛍光標識抗体を第1抗体-ハプテン複合体と結合させる。結合していない試薬を洗い流した後に、残っている三元性複合体に適当な波長の光を照射する。観察される蛍光は目的の抗原の存在を示す。免疫蛍光アッセイ法（IFMA）は当技術分野で十分に確立されており、本方法にとっても特に有用である。しかし、放射性同位元素、化学発光分子または生物発光分子などの他のレポーター分子を採用することもできる。

【０１４０】
もう1つの態様において、検出のための方法は、LM04をコードするポリヌクレオチドの細胞内での発現レベルを検出することを含む。前記ポリヌクレオチドの発現は、任意の適した技術を用いて判定しうる。例えば、LM04をコードする標識ポリヌクレオチドを、細胞から入手したRNA抽出物のノーザンブロットにおけるプローブとして利用することができる。RT PCR、リアルタイムPCRまたはSAGEなどの核酸増幅反応において、動物由来の核酸抽出物を、キナーゼをコードするポリヌクレオチドまたはその隣接配列のセンス配列およびアンチセンス配列に対応するオリゴヌクレオチドプライマーとともに用いることが好ましい。さまざまな自動化された固相検出法も適している。例えば、極めて大規模な固定化プライマーアレイ（ヴィーエルシップス（VLSIPS）（商標））を、例えば、Fodorら、1991およびKazalら、1996に記載されたように、核酸の検出に用いる。以上の遺伝学的方法は当業者に周知である。

【０１４１】
例えば、LM04をコードするRNA転写物を検出するために、LM04 RNAを含むことが疑われる細胞試料からRNA（例えば、ヒト乳癌組織から単離された全RNA）を単離する。RNAは、当技術分野で知られた方法、例えばトライゾール（TRIZOL）（商標）試薬（GIBCO-BRL／Life Technologies、Gaithersburg、Md.）を用いて単離しうる。オリゴ-dTまたはランダム配列オリゴヌクレオチド、ならびに配列特異的なオリゴヌクレオチドを、単離したRNAから第一鎖cDNAを調製するための逆転写酵素反応におけるプライマーとして用いることができる。続いて、その結果得られた第一鎖cDNAを、PCR反応において配列特異的オリゴヌクレオチドを用いて増幅し、増幅産物を得る。

【０１４２】
「ポリメラーゼ連鎖反応」または「PCR」とは、米国特許第4,683,195号に記載されたように、核酸、RNAおよび／またはDNAのあらかじめ選択した断片の量を増幅する、手順または技術のことを指す。一般的には、目的の領域の末端またはそれを超える範囲からの配列情報を利用してオリゴヌクレオチドプライマーを設計する。これらのプライマーは、増幅しようとする鋳型の対側鎖と配列の点で同一または類似していると考えられる。PCRは特定

のRNA配列および全細胞RNAから転写されたcDNAを増幅するために用いうる。概論については、Mullisら、1987；Erlich、1989を参照されたい。このため、PCRによる特定の核酸配列の増幅は、保存的なヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドまたは「プライマー」に依拠しており、この保存配列は、関連した遺伝子配列またはタンパク質配列のアライメント、例えば哺乳動物LM04遺伝子の配列比較によって導き出される。例えば、アンチセンス鎖とアニーリングすると予想される1つのプライマーを調製し、LM04をコードするcDNA分子のセンス鎖とアニーリングすると予想されるもう1つのプライマーを調製する。

【０１４３】

増幅産物を検出するためには、反応混合物を一般的にはアガロースゲル電気泳動または他の好都合な分離法にかけ、増幅されたLM04特異的DNAの相対的な存在量を検出する。例えば、増幅されたLM04 DNAを、特異的オリゴヌクレオチドプローブを用いるサザンハイブリダイゼーションを用いて、または電気泳動移動度を既知の分子量のDNA標準物質と比較して、検出することができる。増幅されたLM04 DNAの単離、精製および特徴分析は、断片をゲルから切り出すこと、または溶出させること（例えば、Lawnら、1981；Goeddelら、1980による参照文献を参照されたい）、増幅産物をpCRIIベクター（Invitrogen）などの適したベクターのクローニング部位にクローニングすること、クローニングされた挿入断片の配列を決定すること、およびDNA配列をLM04の既知の配列と比較することによって行いうる。続いて、LM04 mRNAおよびcDNAの相対量を決定することができる。

【０１４４】

本発明は、高レベルのLM04を発現する細胞を含む、あらゆる新生物を検出するために用いうる。

【０１４５】

本発明の方法は、新生物の発生リスクがあると考えられる個体の単回検査もしくは継続的なモニターとして、または新生物の発生、特に上皮細胞癌、最も具体的には乳癌の発生を抑制もしくは別の様式で緩徐化することを目標とする治療的もしくは予防的処置療法の有効性のモニターとして、有用である。これらの状況において、任意の1つまたは複数のクラスの生物試料におけるLM04レベルの変化をマッピングすることは、個体の状態または現在使用中の治療的もしくは予防的療法の有効性に関する有意義な指標となる。したがって、本発明の方法は、正常レベル（本明細書中に以前に定義した）と対比した、または前記個体の生物試料から測定した1つもしくは複数の初期マーカーレベルと対比した、個体におけるマーカーレベルの上昇または低下に関するモニターに対しても適用される。

【０１４６】

したがって、本発明のもう1つの局面は、対象における新生物の発生または進行をモニターする方法であって、前記対象からの生物試料におけるLM04またはLM04をコードする遺伝子の転写産物のレベルに関するスクリーニングを行うことを含み、正常細胞のレベルと比較して前記LM04または転写産物のレベルが高いことによって新生物が示されるような方法を提供する。

【０１４７】

本発明はさらに、患者からの新形成細胞と疑われるものにおけるLM04の相対レベルを決定するための定量的または半定量的な診断キットの製造における、LM04に対するモノクローナル抗体の使用を考えている。本キットには使用に関する指示書が付属してよく、自動化もしくは半自動化してもよく、または自動化された機器もしくはソフトウエアと適合する形態にあってもよい。

【０１４８】

本発明による、LM04に対する抗体の作製は、この分子の活性型または不活性型を標的としうる。活性LM04を標的とする抗体は、LM04活性の上昇または低下を検出するために特に有用である。

【０１４９】

LM04の癌特異的分子、特に乳癌特異的分子としての同定により、癌細胞を破壊する、または少なくともその増殖を遅延させる標的指向性薬剤の作製が可能になる。特に、LM04特異

抗体を含む癌標的指向性薬剤を、細胞増殖抑制剤または殺細胞剤と融合、結合または別の様式で付随させる。このような作用物質には、タンパク質レベルまたは対応するmRNAまたはDNAレベルで作用する細胞死誘導剤または細胞分裂停止剤が非制限的に含まれる。例えば、細胞増殖抑制剤または殺細胞剤は核標識タグであってもよく、またはLM04 RNAiのアンタゴニストもしくはRNAオリゴヌクレオチドの誘導を促進する作用物質でもよい。

【０１５０】

したがって、本発明の1つの局面は、LM04調節性細胞増殖を調節する方法であって、前記細胞を、LM04の発現またはLM04の機能活性を調節するのに十分な時間および条件の下で作用物質の有効量と接触させることを含み、前記発現または活性の阻害または別の様式での拮抗によって前記細胞増殖が下方制御されるような方法を提供する。

【０１５１】

「LM04調節性細胞増殖」に対する言及は、LM04によって直接的もしくは間接的に誘導される、または別の様式で調節される、増殖活性に対する言及と解釈される必要がある。

【０１５２】

本発明を何らかの1つの理論または作用機序に限定するものではないが、LM04発現の上方制御は無秩序な乳房細胞増殖、特に上皮乳房細胞増殖のマーカーとして同定されている。しかし、本明細書に開示する診断的、治療的および予防的な方法は、無秩序な乳房細胞増殖には限定されず、LM04によって増殖が直接的または間接的に調節される任意の細胞種にも及ぶことが理解される必要がある。

【０１５３】

本発明は、より詳細には、LM04調節性乳房細胞増殖を調節する方法であって、前記細胞を、LM04の発現またはLM04の機能活性を調節するのに十分な時間および条件の下で作用物質の有効量と接触させることを含み、前記発現または活性の阻害または別の様式での拮抗によって前記細胞増殖が下方制御されるような方法を提供する。

【０１５４】

LM04の発現または活性の拮抗は部分的でも完全でもよい。部分的な調節は、所定の細胞内でみられるLM04の発現または活性の一部のみが下方制御される場合に起こる。LM04の発現または機能活性は下方制御される。

【０１５５】

LM04の発現またはLM04の機能活性の下方制御は、以下のものを非制限的に含む、さまざまな技術のいずれか1つによって実現しうる：

（i）LM04遺伝子の、またはその発現産物がLM04発現を調節する遺伝子の、転写および／または翻訳の調節を変化させるタンパク質性または非タンパク質性分子を細胞内に導入すること。

（ii）LM04と、そのリガンド（例えば、bdb1、Nb1、CL1M、CtIPまたはBRCA1）の1つまたは複数との間の相互作用に拮抗するタンパク質性または非タンパク質性分子を細胞内に導入すること。

【０１５６】

LM04の上方制御もある種の状況では望まれ、これはLM04、LM04またはその誘導体、化学的等価物、相同体または模倣物、またはLM04とそのリガンドとの間の相互作用を作動させる、またはその活性もしくはLM04発現を別の様式で上方制御するタンパク質性もしくは非タンパク質性分子を細胞内に導入することによって実現しうる。

【０１５７】

「作用物質（agent）」に対する言及は、以上の目的を実現する任意のタンパク質性または非タンパク質性分子に対する言及と解釈される必要があり、これには例えば、以上の箇所で詳述した分子が含まれる。本作用物質は、任意のタンパク質性または非タンパク質性分子と連結、結合または別の様式で会合させうる。例えば、これをその局所領域、例えば乳房へのそのターゲティングを可能にする分子と会合させてもよい。

【０１５８】

前記タンパク質性分子は、天然、組換えまたは合成の供給源に由来するものでよく、これ

には融合タンパク質、または例えば、天然物スクリーニングによるものが含まれる。前記非タンパク質性分子は天然の供給源、例えば天然物スクリーニングなどに由来してもよく、または化学的に合成してもよい。本発明は、LM04相互作用のアンタゴニストとして作用しうる前記LM04の化学的類似体を考えている。アンタゴニストは、前記LM04が相互作用するのを阻止、抑制または別の様式で妨げるうる任意の化合物であってよい。アンタゴニストには、前記LM04または前記LM04の部分に対して特異的なモノクローナル抗体、および当該細胞における遺伝子またはmRNAの転写または翻訳を妨げるアンチセンス核酸が含まれる。発現の修飾を、共抑制に用いるのに適した、またはLM04 mRNA転写物のRNAiを介した下方制御を誘導するための、抗原、RNA、リボソーム、DNAザイム（DNAzyme）、RNAアプタマー、抗体または分子を利用して実現することもできる。

【０１５９】

前記作用物質の合成源には、例えば、化学合成された分子が含まれる。別の例としては、ファージディスプレイライブラリーをペプチドに関してスクリーニングすることができ、一方、化学物質ライブラリーを既存の低分子に関してスクリーニングすることができる。合理的薬剤設計／構造に基づく設計は、結晶化を行って、さらにLM04結合部位を分析し、設計によって分子をその部位に適合化することによって行いうる。

【０１６０】

例えば、LM04の化学的または機能的等価物を、コンビナトリアル化学もしくは組換えライブラリーのハイスループットスクリーニングなどの周知の方法を利用して、または天然物スクリーニングにより、設計および／または同定することが可能である。

【０１６１】

もう1つの例においては、多数の特定の親原子団置換を有する有機分子を用いる、有機低分子を含むライブラリーをスクリーニングする。一般的な合成スキームは発表された方法に従いうる（例えば、Buninら、1994；DeWittら、1993）。簡潔に述べると、連続した合成段階のそれぞれで、選択した複数の異なる置換基の1つをアレイ内のチューブの選択したサブセットのそれぞれに付加し、ライブラリーの作製に用いた異なる置換基の可能なすべての順列組み合わせが生成されるようにチューブのサブセットを選択する。適した順列組み合わせ戦略の一つは米国特許第5,763,263号に概説されている。

【０１６２】

生物活性のある化合物の探索のためにランダムな有機分子のコンビナトリアルライブラリーを用いることには、現在、幅広い関心がある（例えば、米国特許第5,763,263号を参照されたい）。この種のライブラリーのスクリーニングによって見いだされたリガンドは、天然のリガンドを模倣もしくは遮断するため、または生物標的の天然のリガンドと干渉させるために有用な可能性がある。例えば、この状況では、より強力な薬理作用などの特性を示す類似体を開発するための出発点としてそれらを用いることができる。LM04またはその機能性部分は、本発明によれば、さまざまな固相または液相合成方法によって形成されたコンビナトリアルライブラリーに用いうる（例えば、米国特許第5,763,263号およびそれに引用された参照文献を参照されたい）。米国特許第5,753,187号に開示されたものなどの技術を用いることにより、数百万種の新たな化学的および／または生物学的な化合物を数週間未満で日常的にスクリーニングすることができる。同定された多数の化合物の中から、適切な生物活性を示すもののみをさらに分析する。

【０１６３】

ライブラリーのハイスループットスクリーニング方法に関しては、生体分子、高分子複合体または細胞などの選択した生物因子と特異的に相互作用しうるオリゴマーライブラリーまたは低分子ライブラリーの化合物を、当業者が上記のものなどの周知の方法の範囲から容易に選択しうるコンビナトリアルライブラリー装置を利用してスクリーニングする。この種の方法では、ライブラリーの各メンバーを、選択した因子と特異的に相互作用する能力に関してスクリーニングする。本方法を実施する際には、化合物を含むチューブに生物因子を入れ、各チューブ内の個々のライブラリー化合物と相互作用を行わせる。相互作用は、所望の相互作用の存在をモニターするために用いうる検出可能なシグナルが生じるよ

うに設計する。生物因子は水溶液中に存在することが好ましく、所望の相互作用に応じてさらに条件の適合化を行う。検出は、例えば、物質の検出のための、機能または機能以外のものに基づく任意の周知の方法によって行うことができる。

【０１６４】

LM04の活性を模倣する分子に関するスクリーニングに加えて、LM04の機能活性を上方制御または下方制御する目的で、作動性または拮抗性に働く分子を同定および利用することも望ましいと考えられる。このような分子の使用については以下でさらに詳細に説明する。主題分子がタンパク質性である範囲で、それは例えば、天然または組換えの供給源に由来するものでよく、これには融合タンパク質、または例えば、上記のスクリーニング方法によるものが含まれる。非タンパク質性分子は例えば、以上に特定した方法に従って同定または作製された化学分子または合成分子であってよい。したがって、本発明は、アゴニストまたはアンタゴニストとして作用しうる化学的類似体の使用を考えている。化学的アゴニストは必ずしもLM04に由来しなくともよく、高次構造にある程度の類似性があればよい。または、化学的アゴニストを、LM04のある種の物理化学的特性を模倣するように特別に設計することもできる。

【０１６５】

本明細書中に以前に定義した調節性物質に関するスクリーニングは、LM04を含む細胞を作用物質と接触させること、およびLM04に関連した機能活性の変化、または下流のLM04細胞標的活性もしくは発現の変化に関してスクリーニングを行うことを非制限的に含む、いくつかの適した方法の任意の1つによって行いうる。このような変化の検出は、ウエスタンブロット法、電気泳動移動度シフトアッセイ法および／またはスフィンゴシンキナーゼもしくはルシフェラーゼ、CATなどのTRAF活性のレポーターの読み取りといった方法を利用して行いうる。

【０１６６】

LM04タンパク質は検査の対象である細胞内に天然に存在するものでもよく、またはそれをコードする遺伝子を検査の目的で宿主細胞にトランスフェクトしてもよいことが理解される必要がある。さらに、天然の遺伝子またはトランスフェクトした遺伝子を構成性に発現させ、それによってLM04の発現または活性を下方制御する作用物質に関するスクリーニングのために特に有用なモデルを提供してもよく、または遺伝子に活性化を必要とさせ、それによって特定の賦活条件下でLM04の発現または活性を変化させる作用物質に関するスクリーニングのために特に有用なモデルを提供としてもよい。さらに、LM04核酸分子を細胞にトランスフェクトする範囲において、その分子はLM04遺伝子全体を含んでもよく、またはそれはLM04結合部分などの遺伝子の一部分のみを含んでもよい。

【０１６７】

もう1つの例において、検出の対象は、LM04自体ではなく、CtIPまたはBRCA1などの下流のLM04調節性標的でもありうる。さらにもう1つの例は、LM04結合部位が最小限のレポーターと連結されたものを含む。これは、LM04によって活性が調節される分子の変化をモニターする系の一例である。例えば、スクリーニング系の対象である細胞が新形成細胞である場合には、細胞増殖の変化に関するスクリーニングによってLM04の発現または活性の変化を検出しうると考えられる。

【０１６８】

したがって、本発明のもう1つの局面は、LM04の発現またはLM04の機能活性を調節しうる作用物質を検出するための方法であって、前記LM04またはLM04を含む細胞またはその抽出物を作用物質と推定されるものと接触させること、および前記相互作用に伴う発現表現型の変化を検出することを含む方法を提供する。

【０１６９】

「前記相互作用に伴う発現表現型の変化」を検出することに対する言及は、LM04の発現またはLM04活性の調節に伴う細胞変化の検出と解釈される必要がある。これらは例えば、細胞内変化または細胞外で観察可能な変化として検出しうる。これには例えば、下流産物のレベルまたは活性の変化を検出することが非制限的に含まれる。

【０１７０】
1つの関連した局面において、本発明は、本明細書中に以前に定義した方法のいずれかを利用することによって同定される作用物質に対しても適用される。この点に関して、作用物質に対する言及は、LM04に関連した機能活性の少なくとも1つを変化させる任意のタンパク質性または非タンパク質性分子に対する言及と解釈される必要がある。
【０１７１】
前記タンパク質性または非タンパク質性分子は、LM04の発現またはLM04活性を直接的または間接的に調節するように作用しうる。前記分子は、それがLM04分子と会合するならば直接的に作用する。前記分子は、それがLM04以外の分子と会合し、その分子がLM04の発現または活性を直接的または間接的に調節するならば、間接的に作用する。したがって、本発明の方法は、調節段階のカスケードの誘導を介したLM04の発現または活性の調節を含む。
【０１７２】
好ましい方法はLM04の発現またはLM04の機能活性を下方制御することであるが、例えばLM04の発現またはLM04の機能活性を上方制御することにより、制御的な様式で増殖を上方制御することが望ましい状況もあると考えられる。したがって、本発明の方法はこのような用途にも及ぶと解釈される必要がある。
【０１７３】
本発明の方法に従って処置を受ける細胞はエクスビボまたはインビボのいずれに位置してもよいことが理解される必要がある。「エクスビボ」とは、細胞が対象の身体から取り出され、その増殖の調節をインビトロで惹起しうることを意味する。例えば、細胞が長期培養を行おうとし、このため継続的なLM04誘導性増殖を行うように刺激される非新形成細胞であって、増殖がLM04活性のアゴニストによって上方制御されてもよい。本発明の好ましい局面によれば、細胞はインビボ（乳房内など）に位置する悪性細胞などの新形成細胞であってよく、その増殖の下方制御は、LM04のレベルを下方制御するために本発明の方法をインビボで適用することによって実現されると考えられる。
【０１７４】
本発明のさらにもう1つの局面は、疾病状態の治療および／または予防に関連した本発明の使用に関する。本発明を何らかの1つの理論または作用機序に限定するものではないが、LM04は乳房細胞の増殖を調節することが示されている。したがって、本発明の方法は、異常または別の様式で不要なLM04調節性増殖活性を調節するための有意義なツールを提供する。
【０１７５】
したがって、本発明のもう1つの局面は、哺乳動物における、異常な、不要なまたは別の様式で不適切なLM04調節性増殖活性を特徴とする状態の治療および／または予防のための方法であって、LM04の発現またはLM04の機能活性を調節するのに十分な時間および条件の下で、作用物質の有効量を前記哺乳動物に投与することを含み、前記発現または活性の阻害または別の様式での拮抗によって前記細胞増殖が下方制御されるような方法を対象とする。
【０１７６】
「異常な、不要なまたは別の様式で不適切な」細胞増殖に対する言及は、過度に活動的な細胞増殖、生理的には正常であるが不要である点で不適切な細胞増殖、または不十分な細胞増殖に対する言及と解釈される必要がある。例えば、乳房細胞におけるLM04の発現は、分化の調節不全をもたらし、その後には無秩序な乳房細胞増殖につながると考えられている。
【０１７７】
したがって、1つの好ましい態様においては、新形成性状態の治療および／または予防のための方法であって、LM04の発現またはLM04の機能活性を下方制御するのに十分な時間および条件の下で作用物質の有効量を前記哺乳動物に投与することを含み、前記発現または活性の阻害または別の様式での拮抗によって細胞増殖が下方制御されるような方法が提供される。

【０１７８】
好ましくは、前記新形成性状態は乳癌である。
【０１７９】
「哺乳動物」という用語には、本明細書で用いる場合、ヒト、霊長動物、家畜動物（例えば、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ロバ）、試験検査用動物（例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモット）、伴侶動物（例えば、イヌ、ネコ）および捕獲された野生動物（例えば、キツネ、カンガルー、シカ）を含むものと解釈される必要がある。哺乳動物はヒトまたは試験検査用動物であることが好ましい。さらにより好ましくは、哺乳動物はヒトである。
【０１８０】
「有効量」とは、少なくとも一部、所望の応答を得るため、または治療しようとする特定の状態の発生を遅延させるため、もしくは進行を抑制するため、もしくはその発生もしくは進行を完全に停止させるために必要な量のことを意味する。その量は治療しようとする個体の健康状態および身体状態、治療しようとする個体の分類群、所望の防御の程度、組成物の処方、医学的状態の評価、ならびに他の関連要因によって異なる。その量は比較的広い範囲にわたり、それは日常的な試験によって決定しうると考えられる。
【０１８１】
本明細書における「治療」および「予防」に対する言及は、その最も広い文脈で考える必要がある。「治療」という用語は必ずしも対象を完全に回復するまで治療することを意味するわけではない。同様に、「予防」は必ずしも対象が疾病状態に決して罹患しないことを意味するわけではない。したがって、治療および予防には、特定の状態の症状の改善、または特定の状態が発生するリスクを防止もしくは別の様式で軽減することを含む。「予防」という用語は、特定の状態の重症度または発生を軽減することと見なしうる。「治療」も既存の状態の重症度を軽減しうる。
【０１８２】
本発明はさらに、癌の治療において哺乳動物の体内に細胞毒性物質を循環させること、または放射線療法を受けさせることとともに作用物質を投与するといった、治療法の組み合わせを考えている。
【０１８３】
薬学的組成物の形態としての調節性物質の投与は、任意の好都合な手段によって実施しうる。薬学的組成物の調節性物質は、ある量を投与した場合に治療的活性を示すと考えられる、その量は個々の場合に応じて決まる。その差異は、例えば、ヒトであるか動物であるか、および選択した調節性物質に依存する。広範囲にわたる用量を適用しうる。例えば、患者を考えた場合には、体重1kg当たり1日につき約0.1mg～約1mgの調節性物質を投与しうる。投与計画は最適な治療応答が得られるように調節することができる。例えば、数回に分割した用量を毎日、毎週、毎月または他の適した間隔で投与してもよく、または状況の必要性によって指定される程度に比例して用量を減らしてもよい。
【０１８４】
調節性物質は、経口、静脈内（水溶性の場合）、腹腔内、筋肉内、皮下、皮内、または座薬経路もしくは移植（例えば、徐放性分子を用いる）等の好都合な様式で投与することができる。調節性物質を、酸付加塩または金属複合体、例えば亜鉛、鉄など（これはこの用途の目的用の塩と考えられる）などの、薬学的に許容される非毒性塩の形態で投与してもよい。このような酸付加塩の例には、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩、マレイン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、安息香酸塩、コハク酸塩、リンゴ酸塩、アスコルビン酸塩、酒石酸塩などがある。活性成分を錠剤の形態で投与する場合には、錠剤はトラガカントゴム、コーンスターチまたはゼラチンなどの結合剤；アルギン酸などの崩壊剤；およびステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤を含みうる。
【０１８５】
投与の経路には、呼吸器、気管内、鼻咽頭、静脈内、腹腔内、皮下、頭蓋内、皮内、筋肉内、眼内、髄腔内、小脳内、鼻腔内、注入、経口、直腸内、IV滴下パッチおよびインプラ

ントが非制限的に含まれる。

【０１８６】

これらの方法によれば、本発明に従って定義される作用物質を、1つまたは複数の他の化合物または分子と同時投与することもできる。「同時投与される」とは、同一製剤における、または同じ経路もしくは異なる経路を介した2種類の製剤における同時投与、または同じ経路もしくは異なる経路による逐次的投与のことを意味する。例えば、主題作用物質を、その効果を高める目的で作動性物質とともに投与することができる。「逐次的」投与とは、2種類の分子の投与の間に秒、分、時間または日の時間差があることを意味する。これらの分子は任意の順序で投与しうる。

【０１８７】

本発明のもう1つの局面は、異常な、不要なまたは別の様式で不適切なLM04調節性細胞増殖を特徴とする状態である、哺乳動物における状態の治療のための医薬品の製造における、本明細書中に以前に定義した作用物質の使用であって、前記作用物質がLM04の発現またはLM04の活性を調節し、前記発現または活性の阻害または別の様式での拮抗によって前記細胞増殖が下方制御されるような使用を考えている。

【０１８８】

さらにもう1つの局面において、本発明は、本明細書中に以前に定義した調節性物質を、1つまたは複数の薬学的に許容される担体および／または希釈剤とともに含む、薬学的組成物を考えている。前記作用物質は活性成分と呼ばれる。

【０１８９】

注射用に適した薬剤剤形には、滅菌水溶液（水溶性の場合）または滅菌注射用溶液もしくは分散液の用時調製のための分散液および滅菌粉末が含まれ、これはクリームまたは外用に適したその他の剤形であってもよい。これは製造および貯蔵の条件下で安定でなければならず、細菌や真菌などの微生物の汚染作用から保護されねばならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液状プロピレングリコールなど）、適切なそれらの混合物および植物油を含む溶媒または分散媒体でありうる。適切な流動性は、例えばリシチンなどの被覆の使用により、分散剤の場合は要求される粒子サイズの維持により、および界面活性剤の使用により、維持することができる。微生物の作用の防止は種々の抗細菌剤および抗カビ剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チルメロサルなどによって行うことができる。多くの場合には、等張剤、例えば、糖類または塩化ナトリウムを含めることが好ましい。注射用組成物の長期的吸収は、組成物において吸収遅延剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどを用いることによって行いうる。

【０１９０】

滅菌注射液は、必要な量の活性化合物を、必要に応じて上に挙げたさまざまな他の成分とともに適切な溶媒中に組み入れ、濾過滅菌することによって調製される。一般に、分散液は、滅菌されたさまざまな活性成分を、基本的な分散媒および上に挙げた必要な他の成分を含む滅菌媒体中に組み入れることによって調製される。滅菌注射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合には、好ましい調製法は真空乾燥法および凍結乾燥法であり、これらの方法により、あらかじめ滅菌濾過したその溶液から活性成分および補足的な所望の成分の粉末を得る。

【０１９１】

活性成分は適切に保護すると、例えば、不活性希釈剤または吸収性の可食担体とともに経口投与することができ、または硬カプセルもしくは軟カプセル内に封入することができ、または錠剤として圧縮することもできる。経口治療投与のためには、活性化合物は賦形剤とともに取り込まれ、摂取しうる錠剤、バッカル錠剤、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤、カシェ剤などの形で使用される。このような組成物および調製物は活性成分を重量比で少なくとも1%含むべきである。組成物および調製物のこの比率は当然ながら変動しうるものであり、その単位の重量の約5%～約80%の間にあるのが好都合である。このような治療上有用な組成物中の活性化合物の量は適した投与量が得

られるようなものである。本発明の好ましい組成物および調製物は経口投与単位剤形が約0.1μg～2000mgの間の活性化合物を含むように調製される。

【０１９２】

錠剤、トローチ剤、丸剤、カプセル剤などは以下に挙げるような成分も含みうる。ゴム、アカシアゴム、コーンスターチまたはゼラチンなどの結合剤；リン酸カルシウムなどの賦形剤；コーンスターチ、ジャガイモデンプン、アルギン酸などの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤；およびスクロース、乳糖またはサッカリンなどの甘味剤を添加することができ、ペパーミント、冬緑油またはチェリー香味剤などの香味剤も添加しうる。単位投薬剤形がカプセルの場合は、それは上記の種類の物質に加えて液状の担体も含みうる。単位投薬剤形の物理的形態を被覆剤としてまたは別の様式で改変するための他のさまざまな物質が存在する。例えば、錠剤、丸剤またはカプセル剤はセラック、糖またはその両方で被覆することができる。シロップ剤またはエリキシル剤は活性化合物、甘味剤として砂糖、防腐剤としてメチルおよびプロピルパラベン、色素およびチェリー香味剤またはオレンジ香味剤を含みうる。当然ながら、どの単位投薬剤形の調製に使用される物質もすべて薬学的に純粋で使用する量では実質的に無毒であるべきである。さらに、（1つまたは複数の）この活性化合物は徐放性の調製物および製剤に含めることができる。

【０１９３】

本薬学的組成物は、標的細胞をトランスフェクトしうるベクターであって、調節性物質をコードする核酸分子を有するベクターなどの遺伝分子を含むこともできる。ベクターは、例えば、ウイルスベクターであってよい。

【０１９４】

本発明のさらにもう1つの局面は、本発明の方法に用いる場合の、本明細書中に以前に定義した作用物質に関する。

【０１９５】

本発明を以下の非制限的な例によってさらに定義する。

【０１９６】

実施例1

LIMドメインタンパク質LM04は乳房上皮細胞のインビトロでの分化を阻害し、乳癌内で過剰発現される

材料および方法

細胞系

大部分の細胞系は以前の研究で引用されている（Douglas, A.M.、Grant, S. L.、Goss, G.A.、Clouston, D.R.、Sutherland, R. L. & Begley, C. G. (1998) Int J Cancer 75、64-73）。SCp2乳房上皮細胞（Desprez, P.-Y.、Roskelley, C.、Campisi, J. & Bissell, M. J. (1993) Mol. Cell. Diff 1、99-110）はM. Bissell博士から寄贈いただいた。

【０１９７】

インサイチューハイブリダイゼーション

マウスLmo4は、ウサギ抗Ldb1抗血清を用いるアフィニティークロマトグラフィーによってマウスT細胞から単離した（19）。Lmo4の精製およびクローニングは別の箇所に記載されている（K. H.）。完全長ヒトLM04（ATCCから、アクセッション番号T09407）またはマウスLm04 cDNAをBluescript SKII（Stratagene）中にクローニングした。アンチセンスおよびセンスリボプローブはT3またはT7 RNAポリメラーゼ（Promega）をジゴキシゲニン-UTP（Roche）とともに用いて作製した。標準的なインサイチューハイブリダイゼーションを記載の通りに行った（Wilkinson, D. (1992)「In Situ Hybridisation」（IRL、New York））。乳癌組織アレイは、Clinomics社から購入するか、Peter MacCallum Cancer Institute（PMCI）（Melbourne、Australia）の乳癌試料から調製した。標本はすべて匿名の保存組織標本であった。Peter MacCallumの組織内審査委員会が組織アレイ分析のためのPMCI標本の使用を承認している。

【０１９８】

SCp2細胞分化アッセイ法

SCp2乳房上皮細胞（Desprez, P.-Y.、Roskelley, C.、Campisi, J. & Bissell, M. J. (1993) Mol. Cell. Diff 1: 99-110）を、DMEM-HAM、10％FCSおよびインスリン5μg／ml（Sigma）を含むDMEM-F12培地中で継代した。Lmo4またはLdb1に対応する完全長マウスcDNAを、pEF1a-puroおよびpEF1a-Flag-puro哺乳動物発現ベクターの両方にクローニングした（Huang, D.C.、Cory, S. & Strasser, A. (1997) Oncogene 14、405-14）。タンパク質発現は293T細胞の一過性トランスフェクションによって確認した。線状化発現ベクター（10μg）を、Superfect（Qiagen）を用いてSCp2細胞に導入し、ピューロマイシン中に8～10日おいて選択した。続いて、適切な遺伝子またはベクターのみ（対照）を発現する安定的トランスフェクタントのプールを、本質的には記載された通りに分化アッセイ法に用いた（Desprez, P.-Y.、Roskelley, C.、Campisi, J. & Bissell, M. J. (1993) Mol. Cell. Diff 1: 99-110）。A. Parlow博士（National Hormone and Pituitary Program）に寄贈いただいた、インスリン（5μg／ml）、ヒドロコルチゾン（1μg／ml）およびプロラクチン（5μg／ml）を含むDMEM-F12の添加によってトランスフェクタントの分化を誘導した。96時間後に細胞をRNA抽出のためにそのまま収集した。

【０１９９】

RNA分析およびRT-PCR

ポリ(A)$^+$ RNAのノーザン分析は以前の記載の通りに行った（Visvader, J.、Begley, C. G. & Adams, J. M. (1991) Oncogene 6、187-94）。ECM上にあるSCp2細胞からRNAzol（Tel-Test）を用いて全RNAを単離した。cDNA合成およびPCRは、β-カゼイン、WapおよびHprtに対するプライマーを用いて（Weiss, M.J.、Keller, G. & Orkin, S. H. (1994) Genes Dev 8、1184-97）、以前の記載の通りに行った（Weiss, M.J.、Keller, G. & Orkin, S. H. (1994) Genes Dev 8、1184-97）。β-カゼインプライマーの配列は以下の通りとした：順方向

5’- ATGAAGGTCTTCATCCTCGCCTGCC-3’ (配列番号 :1)

および逆方向

5’- GCTGGACCAGAGACTGAGGAAGGTGC-3’ (配列番号 :2)

。Wapプライマーの配列は以下の通りとした：順方向

5’-TAGCAGCAGATTGAAAGCATTATG-3’ (配列番号 :3)

および逆方向

5’-GACACCGGTACCATGCGTTG-3’ (配列番号 :4)

。試料をアガロースゲル上で分離し、臭化エチジウム染色し、ブロッティングを行った上で特異的内部オリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせた。

【０２００】

免疫沈降およびウエスタン分析

安定的にトランスフェクトされたSCp2プールから、細胞をプロテアーゼ阻害薬を含むKALB可溶化バッファー（Nicholson, S.E.、Wilison, T.A.、Farley, A.、Starr, R.、Zhang, J.G.、Baca, M.、Alexander, W.S.、Metcalf, D.、Hilton, D. J. & Nicola, N. A. (1999) EMBO J 18、375-85）中で溶解させることにより、全細胞可溶化物を作製した。タンパク質を抗Flag M2（Sigma）およびプロテインGセファロース（Pharmacia）を用いて免疫沈降させ、SDS-PAGE（Novex）によって分離した。移行させた後にフィルターをブロットし、完全長マウスLmo4またはC末端Ldb1ポリペプチドに対するウサギ抗血清とともにインキュベートした（19）。抗体結合はECL（Amersham）によるペルオキシダーゼ結合抗マウス抗体によって可視化した。

【０２０１】

免疫組織化学

免疫染色のために、組織アレイ（Clinomics）を、ラット抗LMO4モノクローナル抗体を含

む上清とともにインキュベートし、続いてビオチン化抗ラットIgGおよびHRP-Streptavidin（Dako）とともにインキュベートした後に、DAB（Dako）による検出を以前の記載の通りに行った（Armes, J.E.、Trute, L.、White, D.、Southey, M.C.、Hammet, F.、Tesoriero, A.、Hutchins, A.M.、Dite, G.S.、McCredie, M.R.、Giles, G.G.、Hopper, J. L. & Venter, D. J. (1999) Cancer Res 59、2011-7）。LMO4モノクローナル抗体の作製は別の箇所に記載されている。用いた他の一次モノクローナル抗体は以下の通りである：抗ERα（1D5）、抗PgR（636）および抗ErbB2（いずれもDako）。

【０２０２】

実施例2

LMO4はマウス乳腺において発生段階に伴う調節を受ける

インサイチューハイブリダイゼーション分析により、Lmo4が妊娠期間中に乳腺の腺房小葉単位で顕著に発現されることが判明した（図1A）。この時期には腺房小葉の形成および拡張を伴う急速な増殖がみられる。単層として認められる未性交体の乳腺、授乳初期および退縮期の乳腺の乳管上皮内に存在したLmo4 mRNAはそれよりも低いレベルであった。未性交体の乳腺では周囲間質の染色も明らかであった。妊娠体の乳腺における高レベルのLmo4（図1A）がノーザン分析によって確認され、それにより、妊娠中期（第12日）をピークとして妊娠後期まで高値を保つ（図1B）2種類の主な転写物（約1.8および2.3kb）のレベルが判明した。興味深いことに、Lmo4発現は授乳期には低下したが、これは退縮期には上方制御されるように思われた。

【０２０３】

実施例3

LMO4遺伝子およびLDB1遺伝子の強制的発現によって乳房上皮細胞におけるβ-カゼイン合成が阻害される

Lmo4は、いくつかのLIMドメイン含有タンパク質のアダプターとして働く核タンパク質であるLdb1と高い親和性で結合する。Lmo4およびそのパートナータンパク質であるLdb1の乳房分化における役割を検討するために、本発明者らは、Lmo4およびLdb1 RNAを中等度レベルで発現するSCp2乳房上皮細胞にこれらの遺伝子を導入した（図3）。SCp2細胞系は妊娠中期マウスの乳腺から当初単離されたもので、細胞外マトリックス（ECM）および泌乳刺激の存在下で乳房分化の本質的な特徴を再現する（Desprez, P.-Y.、Roskelley, C.、Campisi, J. & Bissell, M. J. (1993) Mol. Cell. Diff. 1、99-110）。SCp2細胞の分化はβ-カゼインおよび乳清酸性タンパク質（Wap）などの乳タンパク質の産生を伴うことから、本発明者らは今回これらを分子マーカーとして用いた。Lmo4またはLdb1 cDNA（エピトープ標識したもの、または標識していないもの）をピューロマイシン耐性マーカーとともに有するSCp2細胞の安定的トランスフェクタントを作製し、細胞のプールを分化能力に関してアッセイした。後者のアッセイ法に関しては、トランスフェクタントを、泌乳刺激（プロラクチン、インスリンおよびヒドロコルチゾン）の存在下または非存在下にてECM上にプレーティングした。

【０２０４】

Lmo4またはLdb1の過剰発現により、泌乳刺激処理時のβ-カゼインおよびWapのmRNA発現は著しく阻害された。これに対して、エンプティベクターを発現するトランスフェクタントは親細胞と区別できなかった（図2AおよびB）。いくつかのSCp2トランスフェクタントにおいてはFlag標識Lmo4およびLdb1タンパク質の発現が容易に検出され（その例を図2Cに示している）、非標識導入遺伝子の発現はノーザン分析によって確かめられた（非提示データ）。SCp2細胞およびHC11乳房上皮細胞におけるアンチセンスLmo4 RNAの強制的発現によってβ-カゼイン合成は持続的に数倍に強化されたが、ウエスタン分析によればLmo4タンパク質レベルはわずかに低下した（非提示データ）。以上を総合すると、これらのデータは、Lmo4およびそのパートナータンパク質Ldb1が乳房上皮細胞の分化ではなく増殖に役割を果たすことを意味する。

【０２０５】

実施例4

乳癌細胞株および原発性浸潤癌におけるLMO4の過剰発現
種々のヒト乳房上皮癌細胞系の間にはLMO4 RNAレベルに著しい差がある（図3）。10種類の乳癌細胞株のうち5種では高レベルのLMO4 mRNAが検出された。興味深いことに、転写物レベルは不死化細胞株184では低かったが、この細胞系の形質転換バリアントである184B5ではかなり高かった（Douglas, A.M.、Grant, S.L.、Goss, G.A.、Clouston, D.R.、Sutherland, R. L. & Begley, C. G. (1998) Int J Cancer 75、64-73）。LDB1は一群の乳癌細胞株において2つの主要転写物（2.3kbおよび3.5kb）として発現され、発現の程度に関する差異はわずかであった。SCp2（図3）、HC11およびEpH4（非提示）マウス乳房上皮細胞におけるLmo4およびLdb1転写物のサイズは対応するヒトRNAよりも小さく、種差を反映している。

【０２０６】
LMO4が原発性乳癌において上方制御されるか否かを評価するために、本発明者らは177件の浸潤性乳癌を含む組織アレイに対してインサイチューハイブリダイゼーションを行った。腫瘍標本を、ヒトLMO4リボプローブに対するハイブリダイゼーションの強度に基づき、LMO4の低発現／陰性、中等度または高発現として評価した。図4に各強度群における例を2つずつ低倍率で示している。対照センスプローブからは無視しうるシグナルしか生じなかった（図4D、H）。LMO4 RNAの高度～中等度の染色は177件の癌のうち99件（56%）に認められ、そのほとんどは浸潤性乳管癌に相当したが、浸潤性小葉および混在性乳管小葉癌も含まれた。図5は浸潤性小葉癌（図5A）および2件の浸潤性乳管癌（図5B、C）におけるLMO4の顕著な発現を示している。20件の良性乳房線維腺腫または正常乳房組織試料のうち7件（35%）では低レベルが検出された（図5D）。LMO4 RNAレベルは非浸潤性乳管癌（DCIS）で上昇しているように思われた（図5L）、18件の前浸潤性腫瘍のうち7件（38%）は中等度染色を示した。60件の腫瘍を含むサブセットを、ラット抗LMO4モノクローナル抗体を用いる免疫組織化学によっても分析した。LMO4タンパク質の過剰発現が腫瘍の62%で観察された。3件の腫瘍に関するインサイチューRNAおよび免疫組織化学染色の比較を図5に示したが（それぞれAおよびE、BおよびF、CおよびG）、これによればRNAレベルおよびタンパク質レベルの両方でのLMO4の過剰発現が明らかである。良性乳房組織は低レベル（図5H）または検出不能レベルのLMO4タンパク質しか認められなかった。抗免疫グロブリン抗体対照からはすべての腫瘍試料に関して無視しうる程度の染色しか得られなかった（図5I、JおよびK）。この60件の腫瘍サブセットのうち、35件（58%）はRNA発現に関して高度と評価された。これらのうち25件の腫瘍（71%）はLMO4タンパク質も高レベルであったが、10件の腫瘍ではタンパク質レベルは比較的低かった。その反対に、LMO4 RNAに関する染色が低かった60件の腫瘍のうち11件（17%）はタンパク質発現に関して高度と判定された。以上を総合すると、RNAおよびタンパク質の過剰発現の間には71%のケースで強い相関が認められた。少数の腫瘍で認められた不一致は、RNAおよびタンパク質の安定性および代謝回転を調節するさまざまな機構、ならびに生検によって採取した原発性癌組織の完全性を反映している可能性が高い。例えば、RNA発現が低いにもかかわらずサイクリンD1タンパク質レベルが高いという、サイクリンD1タンパク質分解経路の調節不全が乳癌で報告されている（Russell, A.、Thompson, M.A.、Hendley, J.、Trute, L.、Armes, J. & Germain, D. (1999) Oncogene 18、1983-91）。

【０２０７】
LMO4の細胞内局在はさまざまであることが明らかになった。いくつかの腫瘍では顕著な核染色が検出され（図5EおよびG）、一方、別の腫瘍では核および細胞質染色が認められた（図5F）。これらの所見はトランスフェクト細胞におけるLMO4の細胞内局在の検討の結果と一致する（Kenny, D.A.、Jurata, L.W.、Saga, Y. & Gill, G. N. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95、11257-62、Sugihara, T.M.、Bach, I.、Kioussi, C.、Rosenfeld, M. G. & Andersen, B. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95、15418-23）。60件の試料からなる同じ腫瘍のセットを、エストロゲン（ERα）、プロゲステロンおよびErbB2受容体の発現に関して免疫組織化学によって評価したところ、それぞれの受容体に関する陽性率は32%、40%および30%であった。LMO4の過剰発現とこれらのマーカーの発現との間に相関は

認められなかった。

【０２０８】

実施例5

LIMドメインタンパク質LMO4はコリプレッサーCtIPおよび腫瘍抑制因子BRCA1と相互作用し、BRCA1活性を阻害する

材料および方法

プラスミド

pGBT9-LMO4ベイトプラスミドを、以下のプライマーを用いる、pSP72におけるマウスLMO4のPCR増幅によって作製した：

順方向

5'-CGCGGATCCCCGGCTCCCTCTCCTGGAAGCGCTGC-3' (配列番号:5)

および逆方向

5'-CGC GGATCCTCAGCAGACCTTCTGGTCTGCCAG-3' (配列番号:6)

；その結果生じた産物をpGBT9（Clontech）のBamHI部位にクローニングした。LMO4の第1のLIMドメイン（残基1～82）を、順方向プライマー

5'-CGCGGATCCTGAATCCGGGCAGCAGCTCGC-3' (配列番号:7)

および逆方向プライマー

5'-CGCGGATCCTCACCCAAATAACCTAATGTAGTCATT-3' (配列番号:8)

を用いてPCR増幅し、続いてFlag-pEF1α-puroベクター（Huang, D.C.、Cory, S.およびStrasser, A. (1997) Oncogene 14 (4)、405-14）のBamHI部位にクローニングした。LMO4の第2のLIMドメイン（残基79～165）は、順方向プライマー

5'-CGCGGATCCGGTTATTTGGGAATAGCGGTGCTTG-3' (配列番号:9)

および逆方向プライマー

5'-CGCGGATCCTCAGCAGACCTTCTGGTCTGCCAG-3' (配列番号:10)

を用いてPCR増幅した後に、Flag-pEF1α-puroベクターのBamHI部位にクローニングした。Lhx1またはLhx3（pSV-sport-Flag）をコードする発現ベクターおよびLMK1はそれぞれA. Agulnickおよび0. Bernard氏に寄贈いただいた。マウスまたはヒトのLMO4のコード領域に対応する完全長cDNAをFlag-pEF 1α-puro発現ベクター中にクローニングし、0.7kbのマウスLMO4 cDNA断片をpEF1α-puroベクター中にクローニングした。ヒトCtIPの残基45～897（pCMVHA-ns311）、ヒトBRCA1（pcDNA3-HA-BRCA1）およびマウスLMO2（pEF1α-Flag-LMO2）をコードする発現プラスミドは以前に記載されている（Visvader, J.E.、Mao, X.、Fujiwara, Y.、Hahm, K.およびOrkin, S. H. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94（25）、13707-12; 19；Scully, R.、Chen, J.、Plug, A.、Xiao, Y.、Weaver, D.、Feunteun, J.、Ashley, T.およびLivingston, D. M. (1997) Cell 88 (2)、265-75）。HA標識したCtIP欠失変異体はPCR増幅またはプラスミドから発現ベクターHA-pcDNA3.1またはHA-EF1α-puroへのサブクローニングによって作製した（Yu, X.、Wu, L.C.、Bowcock, A.M.、Aronheim, A.およびBaer, R. (1998) J Biol Chem 273 (39)、25388-92）。BRCA1のSZ断片（残基1528～1863）はpCMV-Gal4b-BR-SZ（Yu, X.、Wu, L.C.、Bowcock, A.M.、Aronheim, A.およ

びBaer, R. (1998) J Biol Chem 273 (39)、25388-92）からHA-pcDNA3.1へと再クローニングした。野生型および変異型BRCA1のMyc標識誘導体をpcDNA3.0（J. C.、未発表）にクローニングした。

【０２０９】

BRCA1の活性化ドメイン（AD）がGal4 DNA結合ドメイン（DBD）と融合したものをコードする酵母発現構築物を、BRCA1のアミノ酸1293～1863にわたる領域のPCR増幅を行い、その後にpGBT9（Clontech）中にクローニングすることによって作製した。哺乳動物Ga14DBD-AD融合構築物は、BRCA1-AD領域をコードするcDNA断片のpCMV-Gal4bへのクローニングによって作製した（Yu, X.、Wu, L.C.、Bowcock, A.M.、Aronheim, A.およびBaer, R. (1998) J Biol Chem 273 (39)、25388-92）。マウスLMO4をコードする完全長cDNAを酵母発現プラスミドpYX212（Ingenious）に挿入した。レポータープラスミドpG5CATはClontech社から入手した。プラスミド構築の詳細は要請に応じて入手可能である。

【０２１０】

酵母ツーハイブリッドスクリーニング

pGBT9-LMO4ベイトプラスミド（残基15～165）を用いて、標準的プロトコールに従って（Clontech Matchmaker Two-Hybrid System）、原発性乳房腺癌cDNAライブラリー（Byrne, J.A.、Nourse, C.R.、Basset, P.およびGunning, P. (1998) Oncogene 16 (7)、873-81）由来の8.4×10^6個の形質転換体をスクリーニングした。

【０２１１】

抗体の作製

完全長マウスLMO4 cDNAをPCRによって増幅し、pGEX-2T（Amersham Pharmacia Biotech.）中にサブクローニングした。このGST-LMO4融合タンパク質を細菌株UT5600内で発現させ、標準的なプロトコールに従って精製し（Smith, D. B.およびJohnson, K. S. (1988) Gene 67 (1)、31-40）、これをウサギへの注入に用いてポリクローナル抗血清を産生させた。ラットLMO4特異的モノクローナル抗体の作製は別の箇所に記載されている。

【０２１２】

免疫沈降およびウエスタンブロット分析

ヒト胚腎臓293T細胞（10cmプレート）に対して、リン酸カルシウム沈降法を用いて、4μgの各発現構築物および／またはエンプティベクターによる一過性トランスフェクションを行った。細胞抽出物（0.5ml）を、プロテアーゼ阻害薬（1mMフェニルメチルスルホニルフルオリド、1μg／mlロイペプチン、1μg／mlペプスタチン、1μg／mlアプロチニン）を含む全細胞可溶化バッファー（150mM NaCL、5mM EDTA、50mM トリス pH7.5、1% ノニデット（Nonidet) P-40、1mM DTT）中に調製し、ブラッドフォード分析（BioRad）による評価により、タンパク質濃度を標準化した。タンパク質を抗Flag M2（Sigma）または抗myc 9E10およびプロテインGセファロース（Amersham Pharmacia Biotech.）によって免疫沈降させ、SDS-PAGE（Novex）によて分離した。PVDF膜（Millipore）に移行させた後に、フィルターのブロッティングを行い、CtIPまたはLdb1に対するウサギ抗血清（Visvader, J.E.、Mao, X.、Fujiwara, Y.、Hahm, K.およびOrkin, S. H. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94（25）、13707-12）またはマウス抗BRCA1モノクローナル抗体MS110（Oncogene Research Products）とともにインキュベートした。続いてフィルターをHRP結合二次抗体とともにインキュベートし、ECL（Amersham Pharmacia Biotech.）によって現像した。

【０２１３】

内因性タンパク質に関しては、ヒトHBL100細胞から核抽出物を調製した（Watters, D.、Khanna, K.K.、Beamish, H.、Birrell, G.、Spring, K.、Kedar, P.、Gatei, M.、Stenzel, D.、Hobson, K.、Kozlov, S.、Zhang, N.、Farrell, A.、Ramsay, J.、Gatti, R.およびLavin, M. (1997) Oncogene 14(16)、1911-21）。タンパク質を抗LMO4ウサギ抗血清またはラット抗LMO4モノクローナル抗体およびプロテインGセファロースによって免疫沈降させ、SDS-PAGEにより分画した。移行させた後にフィルターをブロックし、CtIP（14.1）（Yu, X.およびBaer, R. (2000) J Biol Chem 275 (24)、18541-9）またはBRCA1（MS110、Oncogene Research Products）に対するマウスモノクローナル抗体とともにインキュベ

ートし、その後にHRP結合二次抗体とともにインキュベートした上でECL（Amersham Pharmacia Biotech.）によって現像した。

【０２１４】

インビトロ結合アッセイ法

^{35}S標識BRCA1（C末端残基1528-1863）のインビトロ合成を、TNT T7結合網状赤血球溶解液システム（Promega）を用いて、HA-pCDNA3.1-BRCA1-SZのインビトロ転写／翻訳によって行った。結合アッセイ法は、^{35}S標識BRCA1-SZで感作させた可溶化物の10μlアリコートおよび100μl（GST-セファロースビーズの50％スラリー；Amersham Pharmacia）のGST-LMO4またはGST-のみのタンパク質を用い、GST相互作用バッファー（150mM NaCl、10mM トリス pH 8、0.3％NP-40、1mM DTT、0.25％BSAおよび0.5mMフェニルメチルスルホニルフルオリド）中にて4℃で2時間かけて行った。続いてビーズをBSAを含むGST相互作用バッファーで2回洗い、その後にBSAを含まないGST相互作用バッファーでさらに2回洗った。最後に、ビーズを30μlのローディングバッファー中で5分間煮沸することによって結合したBRCA1C末端ポリペプチドを溶出させ、SDS-PAGEによって分析した。

【０２１５】

ノーザンブロット分析

以前の研究で引用されているヒトおよびマウスの乳房上皮細胞系からポリ(A)$^{+}$ RNAを単離し（Douglas, A.M.、Grant, S.L.、Goss, G.A.、Clouston, D.R.、Sutherland, R. L.およびBegley, C. G. (1998) Int J Cancer 75 (1)、64-73）、ノーザン分析を行った（Visvader, J.E.、Elefanty, A.G.、Strasser, A.およびAdams, J. M. (1992) Embo J 11(12)、4557-64)。

【０２１６】

酵母および哺乳動物細胞におけるトランス活性化アッセイ法

酵母転写アッセイ法は酵母株BJ5462において行った。これに対してLacZレポータープラスミド、YepΔ62（P. Vaughan氏から寄贈いただいた）およびpGBT9-BRCA1（AD）を同時トランスフェクトし、leuおよびtrpを欠く培地上でコロニーを選択した。続いて、これらの形質転換体にpYX212-LMO4発現プラスミドまたはエンプティベクターによる形質転換をさらに行い、ura、trpおよびleuを欠く培地上で選択した。o-ニトロフェニル-β-D-ガラクトシド（ONPG）液体培養アッセイ法を標準的なプロトコールに従って（CLONTECH Yeast Protocols Handbook）行い、β-ガラクトシダーゼ活性を評価した。

【０２１７】

胚腎臓293T細胞に対して、指定されたプラスミド：0.5μgのpG5CAT（CLONTECH）、1μgのpCMV-Gal4b-BRCA1-ADまたは1μgのGal4b親ベクター、および2μgのFlag-EF1α-LMO4または2μgのエンプティ対照ベクターのいずれかによる一過性トランスフェクションを、リン酸カルシウム法を用いて行った（6ウェルプレート）。CAT Elisaシステム（Roche）を用いてCAT活性を測定し、ブラッドフォードアッセイ法（BioRad）によって測定したタンパク質濃度に対して標準化した。

【０２１８】

実施例6

CTIPのLMO4相互作用性タンパク質としての同定

本発明者らは、乳房上皮におけるLMO4相互作用性タンパク質を同定するために酵母ツーハイブリッドシステムを用いた。原発性乳房腺癌cDNAライブラリーの8.4×10^{6}個の形質転換体のスクリーニングにより、800個を上回るHis^{+}コロニーが得られた。659個のβ-ガラクトシダーゼ陽性クローンを単離し、続いて、既知のLMO4関連タンパク質であるLdb1および異型上皮自己調節性因子（Deformed Epidermal Autoregulation Factor）（DEAF1）ならびに既知の偽陽性物を表すcDNAプローブを用いる酵母コロニーハイブリダイゼーションを行った（Kenny, D.A.、Jurata, L.W.、Saga, Y.およびGill, G. N. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95 (19)、11257-62；Sugihara, T.M.、Bach, I.、Kioussi, C.、Rosenfeld, M. G.およびAndersen, B. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95（26）、15418-23；Grutz, G.、Forster, A.およびRabbitts, T. H. (1998) Oncogene 17 (21)、2799-803）。これ

らのクローンの約60%はLdb1／Ldb2（30%）またはDEAF1（30%）に対応した。150種のcDNAクローンのシークエンシングを行ったところ、22種はLdb1またはLdb2に対応し、20種はDEAF1をコードし、少なくとも70種は偽陽性物（例えば、リボソームタンパク質、ミトコンドリアタンパク質および細胞外マトリックスタンパク質）に対応するが、残りの38種のcDNAは9種の異なる遺伝子またはESTであることが明らかになった。これらのクローンの1つは、転写コリプレッサーCtBP（アデノウイルスE1A C末端結合タンパク質）との相互作用に基づいて当初同定された補助因子であるCtIP（CtBP相互作用性タンパク質）の完全コード配列に対応していた（Schaeper, U.、Subramanian, T.、Lim, L.、Boyd, J.M.およびChinnadurai, G. (1998) J Biol Chem 273 (15)、8549-52）。

【０２１９】

実施例7

LMO4とCTIPとのインビボでの会合

CtIPとLMO4との間の特異的相互作用が哺乳動物細胞で確かめられた。それぞれFlag-エピトープまたはmyc-エピトープをN末端に有する、LMO4、LMO2または異種LIMドメインタンパク質をコードする発現ベクターを、CtIP（残基45～897）を有する発現ベクターとともに、293T細胞に一過的にトランスフェクトした。全細胞抽出物を、免疫共沈降／ウエスタンブロット複合アッセイ法を用いて分析した。図6Aに示されているように、Flag-LMO4およびCtIPがインビボで特異的に会合することが相互免疫共沈降実験によって明らかになった（レーン1および4）。Flag-LMO4のみを発現する細胞（レーン3）またはアイソタイプを一致させた対照抗体を用いたものではCtIPは免疫共沈降しなかった。LMO4の単一のLIMドメイン（アミノ酸1～82）があれば哺乳動物細胞におけるCtIPとの相互作用に十分であることが判明した（図6B、レーン1）。CtIPと会合できたのはLMO4の第2のLIMドメイン（アミノ酸79～165）ではなく第1のLIMドメインのみであった（レーン2）。CtIPは近縁のLIMドメインタンパク質LMO2(5)とも共沈降した（図6A、レーン2）が、核内LIMホメオドメインタンパク質であるLhx1およびLhx3（図6C、レーン2および3）ならびにLIM-キナーゼ（LMK1）とは共沈降しなかった（図6C、レーン4）。

【０２２０】

乳房上皮細胞における内因性タンパク質間の相互作用について検討するために、本発明者らは完全長マウスLMO4に対するウサギポリクローナル抗血清を作製した。この抗血清は乳房上皮細胞およびLMO4発現ベクターをトランスフェクトした細胞内の約17kDのタンパク質を認識した。HBL100細胞からの核抽出物は抗LMO4抗血清（図6D、レーン2）または免疫前血清（レーン1）と免疫共沈降した。マウス抗CtIPモノクローナル抗体を用いたイムノブロット法によって125kDの特定のバンドが判明し（図6D）、これによって天然のCtIPタンパク質とLMO4タンパク質とのインビボでの会合が裏づけられた。

【０２２１】

実施例8

乳房上皮細胞系におけるLMO4およびCTIPの同時発現ならびにLMO4の細胞内局在

LMO4遺伝子およびCtIP遺伝子はいずれも数多くの異なる組織および細胞種で発現されることが報告されている（

Kenny, D. A., Jurata, L. W., Saga, Y., および Gill, G. N. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(19), 11257-62;Sugihara, T. M., Bach, I., Kioussi, C., Rosenfeld, M. G., および Andersen, B. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26), 15418-23;Wong, A. K., Ormonde, P. A., Pero, R., Chen, Y., Lian, L., Salada, G., Berry, S., Lawrence, Q., Dayananth, P., Ha, P., Tavtigian, S. V., Teng, D. H., および Bartel, P. L. (1998) *Oncogene* **17**(18), 2279-85

）。本発明者らは、その大半はヒト乳癌に由来するが不死化ヒト細胞（184）も含んでい

る、一群の乳房上皮細胞系におけるそれらの発現を調べた。ノーザン分析により、CtIP RNA（3.6kb）レベルは比較的均一であるが、LM04転写物（1.8kbおよび2.3kb）の発現には著しい差があることが判明した（図8）。本発明者らが最近報告したように（Visvader, J.E.、Venter, D.、Hahm, K.、Santamaria, M.、Sum, E. Y. M.、O'Reilly, L.、White, D.、Williams, R.、Armes, J.およびLindeman, G. J. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98 (25)、14452-14457）、BT-549、BT-474、HS-578T、MDA-MB361、T-47DおよびZR-75Bを含む多くのヒト乳癌細胞株では高レベルのLM04が認められ（図8）、これに対して不死化184細胞では低レベルであった。ヒト乳癌において、LM04遺伝子の過剰発現はRNAレベルおよびタンパク質レベルの両方で観察されている（Visvader, J.E.、Venter, D.、Hahm, K.、Santamaria, M.、Sum, E. Y. M.、O'Reilly, L.、White, D.、Williams, R.、Armes, J.およびLindeman, G. J. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98（25）,14452-14457）。

【０２２２】

実施例9

LM04はCTIP内の2つの異なるドメインと相互作用する

CtIPの機能は不明であるが、これはBRCA1、アデノウイルスE1A C末端結合タンパク質（CtBP）、網膜芽細胞種タンパク質（Retinoblastoma）（Rb）およびp130ポケットタンパク質を含む、いくつかの核調節タンパク質に対する補助因子として働くように思われる（Yu, X., Wu, L. C., Bowcock, A. M., Aronheim, A., および Baer, R. (1998) *J Biol Chem* **273**(39), 25388-92;Wong, A. K., Ormonde, P. A., Pero, R., Chen, Y., Lian, L., Salada, G., Berry, S., Lawrence, Q., Dayananth, P., Ha, P., Tavtigian, S. V., Teng, D. H., および Bartel, P. L. (1998) *Oncogene* **17**(18), 2279-85;Li, S., Chen, P. L., Subramanian, T., Chinnadurai, G., Tomlinson, G., Osborne, C. K., Sharp, Z. D., および Lee, W. H. (1999) *J Biol Chem* **274**(16), 11334-8,30-32）。CtIPは、図7Aに示したように、これらのタンパク質と相互作用する規定された領域に加えて、ロイシンジッパーと考えられる2つのドメインを含む（120～141および740～761）（Fusco, C.、Reymond, A.およびZervos, A. S. (1998) Genomics 51 (3)、351-8）。LM04との相互作用を媒介するCtIP内部のドメインを明確にするために、それぞれN末端HA-エピトープタグと連結させた一連のCtIP欠失変異体（図7A）を、Flag-LM04とともに293T上皮細胞に対して同時トランスフェクトした。図8Bに示されているように、HA-CtIP（45～371）、HA-CtIP（371～897）、HA-CtIP（45～897）およびHA-CtIP（620～897）タンパク質はFlag-LM04と会合可能であった（レーン2、4、5および6）。これに対して、HA-CtIP（59～320）およびHA-CtIP（281～620）変異体は抗Flag抗体と免疫沈降した（それぞれレーン1および3）。このため、CtIP内にはLM04との相互作用を媒介しうる2つの領域、すなわちN末端（残基45～59）の小規模ドメインおよびロイシンジッパーモチーフと推定されるものを含むC末端領域（残基620～897）があるように思われる（図8A）。これらの領域は、CtBP（アミノ酸392～396）、Rb（153～157）およびBRCA1（133～369）と会合するものとは異なる（

Yu, X., Wu, L. C., Bowcock, A. M., Aronheim, A., および Baer, R. (1998) *J Biol Chem* **273**(39), 25388-92;Yu, X., および Baer, R. (2000) *J Biol Chem* **275**(24), 18541-9Schaeper, U., Subramanian, T., Lim, L., Boyd, J. M., および Chinnadurai, G. (1998) *J Biol Chem* **273**(15), 8549-52;Fusco, C., Reymond, A., および Zervos, A. S. (1998) *Genomics* **51**(3), 351-8;Meloni, A. R., Smith, E. J., および Nevins, J. R. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(17), 9574-9

）。

【０２２３】

実施例10

LM04は乳房腫瘍および卵巣腫瘍の抑制因子であるBRCA1と相互作用する

最近、CtIPが乳房腫瘍抑制因子BRCA1と相互作用することが示されたため（

Yu, X., Wu, L. C., Bowcock, A. M., Aronheim, A., および Baer, R. (1998) *J Biol Chem* **273**(39), 25388-92;Wong, A. K., Ormonde, P. A., Pero, R., Chen, Y., Lian, L., Salada, G., Berry, S., Lawrence, Q., Dayananth, P., Ha, P., Tavtigian, S. V., Teng, D. H., および Bartel, P. L. (1998) *Oncogene* **17**(18), 2279-85;Li, S., Chen, P. L., Subramanian, T., Chinnadurai, G., Tomlinson, G., Osborne, C. K., Sharp, Z. D., および Lee, W. H. (1999) *J Biol Chem* **274**(16), 11334-8

）、本発明者らはLM04、CtIPおよびBRCA1が多タンパク質複合体に加わるか否かについて検討した。CtIPおよびLM04はいずれも、myc標識BRCA1、Flag標識LM04およびCtIPを発現する293T細胞由来の抗myc抗体と免疫共沈降した（図9A、レーン2）。この所見により、この3種のタンパク質が多タンパク質複合体をインビボで形成しうることが明らかになった。図9Aに示されているように（レーン1）、外因性CtIPの存在は抗myc抗体によるLM04の免疫沈降に必要ではなかった。これらの結果から、LM04がBRCA1と直接会合するという可能性が示された（以下を参照）。

【０２２４】

この相互作用を上皮細胞でさらに検討するために、ラット抗LM04モノクローナル抗体を用いてHBL100由来の核抽出物からのタンパク質を免疫沈降させた。この抗体はLM04発現ベクターをトランスフェクトした細胞内の17kDタンパク質を特異的に認識するが、LM04を含まないものでは認識しなかった。内因性BRCA1は抗LM04モノクローナル抗体によって免疫沈降したが（図9B、レーン2）、対照抗体によっては免疫沈降しなかった（図9B、レーン3）。この結果から、LM04とBRCA1とのインビボでの会合が裏づけられ、さらに、この相互作用が上皮細胞における天然タンパク質の間でも起こることが示された。抗LM04と免疫沈降したタンパク質に関する抗CtIPモノクローナル抗体を用いたイムノブロット法により、CtIPに対応する125kDの薄いバンドが得られ（図9B、中央のパネル）、抗LM04抗体とのブロッティングでは予想された17kD LM04タンパク質がみられた（図9B、下のパネル）。したがって、LM04、BRCA1およびCtIPには、天然の複合体をインビボで形成する能力がある。

【０２２５】

本発明者らは、LM04と結合する核アダプタータンパク質Ldb1、および高い親和性を有する他のLIMタンパク質（Kenny, D.A.、Jurata, L.W.、Saga, Y.およびGill, G. N. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95 (19)、11257-62；Sugihara, T.M.、Bach, I.、Kioussi, C.、Rosenfeld, M. G.およびAndersen, B. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95 (26)、15418-23；Grutz, G.、Forster, A.およびRabbitts, T. H. (1998) Oncogene 17 (21)、2799-80

3）も同じく多タンパク質複合体に加わりうるか否かについて検討した。CtIP、BRCA1、LM04およびLDB1をコードするプラスミドをトランスフェクトした細胞からのLdb1は、抗CtIP抗体を用いて免疫沈降させることができた（図9C）。したがって、この4種のタンパク質はいずれも安定な複合体をインビボで形成する能力がある。

【０２２６】

実施例11

BRCA1のBRCTドメインはLM04と直接相互作用する

BRCA1のC末端の335アミノ酸（SZ断片、残基1528～1863）だけで、トランスフェクト細胞におけるLM04との相互作用（図10A）を媒介するには十分であった。この領域は、BRCA1が腫瘍形成の抑制に働くために必要な2つの縦列BRCTモチーフを含む（

Yu, X., Wu, L. C., Bowcock, A. M., Aronheim, A., および Baer, R. (1998) *J Biol Chem* **273**(39), 25388-92;Wong, A. K., Ormonde, P. A., Pero, R., Chen, Y., Lian, L., Salada, G., Berry, S., Lawrence, Q., Dayananth, P., Ha, P., Tavtigian, S. V., Teng, D. H., および Bartel, P. L. (1998) *Oncogene* **17**(18), 2279-85;Li, S., Chen, P. L., Subramanian, T., Chinnadurai, G., Tomlinson, G., Osborne, C. K., Sharp, Z. D., および Lee, W. H. (1999) *J Biol Chem* **274**(16), 11334-8

）。本発明者らは、LM04とBRCA1との会合をインビトロ結合アッセイ法を用いて確認した。グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）融合タンパク質として発現させた完全長LM04をグルタチオンセファロースビーズ上に固定化し、インビトロ翻訳させた^{35}S-メチオニン標識BRCA1-SZポリペプチド（1528～1863）とともにインキュベートした。図10Bに示されているように、BRCA1はGST-LM04とは特異的に会合したが、GST単独とは相互作用しなかった。

【０２２７】

CtIPがLM04とBRCA1との間の架橋分子として作用する可能性を否定するために、本発明者らは、酵母におけるBRCA1とLM04との相互作用について検討した。CtIPは出芽酵母（S. cerevisiae）ゲノムには存在しないように思われる（Saccharomycesゲノムデータベース、NCBI）。BRCA1のSZ部分をGal4活性化ドメインを連結させたものおよびGBT9-LM04によるHf7c細胞に対する同時形質転換により、これらのタンパク質の間の直接的な会合が判明した（図10C）。LM04およびCtIPによる同時形質転換を行った酵母細胞で観察されたように、His^{+} β-Gal^{+} コロニーがこれらの形質転換体で得られた。したがって、BRCA1のBRCTドメインはLM04およびCtIPとの直接的な結合を媒介する。

【０２２８】

実施例12

BRCA1における腫瘍由来の変異はLM04結合に影響を及ぼさない

遺伝性乳癌患者のかなりの割合で腫瘍に関連した変異が同定されている。このような異常にはミスセンス変異（P1749R、M1775R）、およびBRCA1のC末端の11アミノ酸を欠失させるナンセンス変異（Y1853Δ）が含まれる（Yu, X.、Wu, L.C.、Bowcock, A.M.、Aronheim, A.およびBaer, R. (1998) J Biol Chem 273 (39) 、25388-92；Li, S.、Chen, P.L.、Subramanian, T.、Chinnadurai, G.、Tomlinson, G.、Osborne, C.K.、Sharp, Z. D.およびLee, W. H. (1999) J Biol Chem 274 (16)、11334-8）。これらの腫瘍関連変異はBRCA1のCtIPとの結合性を失わせることが示されている（Yu, X.、Wu, L.C.、Bowcock, A.M.、Aronheim, A.およびBaer, R. (1998) J Biol Chem 273 (39)、25388-92；Li, S.、Chen, P.L.、Subramanian, T.、Chinnadurai, G.、Tomlinson, G.、Osborne, C.K.、Sharp, Z. D.およびLee, W. H. (1999) J Biol Chem 274 (16)、11334-8）。BRCA1-LM04相互作用に対するそれらの影響を評価するために、これらの変異を含むmyc標識BRCA1発現構築物が293T細胞においてFlag標識LM04と結合する能力を調べた。野生型BRCA1ポリペプチドで観察され

ているのと同じく、すべての変異体がLMO4と相互作用することが見いだされた（図11）。このため、遺伝子性乳癌患者でBRCA1内部に生じている変異は、BRCA1とLMO4との相互作用に影響を及ぼさずにCtIPとの結合性を消失させることができる。

【０２２９】

実施例13

LMO4はBRCA1の転写活性を抑制する

BRCA1のC末端（BRCT）ドメインは異種DNA結合ドメインを介してプロモーターと連結されると転写を活性化することが以前に示されている（Chapman, M. S.およびVerma, I. M.（1996）Nature 382（6593)、678-9；34）。C末端のさらに詳細な特徴分析により、2つの隣接した活性化ドメインAD1（残基1293～1558）およびAD2（残基1560～1863）が一緒になって571アミノ酸のADドメインを構成することが明らかになった（Hu, Y.F.、Miyake, T.、Ye, Q.およびLi, R.（2000）J Biol Chem 275(52)、40910-5)。酵母および哺乳動物細胞のいずれにおいてもAD1とAD2との機能的協同作用がみられ、このためにAD領域はいずれかのドメインのみの場合よりも強力な転写活性化因子となる（Hu, Y.F.、Miyake, T.、Ye, Q.およびLi, R.（2000）J Biol Chem 275（52)、40910-5）。BRCA1による転写の活性化に対するLMO4の影響を明らかにするために、本発明者らはまず、BRCA1のC末端AD領域をGal4 DNA結合ドメインと融合させたものを用いて酵母を用いる転写アッセイ法を行った。このプラスミドをLMO4酵母発現ベクターまたはエンプティベクターとともに、LacZレポータープラスミドを有するBJ5462酵母株に導入した。BRCA1-ADは強力なトランス活性化因子であり、基礎的なGal4 DNA結合活性よりも400～600倍高い転写を誘導した（図12A）。この活性化はLMO4によって顕著に抑制され、BRCA1-ADによる活性化のレベルは80％低下した（図12A）。BRCA1-ADの発現にはLMO4をコードするプラスミドの有無の別による差がなかった（図12A、下のパネル）。

【０２３０】

酵母転写アッセイ法の所見を裏づけるために、本発明者らは哺乳動物293T細胞において同様の検討を行った。BRCA1-ADをGal4 DNA結合ドメインと結合させたものは、Gal4-CATレポーター遺伝子の転写を、Gal4-DNA結合ドメインのみによる基礎活性の3～4倍に増加させた（図12B）。以上の所見と一致して、BRCA1によるトランス活性化（約3倍）に対するLMO4の効果は陰性であり、転写活性はGal4 DNA結合ドメイン（DBD）のみで観察された基礎レベルに復帰した。VP16トランス活性化ドメインの活性は強制的LMO4発現によって変化しなかったことから、LMO4は全般的なリプレッサーとしては作用しない（非提示データ）。さらに、Gal4 DBDの基礎活性はLMO4が存在しても低下しなかった（図12B）。BRCA1-ADの発現はLMO4の存在による影響を受けなかった（図12B、下のパネル）。

【０２３１】

当業者は、本明細書に記載された本発明が具体的に記述されたもの以外の変更や修飾を受けうることを理解すると考えられる。本発明はこのような変更や修飾のすべてを包含するものと解釈されるべきである。本発明は、本明細書で個別的にまたは集合的に言及または指摘された工程、特徴、組成物および化合物のすべて、ならびに前記工程または特徴の任意の2つまたはそれ以上の組合せのいずれかおよびすべてをも含む。

【０２３２】

参照文献

Agulnick, A. D., Taira, M., Breen, J. J., Tanaka, T., Dawid, I. B. & Westphal, H. (1996) Nature 384, 270-2.

Armes, J. E., Trute, L., White, D., Southey, M. C., Hammet, F., Tesoriero, A., Hutchins, A. M., Dite, G. S., McCredie, M. R., Giles, G. G., Hopper, J. L. & Venter, D. J. (1999) Cancer Res 59, 2011-7.

Bach, I. (2000) *Mech Dev* **91**(1-2), 5-17

Bach, I., Carriere, C., Ostendorff, H. P., Andersen, B. & Rosenfeld, M. G. (1997) Genes Dev 11, 1370-80.

Bach, I., Rhodes, S. J., Pearse, R. V., 2nd, Heinzel, T., Gloss, B., Scully, K. M., Sawchenko, P. E., and Rosenfeld, M. G. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(7), 2720-4

Bärlund, M., Tirkkonen, M., Forozan, F., Tanner, M. M., Kallioniemi, O. & Kallioniemi, A. (1997) Genes Chromosomes Cancer 20, 372-6.

Boehm, T., Baer, R., Lavenir, I., Forster, A., Waters, J. J., Nacheva, E. & Rabbitts, T. H. (1988) Embo J 7, 385-94.

Boehm, T., Foroni, L., Kaneko, Y., Perutz, M. F. & Rabbitts, T. H. (1991) Proc Natl Acad Sci U S A 88, 4367-71.

Byrne, J. A., Nourse, C. R., Basset, P., and Gunning, P. (1998) *Oncogene* **16**(7), 873-81

Catteau, A., Harris, W. H., Xu, C. F., and Solomon, E. (1999) *Oncogene* **18**(11), 1957-65

Chapman, M. S., and Verma, I. M. (1996) *Nature* **382**(6593), 678-9

Couch, F. J., and Weber, B. L. (1996) *Hum Mutat* **8**(1), 8-18

Cuny, M., Kramar, A., Courjal, F., Johannsdottir, V., Iacopetta, B., Fontaine, H., Grenier, J., Culine, S. & Theillet, C. (2000) Cancer Res 60, 1077-83.

Dawid, I. B., Breen, J. J., and Toyama, R. (1998) *Trends Genet* **14**(4), 156-62

Deng, C. X., and Brodie, S. G. (2000) *Bioessays* **22**(8), 728-37

Desprez, P.-Y., Roskelley, C., Campisi, J. & Bissell, M. J. (1993) Mol. Cell. Diff. 1, 99-110.

Dobrovic, A., and Simpfendorfer, D. (1997) *Cancer Res* **57**(16), 3347-50

Douglas, A. M., Grant, S. L., Goss, G. A., Clouston, D. R., Sutherland, R. L., and Begley, C. G. (1998) *Int J Cancer* **75**(1), 64-73

Emi, M., Matsumoto, S., Iida, A., Tsukamoto, K., Nakata, T., Yokota, T., Akiyama, F., Sakamoto, G., Yoshimoto, M., Kasumi, F. & Nakamura, Y. (1997) Breast Cancer 4, 243-246.

Fisch, P., Boehm, T., Lavenir, I., Larson, T., Arno, J., Forster, A. & Rabbitts, T. H. (1992) Oncogene 7, 2389-97.

Fusco, C., Reymond, A., and Zervos, A. S. (1998) *Genomics* **51**(3), 351-8

Futreal, P. A., Soderkvist, P., Marks, J. R., Iglehart, J. D., Cochran, C., Barrett, J. C., and Wiseman, R. W. (1992) *Cancer Res* **52**(9), 2624-7

German, M. S., Wang, J., Chadwick, R. B., and Rutter, W. J. (1992) *Genes Dev* **6**(11), 2165-76

Grutz, G., Forster, A. & Rabbitts, T. H. (1998) Oncogene 17, 2799-803.

Grutz, G., Forster, A., and Rabbitts, T. H. (1998) *Oncogene* **17**(21), 2799-803

Hoggard, N., Brintnell, B., Howell, A., Weissenbach, J. & Varley, J. (1995) Genes Chromosomes Cancer 12, 24-31.

Hu, Y. F., Hao, Z. L., and Li, R. (1999) *Genes Dev* **13**(6), 637-42

Hu, Y. F., Miyake, T., Ye, Q., and Li, R. (2000) *J Biol Chem* **275**(52), 40910-5

Huang, D. C., Cory, S., and Strasser, A. (1997) *Oncogene* **14**(4), 405-14

Jurata, L. W., and Gill, G. N. (2000), pp. 75-113

Jurata, L. W., Kenny, D. A., and Gill, G. N. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21), 11693-8

Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Piper, J., Tanner, M., Stokke, T., Chen, L., Smith, H. S., Pinkel, D., Gray, J. W. & Waldman, F. M. (1994) Proc Natl Acad Sci U S A 91, 2156-60.

Kenny, D. A., Jurata, L. W., Saga, Y., and Gill, G. N. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(19), 11257-62

Knuutila, S., Bjorkqvist, A. M., Autio, K., Tarkkanen, M., Wolf, M., Monni, O., Szymanska, J., Larramendy, M. L., Tapper, J., Pere, H., El-Rifai, W., Hemmer, S., Wasenius, V. M., Vidgren, V. & Zhu, Y. (1998) Am J Pathol 152, 1107-23.

Koonin, E. V., Altschul, S. F., and Bork, P. (1996) *Nat Genet* **13**(3), 266-8

Li, S., Chen, P. L., Subramanian, T., Chinnadurai, G., Tomlinson, G., Osborne, C. K., Sharp, Z. D., and Lee, W. H. (1999) *J Biol Chem* **274**(16), 11334-8

Mancini, D. N., Rodenhiser, D. I., Ainsworth, P. J., O'Malley, F. P., Singh, S. M., Xing, W., and Archer, T. K. (1998) *Oncogene* **16**(9), 1161-9

McGuire, E. A., Rintoul, C. E., Sclar, G. M. & Korsmeyer, S. J. (1992) Mol Cell Biol 12, 4186-96.

Meloni, A. R., Smith, E. J., and Nevins, J. R. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(17), 9574-9

Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L. M., Ding, W., and et al. (1994) *Science* **266**(5182), 66-71

Monteiro, A. N. (2000) *Trends Biochem Sci* **25**(10), 469-74

Neale, G. A., Rehg, J. E. & Goorha, R. M. (1997) Leukemia 11 Suppl 3, 289-90.

Nicholson, S. E., Willson, T. A., Farley, A., Starr, R., Zhang, J. G., Baca, M., Alexander, W. S., Metcalf, D., Hilton, D. J. & Nicola, N. A. (1999) EMBO J 18, 375-85.

Pinkel, D., Segraves, R., Sudar, D., Clark, S., Poole, I., Kowbel, D., Collins, C., Kuo, W. L., Chen, C., Zhai, Y., Dairkee, S. H., Ljung, B. M., Gray, J. W. & Albertson, D. G. (1998) Nat Genet 20, 207-11.

Rabbitts, T. H. (1998) *Genes Dev* **12**(17), 2651-7

Racevskis, J., Dill, A., Sparano, J. A., and Ruan, H. (1999) *Biochim Biophys Acta* **1445**(1), 148-53

Rice, J. C., Massey-Brown, K. S., and Futscher, B. W. (1998) *Oncogene* **17**(14), 1807-12

Royer-Pokora, B., Loos, U. & Ludwig, W. D. (1991) Oncogene 6, 1887-93.

Russell, A., Thompson, M. A., Hendley, J., Trute, L., Armes, J. & Germain, D. (1999) Oncogene 18, 1983-91.

Sanchez-Garcia, I., and Rabbitts, T. H. (1994) *Trends Genet* **10**(9), 315-20

Sanchez-Garcia, I., Osada, H., Forster, A., and Rabbitts, T. H. (1993) *Embo J* **12**(11), 4243-50

Schaeper, U., Subramanian, T., Lim, L., Boyd, J. M., and Chinnadurai, G. (1998) *J Biol Chem* **273**(15), 8549-52

Schmutzler, R. K., Bierhoff, E., Werkhausen, T., Fimmers, R., Speiser, P., Kubista, E., Krebs, D., Zeillinger, R., Wiestler, O. D., and Von Deimling, A. (1997) *Int J Cancer* **74**(3), 322-5

Scully, R., and Livingston, D. M. (2000) *Nature* **408**(6811), 429-32

Scully, R., Anderson, S. F., Chao, D. M., Wei, W., Ye, L., Young, R. A., Livingston, D. M., and Parvin, J. D. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(11), 5605-10

Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T., and Livingston, D. M. (1997) *Cell* **88**(2), 265-75

Shattuck-Eidens, D., McClure, M., Simard, J., Labrie, F., Narod, S., Couch, F., Hoskins, K., Weber, B., Castilla, L., Erdos, M., and et al. (1995) *Jama* **273**(7), 535-41

Smith, D. B., and Johnson, K. S. (1988) *Gene* **67**(1), 31-40

Sugihara, T. M., Bach, I., Kioussi, C., Rosenfeld, M. G., and Andersen, B. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26), 15418-23

Taira, M., Otani, H., Saint-Jeannet, J. P., and Dawid, I. B. (1994) *Nature* **372**(6507), 677-9
Thompson, M. E., Jensen, R. A., Obermiller, P. S., Page, D. L., and Holt, J. T. (1995) *Nat Genet* **9**(4), 444-50

Tse, E., Grutz, G., Garner, A. A., Ramsey, Y., Carter, N. P., Copeland, N., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Agulnick, A., Forster, A. & Rabbitts, T. H. (1999) Mamm Genome 10, 1089-94.

Tsukamoto, K., Ito, N., Yoshimoto, M., Kasumi, F., Akiyama, F., Sakamoto, G., Nakamura, Y. & Emi, M. (1998) Cancer 82, 317-22.

Valge-Archer, V. E., Osada, H., Warren, A. J., Forster, A., Li, J., Baer, R., and Rabbitts, T. H. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(18), 8617-21

Visvader, J. E., Elefanty, A. G., Strasser, A., and Adams, J. M. (1992) *Embo J* **11**(12), 4557-64

Visvader, J. E., Mao, X., Fujiwara, Y., Hahm, K., and Orkin, S. H. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25), 13707-12

Visvader, J. E., Venter, D., Hahm, K., Santamaria, M., Sum, E. Y. M., O'Reilly, L., White, D., Williams, R., Armes, J., and Lindeman, G. J. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(25), 14452–14457

Visvader, J., Begley, C. G. & Adams, J. M. (1991) Oncogene 6, 187-94.

Wadman, I. A., Osada, H., Grutz, G. G., Agulnick, A. D., Westphal, H., Forster, A., and Rabbitts, T. H. (1997) *Embo J* **16**(11), 3145-57

Wadman, I., Li, J., Bash, R. O., Forster, A., Osada, H., Rabbitts, T. H., and Baer, R. (1994) *Embo J* **13**(20), 4831-9

Warren, A. J., Colledge, W. H., Carlton, M. B., Evans, M. J., Smith, A. J. & Rabbitts, T. H. (1994) Cell 78, 45-57.

Watters, D., Khanna, K. K., Beamish, H., Birrell, G., Spring, K., Kedar, P., Gatei, M., Stenzel, D., Hobson, K., Kozlov, S., Zhang, N., Farrell, A., Ramsay, J., Gatti, R., and Lavin, M. (1997) *Oncogene* **14**(16), 1911-21

Weiss, M. J., Keller, G. & Orkin, S. H. (1994) Genes Dev 8, 1184-97.

Wilkinson, D. (1992) In Situ Hybridisation (IRL, New York).

Wilson, C. A., Ramos, L., Villasenor, M. R., Anders, K. H., Press, M. F., Clarke, K., Karlan, B., Chen, J. J., Scully, R., Livingston, D., Zuch, R. H., Kanter, M. H., Cohen, S., Calzone, F. J., and Slamon, D. J. (1999) *Nat Genet* **21**(2), 236-40

Wong, A. K., Ormonde, P. A., Pero, R., Chen, Y., Lian, L., Salada, G., Berry, S., Lawrence, Q., Dayananth, P., Ha, P., Tavtigian, S. V., Teng, D. H., and Bartel, P. L. (1998) *Oncogene* **17**(18), 2279-85

Yamada, Y., Warren, A. J., Dobson, C., Forster, A., Pannell, R., and Rabbitts, T. H. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(7), 3890-5

Yu, X. (2000), PhD thesis

Yu, X., and Baer, R. (2000) *J Biol Chem* **275**(24), 18541-9

Yu, X., Wu, L. C., Bowcock, A. M., Aronheim, A., and Baer, R. (1998) *J Biol Chem* **273**(39), 25388-92

Zhang, H., Somasundaram, K., Peng, Y., Tian, H., Bi, D., Weber, B. L., and El-Deiry, W. S. (1998) *Oncogene* **16**(13), 1713-21

【図面の簡単な説明】

【０２３３】

【図１】Lmo4は妊娠期間中に腺房小葉単位で大量に発現される。（A）成体乳腺にはLmo4転写物を発現する乳管上皮の単層が認められる。RNA発現を、完全長マウスLmo4配列に対応するセンス（対照）およびアンチセンスのジゴキシゲニン標識リボプローブを用いたインサイチューハイブリダイゼーションにより評価した。未性交若齢雌成体、妊娠第12日、授乳期第2日および退縮期第4日の乳腺を分析した。センスプローブを、退縮期第3日（図示したもの）ならびに授乳期および妊娠期の乳腺の切片に対してハイブリダイズさせた。本来の倍率は50倍。（B）未性交マウス、妊娠マウス、授乳期マウスおよび強制離乳（退縮期）マウス由来の乳腺のノーザン分析。20μgの全RNAを含むフィルターをマウスLmo4プローブとハイブリダイズさせた。低分子量のバンドはLmo4 RNAの選択的スプライスバリアントまたはクロスハイブリダイズ種を表すと思われる。28Sおよび18SリボソームRNAを示す臭化エチジウム染色ゲルをローディング対照としている。

【図２】Lmo4およびLdb1は、分化誘導がなされたSCp2乳房細胞におけるβ-カゼインおよび乳清酸性タンパク質（Wap）RNAの合成を阻害する。（A）プロラクチン、インスリンおよびヒドロコルチゾンで刺激するか（+）または刺激せずに（-）96時間おいた安定的にトランスフェクトしたSCp2プールに由来する全RNAを用いてRT-PCR分析を行った。β-カゼインおよびHprtをそれぞれ分化およびローディングのマーカーとして用いた。少なくとも5回の独立したトランスフェクションを行った。PCR産物をゲル電気泳動によって分画し、ブロッティングを行った上で内部オリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズさせた。Flag-Ldb1に関する臭化エチジウム染色ゲルは最も右のパネルに示されている。（B）（A）に示したものと同じトランスフェクタントのプールに対して、WapおよびHprtに対して特異的なプライマーを用いるRT-PCR分析を行った。（C）免疫沈降およびウエスタンブロット分析により、SCp2トランスフェクタントにおけるFlag-Lmo4およびFlag-Ldb1が確認された。いずれかの遺伝子を発現する細胞またはエンプティベクターを含む細胞からの可溶化物を、マウス抗Flag抗体を用いる免疫沈降に供し、続いてウサギ抗Lmo4またはウサギ抗Ldb1抗体によるブロッティングを行った。矢印は関連タンパク質を示している。

【図３】LMO4はいくつかのヒト乳癌細胞株で過剰発現される。ヒトおよびマウス（SCp2）乳房上皮細胞株由来のポリ$(A)^+$ RNA（3μg）ノーザン分析。フィルターをマウスLmo4、Ldb1およびGapdh cDNAプローブと逐次的にハイブリダイズさせた。ヒト乳癌細胞株における低分子量のLDB1転写物はクロスハイブリダイズ種を表すと思われる。Lmo4およびLdb1転写物のサイズはマウスSCp2細胞系の方がヒト細胞系よりも小さかった。

【図４】原発性乳癌におけるLMO4 RNAの過剰発現。完全長ヒトLMO4センスおよびアンチセンスリボプローブをジゴキシゲニンで標識したものを用いたインサイチューハイブリダイゼーション。低レベル（AおよびE）、中等度レベル（BおよびF）および高レベル（Cおよ

びG）のLMO4 mRNAを呈する腫瘍標本の低倍率像。LMO4センスリボプローブで得られた染色は無視しうる程度であった（DおよびH）。センス対照（DおよびH）はそれぞれCおよびGに示された腫瘍に対応する。

【図５】原発性乳癌におけるLMO4 RNAおよびLMO4タンパク質の過剰発現。インサイチューハイブリダイゼーション（ジゴキシゲニン標識ヒトLMO4リボプローブを用いる）および免疫組織化学（ラット抗LMO4モノクローナル抗体を用いる）を、保存用乳房標本を含む組織アレイに対して行った。浸潤性小葉癌（A）および2種類の浸潤性乳管癌（BおよびC）におけるLMO4 RNAの高発現（アンチセンスLMO4プローブ）；（D）良性線維腺腫、これはLMO4の低発現を呈する。対応する浸潤性の小葉癌および乳管癌の試料（E、FおよびG）ではLMO4タンパク質の大量発現が検出された。良性試料（H）では低レベルのLMO4タンパク質が検出された。免疫染色に関する対応する陰性対照（Ig）を示している（I、JおよびK）；（L）非浸潤性乳管癌（DCIS）、これはLMO4 RNAの高発現を示す。センスLMO4プローブではいずれの腫瘍試料も全くシグナルが得られなかった。本来の倍率はA～D、100倍；E～K、200倍；L、50倍。

【図６】LMO4とCtIPとの間の相互作用には単一のLIMドメインが必要であり、これはLMOサブクラスに対して特異的であるように思われる。A、CtIPはLMO4およびLMO2と会合する。293T細胞に対して、LMO4（レーン1、3および4）またはLMO2（レーン2）のFlag標識誘導体をコードする発現構築物を、CtIPをコードするものとともにトランスフェクトした。可溶化物を調製し、表記した特異抗血清によってタンパク質を免疫沈降させた。F、Flag；C、アイソタイプを一致させた対照モノクローナル抗体。各パネルの下に表記した抗体を用いてイムノブロット法を行った。レーン4は抗CtIP抗体を用いて行った相互免疫沈降実験を示している。レーン4の25kDバンドは軽鎖を表す。可溶化物のウエスタンブロット分析により、CtIPおよびLMOタンパク質の発現が確かめられた。抗Flag抗体を用いたウエスタン分析によって検出されたLMOタンパク質に関するマーカーのサイズが異なることに注意されたい（レーン4）。B、LMO4の第1のLIMドメインはCtIPと相互作用するが第2のLIMドメインは相互作用しない。293T細胞に対して、LIM1（レーン1）またはLIM2（レーン2）のFlag標識誘導体をコードする発現構築物を、CtIPをコードするプラスミドの存在下でトランスフェクトした。細胞抽出物を抗Flag（F）抗体によって免疫沈降させた後に、抗CtIP抗血清によるイムノブロッティングを行った。可溶化物のウエスタンブロット分析により、CtIPおよびLIMポリペプチドの発現が確かめられた（下のパネル）。C、異種LIMタンパク質はCtIPと相互作用しない。293T細胞に対して、LMO4（レーン1）、Lhx1（レーン2）、Lhx3（レーン3）またはmyc標識LMK1（レーン4）のFlag標識誘導体をコードする発現構築物を、CtIPをコードするプラスミドの存在下でトランスフェクトした。細胞抽出物を抗Flag（F）抗体によって免疫沈降させた後に、抗CtIP抗体によるイムノブロッティングを行った。可溶化物のウエスタンブロット分析により、CtIPおよびLIMタンパク質の発現が確かめられた（下のパネル）。D、HBL100上皮細胞における内因性LMO4タンパク質とCtIPタンパク質との相互作用。核抽出物を免疫前血清（レーン1）または抗LMO4抗血清（レーン2）によって免疫沈降させた後に、抗CtIPモノクローナル抗体を用いてブロッティングを行った。これらの細胞由来の核抽出物を隣接レーンにローディングし、CtIP（レーン3）のサイズ対照とした。

【図７】CtIP内部の2つの領域がLMO4と特異的に相互作用する。A、哺乳動物細胞におけるLMO4との相互作用に関して調べた野生型CtIPおよび欠失変異構築物の概略図。BRCA1と会合する領域および2つのロイシンジッパー（LZ）と推定されるドメインが示されている。各変異体がLMO4と相互作用する能力の概要を示している。B、293T細胞に対して、CtIP（レーン1～6）のHA標識誘導体をコードする発現構築物を、Flag標識LMO4をコードするものとともにトランスフェクトした。可溶化物を調製し、抗Flagモノクローナル抗体（F）またはアイソタイプを一致させた対照（C）モノクローナル抗体を用いてタンパク質を免疫沈降させた。SDS-PAGE電気泳動の後に、CtIPタンパク質に対して特異的なα-HA抗体を用いてウエスタンブロット法を行った。ウエスタンブロット分析により、Flag-LMO4タンパク質およびCtIP変異タンパク質の発現が確かめられた（下のパネル）。

【図８】乳房上皮細胞におけるLMO4およびCtIPの同時発現。「正常」（184）と表記したものおよびヒト乳癌細胞株から単離したポリ(A)$^+$ RNA（3μg）に対するノーザンブロット分析。フィルターにヒトCtIPおよびLMO4のcDNAプローブ、続いて対照GAPDHプローブと逐次的にハイブリダイズさせた。

【図９】LMO4はインビボでCtIPおよびBRCA1と複合体を形成し、BRCA1と直接相互作用する。．A、LMO4、CtIPおよびBRCA1の間のインビボでの特異的相互作用。293T細胞に対して、Flag標識LMO4およびmyc標識BRCA1をコードする発現構築物を、CtIPをコードするプラスミドの存在下（レーン2）または非存在下（レーン1）でトランスフェクトした。可溶化物を調製し、抗mycまたは対照（C）モノクローナル抗体によってタンパク質を免疫沈降させた後に電気泳動によって分画し、その後に抗Flagまたは抗CtIP抗体によるブロッティングを行った。これらの細胞抽出物における個々のタンパク質の発現がウエスタンブロット法によって確かめられた（非提示データ）。B、HBL100上皮細胞において内因性LMO4、BRCA1およびCtIPタンパク質は会合する。核可溶化物をラット抗LMO4モノクローナル（レーン2）または対照抗体（レーン3）によって免疫沈降させた後に、抗BRCA1（上のパネル）または抗CtIP（中央のパネル）モノクローナル抗体によるイムノブロッティングを行った。免疫沈降物を2つのSDS-ポリアクリルアミドゲルに分割し、その一方にはBRCA1（220kD）の検出のために長時間の電気泳動を行い、もう一方には抗CtIP抗体によるイムノブロッティングを行った。対照として、免疫沈降物に抗LMO4モノクローナル抗体によるイムノブロッティングも行った（下のパネル）。HBL100細胞由来の可溶化物を隣接レーンにローディングし、矢印で示した各タンパク質に対するサイズ対照とした（レーン1）。C、哺乳動物細胞におけるLMO4、CtIP、BRCA1およびLdb1の間の相互作用。BRCA1、Flag標識LMO4、CtIPおよびLdb1をコードする発現ベクターをトランスフェクトした293T細胞から得た抽出物を抗CtIP抗体（レーン2）または対照抗体（レーン3）によって免疫沈降させた後に、表記の抗体によるイムノブロッティングを行った。ウエスタンブロット分析により、これらのトランスフェクタントにおける個々のタンパク質の高レベルの発現が確かめられた（レーン1）。

【図１０】BRCA1のC末端BRCTドメインはLMO4との相互作用を媒介する。A、293T細胞に対して、Flag標識LMO4およびHAタグ標識を有するBRCA1のC末端領域（SZ）をコードする発現構築物をトランスフェクトした。可溶化物を抗Flag（F）または対照（C）抗体によって免疫沈降させた後に、抗HA抗体によるウエスタンブロット法を行った。B、LMO4とBRCTドメインはインビトロで相互作用する。インビトロ翻訳した^{35}S-メチオニン標識BRCA1（aa 1528～1863）（SZ断片に対応）を、グルタチオンセファロース上に固定化したGST-LMO4融合タンパク質とともにインキュベートした。結合したタンパク質をSDS-PAGEによって分析した。矢印はBRCA1-SZタンパク質を表す。C、LMO4とBRCA1のBRCT（SZ）領域は酵母Hf7c細胞において相互作用する。酵母細胞に対して表記の発現ベクターによる同時トランスフェクションを行い、his、leuおよびtrpが欠乏した培地上にプレーティングした。β-ガラクトシダーゼ活性に関する染色により、His$^+$ コロニーがLMO4＋CtIPに関して得られ、LMO4＋BRCA1（SZ）形質転換体もβ-Gal$^+$ であることが実証された。BRCA1（SZ）＋ラミン、BRCA1（SZ）単独またはLMO4単独による形質転換を行ったHf7c細胞ではコロニーが得られなかった。

【図１１】BRCA1の腫瘍関連変異体はLMO4と相互作用する。293T細胞に対して、標識LMO4をコードする発現構築物を、myc標識野生型BRCA1（レーン1）またはBRCA1変異体（レーン2～4）とともにトランスフェクトした。可溶化物を調製し、タンパク質を抗Flag（F）または対照（C）モノクローナル抗体によって免疫沈降させた。抗myc抗体によるイムノブロッティングにより、LMO4とすべてのBRCA1誘導体との相互作用が明らかになった。

【図１２】酵母および哺乳動物転写活性化アッセイ法のいずれにおいてもLMO4はBRCA1活性を抑制する。A、酵母LMO4発現ベクターの存在下または非存在下における、GAL4-DBD（DNA結合ドメイン）またはGAL4-BRCA1-AD（活性化ドメイン）融合タンパク質のいずれかを発現するBJ5462細胞におけるβ-ガラクトシダーゼ発現の活性化。転写活性はBRCA1-ADドメインのもの（これを100%に指定）に対する相対値として表現している。B、クロラムフ

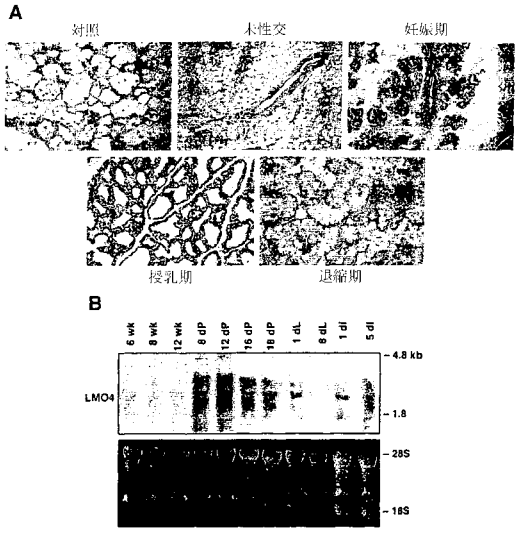
ェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子の上流に5つのGal結合部位を含むpG5CATレポータープラスミドと、LMO4発現構築物またはエンプティベクターのいずれかとの同時トランスフェクションを行った293T細胞におけるBRCA1活性化ドメインの活性。BRCA1-ADドメインをGAL4-DBDと融合させた。酵母細胞および哺乳動物細胞の両方におけるGAL4-DBDの基礎活性を示している。AおよびBにおけるデータは、3回の独立した実験の平均を、表記の平均の標準誤差とともに表している。ウエスタンブロット分析により、酵母細胞または哺乳動物細胞における関連タンパク質の発現（矢印により指示）が確かめられた。

【図１３】マウス組織におけるLMO4発現に関するウエスタンブロット分析。組織可溶化物を野生型およびLMO4ノックアウト型のe16.5齢マウス胚から調製し、タンパク質総量に関して標準化した。50μgの各可溶化物をSDS-PAGEにかけ、抗LMO4 mAB 20F8（A）または16H2（B）によるイムノブロットを行った。

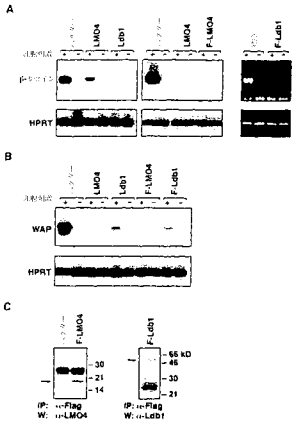
【図１４】e16.5齢の発生中のマウス脳におけるLMO4の発現。ホルマリン固定した野生型（A）およびLMO4ノックアウト（B）胚の切片に対する免疫染色を抗LMO4 mAB 20F8によって行った。

【図１５】e16.5齢の発生中のマウス脳におけるLMO4の発現。ホルマリン固定した野生型（A）およびLMO4ノックアウト（B）胚の切片に対する免疫染色を抗LMO4 mAB 16H2によって行った。

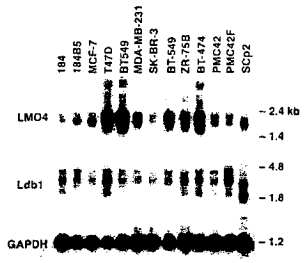
【図１】



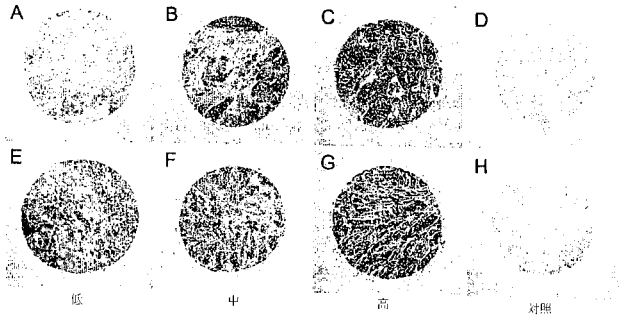
【図２】



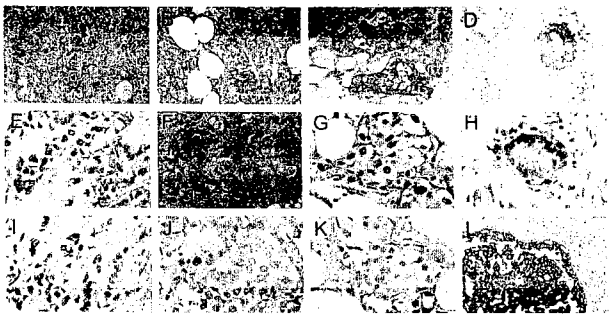
【図３】



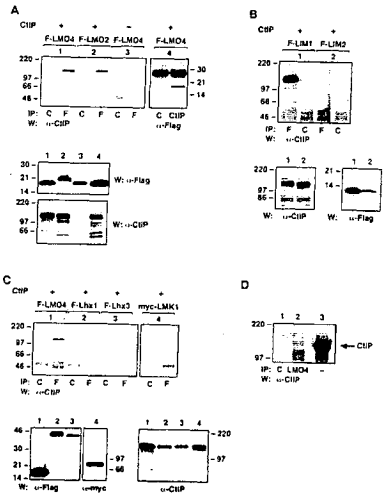
【図４】



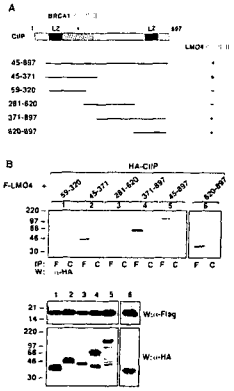
【図５】



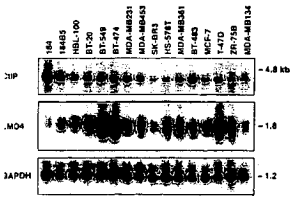
【図６】



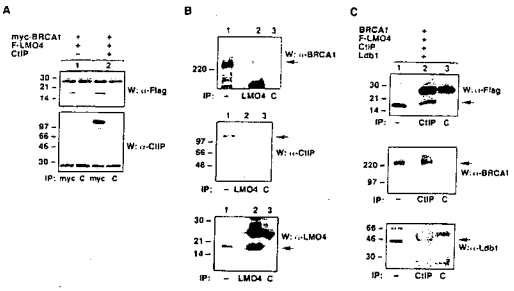
【図７】



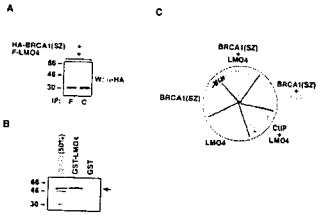
【図８】



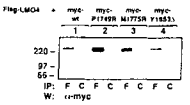
【図９】



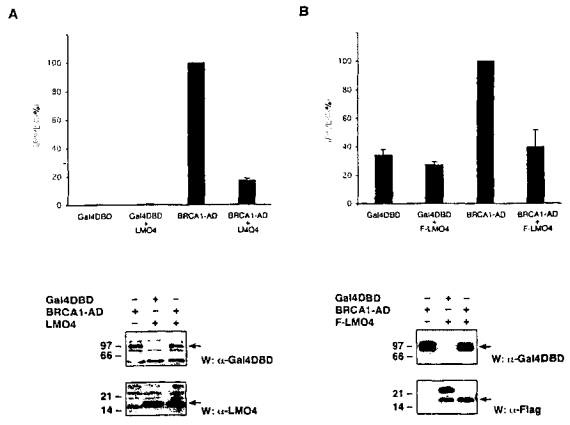
【図１０】



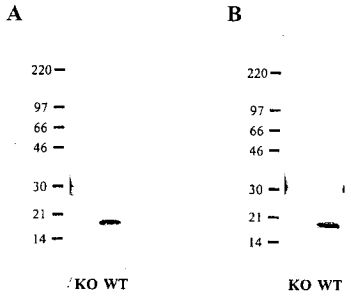
【図１１】



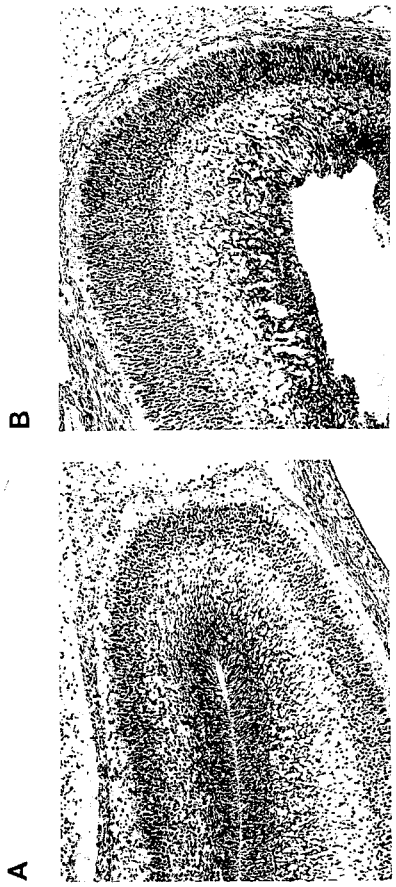
【図１２】



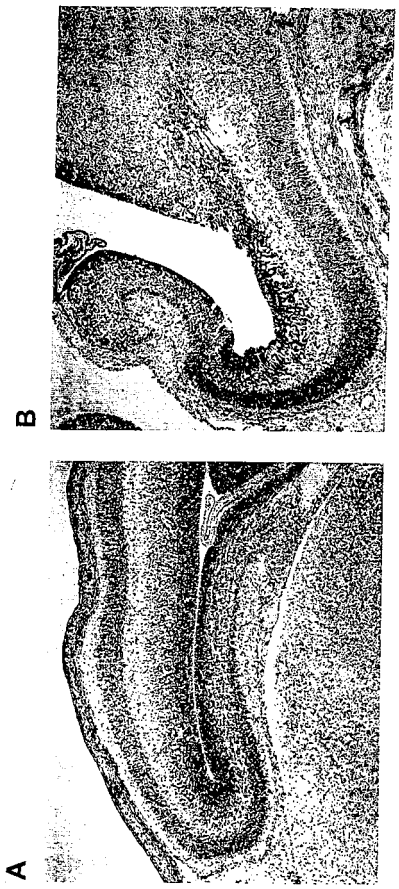
【図１３】



【図１４】



【図１５】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
20 March 2003 (20.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/023404 A1

(51) International Patent Classification[7]: G01N 33/577, 33/574, C12Q 12/168, C07K 16/18, 16/46, C12N 05/12, A61K 39/395, 49/16, A61P 35/00

(21) International Application Number: PCT/AU02/01246

(22) International Filing Date:
12 September 2002 (12.09.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
PR 7618 12 September 2001 (12.09.2001) AU

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **THE WALTER AND ELIZA HALL INSTITUTE OF MEDICAL RESEARCH** [AU/AU]; Royal Parade, Parkville, Victoria 3052 (AU).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **VISVADER, Jane, Ellen** [AU/AU]; 12 Holroyd Street, Kew, Victoria 3101 (AU). **LINDEMAN, Geoffrey, John** [AU/AU]; 12 Holroyd Street, Kew, Victoria 3101 (AU). **SUM, Eleanor, Y., M.** [AU/AU]; 52A Carlisle Street, Preston, Victoria 3072 (AU). **O'REILLY, Lorraine, Ann** [GB/AU]; 20 Moonda Grove, Cheltenham, Victoria 3192 (AU).

(74) Agents: **OBRANOVICH, Tania, Daniela** et al.; Davies Collison Cave, 1 Little Collins Street, Melbourne, Victoria 3000 (AU).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, 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, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: A METHOD OF DIAGNOSIS AND TREATMENT AND AGENTS USEFUL FOR SAME

(57) Abstract: The present invention relates generally to a method for detecting an aberrant cell, and more particularly an aberrant epithelial cell, in a subject or in a biological sample from said subject and agents useful for same. More particularly, the present invention relates to a method of deleting an aberrant mammary epithelial cell. The presence of the aberrant cell or group of aberrant cells provides an indication of a particular disease or condition or a propensity for development of a disease or condition. More particularly, the present invention contemplates a method for detecting a cell associated with breast cancer or having a propensity to develop into a breast cancer in a subject or in a biological sample from said subject by determining the relative increase in the presence of the LM04 protein or a related protein or a relative increase in LM04 activity or a relative increase in the presence of expression products from a gene encoding the LM04 protein or a related protein. The present invention further provides a method for diagnosing the presence of a cancer or cancerous-like growth, in particular breast cancer in a subject or in a biological sample from said subject by screening for up-regulation of LM04 or a related protein in a cell or group of cells or an up-regulation in the presence of expression products of genetic sequences encoding LM04 or a related protein. The present invention provides diagnostic agents useful for detecting LM04 or expression products of genetic material encoding LM04. Such diagnostic agents include immunointeractive molecules, such as antibodies, and genetic probes for detecting expression products of LM04 genes. The present invention further provides genetically modified animals exhibiting altered levels of LM04. Such animals are useful models for screening for anti-cancer agents. The present invention still further relates generally to a method of modulating LM04 related cellular proliferation and to agents useful for same. More particularly, the present invention contemplates a method of modulating breast cell proliferation by modulating LM04 nucleic acid expression and/or LM04 functioning. The method of the present invention is useful, *inter alia*, in the treatment and/or prophylaxis of conditions characterised by aberrant, unwanted or otherwise inappropriate LM04 regulated cellular proliferation. The present invention is further directed to methods for identifying and/or designing agents capable of modulating LM04 regulated cellular proliferation.

WO 03/023404 A1

A METHOD OF DIAGNOSIS AND TREATMENT AND AGENTS USEFUL FOR SAME

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates generally to a method for detecting an aberrant cell, and more particularly an aberrant epithelial cell, in a subject or in a biological sample from said subject and agents useful for same. More particularly, the present invention relates to a method of deleting an aberrant mammary epithelial cell. The presence of the aberrant cell or group of aberrant cells provides an indication of a particular disease or condition or a propensity for development of a disease or condition. More particularly, the present invention contemplates a method for detecting a cell associated with breast cancer or having a propensity to develop into a breast cancer in a subject or in a biological sample from said subject by determining the relative increase in the presence of the LM04 protein or a related protein or a relative increase in LM04 activity or a relative increase in the presence of expression products from a gene encoding the LM04 protein or a related protein. The present invention further provides a method for diagnosing the presence of a cancer or cancerous-like growth, in particular breast cancer in a subject or in a biological sample from said subject by screening for up-regulation of LM04 or a related protein in a cell or group of cells or an up-regulation in the presence of expression products of genetic sequences encoding LM04 or a related protein. The present invention provides diagnostic agents useful for detecting LM04 or expression products of genetic material encoding LM04. Such diagnostic agents include immunointeractive molecules, such as antibodies, and genetic probes for detecting expression products of LM04 genes. The present invention further provides genetically modified animals exhibiting altered levels of LM04. Such animals are useful models for screening for anti-cancer agents.

The present invention still further relates generally to a method of modulating LM04 related cellular proliferation and to agents useful for same. More particularly, the present invention contemplates a method of modulating breast cell proliferation by modulating LM04 nucleic acid expression and/or LM04 functioning. The method of the present

invention is useful, *inter alia*, in the treatment and/or prophylaxis of conditions characterised by aberrant, unwanted or otherwise inappropriate LM04 regulated cellular proliferation. The present invention is further directed to methods for identifying and/or designing agents capable of modulating LM04 regulated cellular proliferation.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Bibliographic details of the publications referred to by both author and numerically in this specification are collected at the end of the description.

The reference to any prior art in this specification is not, and should not be taken as, an acknowledgment or any form of suggestion that that prior art forms part of the common general knowledge in Australia.

The LIM domain defines a conserved cysteine-rich structure comprising two tandemly repeated zinc fingers and is found in a large group of diverse proteins (reviewed in 1, 2). This motif, originally identified in LIM-homeodomain transcription factors, may either occur alone (as one or more copies) or in association with heterologous domains such as a protein kinase or homeobox domain. Targeted gene disruption has established that LIM domain-containing proteins have critical functions in cell-fate specification and differentiation (3).

The LMO family consists of four members (designated LM01-4), each of which comprises two tandem LIM domains. LM02 is essential for embryonic hematopoiesis and is thought to function at the level of the pluripotent stem cell (11). Little is known about the function of LM03, discovered on the basis of sequence homology. The most recently described member, LM04, was isolated by virtue of its interaction with Ldb1/NL1/CLIM and in an expression screen with autologous serum (12-15). Ldb1 is a multifunctional adaptor protein that interacts with LMO proteins and other nuclear LIM-containing factors (16-19). The LM04 gene is widely expressed in both embryonic and adult tissues (12, 13, 15). Like the other members of this family, it is presumed that LM04 is a transcriptional cofactor

that primarly functions as a docking site for other factors. LM04 may also contribute an activation or repression domain to influence transcriptional activity.

In work leading up to the present invention the inventors have determined that LM04 plays a role in mammary development and in breast oncogenesis. The LM04 gene is developmentally regulated in mammary epithelium and LM04 together with Ldb1 have been found to act as negative regulators of mammary epithelial differentiation. Significantly, overexpression of the LM04 gene was found in greater than 50% of primary breast cancers, indicating that this protein contributes to the pathogenesis of breast cancer.

SUMMARY OF THE INVENTION

Throughout this specification and the claims which follow, unless the context requires otherwise, the word "comprise", and variations such as "comprises" and "comprising", will be understood to imply the inclusion of a stated integer or step or group of integers or steps but not the exclusion of any other integer or step or group of integers or steps.

The subject specification contains nucleotide sequence information prepared using the programme PatentIn Version 3.0, presented herein after the bibliography. Each nucleotide sequence is identified in the sequence listing by the numeric indicator <201> followed by the sequence identifier (eg. <210>1, <210>2, etc). The length, type of sequence (DNA, etc) and source organism for each nucleotide sequence is indicated by information provided in the numeric indicator fields <211>, <212> and <213>, respectively. Nucleotide sequences referred to in the specification are identified by the indicator SEQ ID NO: followed by the sequence identifier (eg. SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, etc.). The sequence identifier referred to in the specification correlates to the information provided in numeric indicator field <400> in the sequence listing, which is followed by the sequence identifier (eg. <400>1, <400>2, etc). That is SEQ ID NO:1 as detailed in the specification correlates to the sequence indicated as <400>1 in the sequence listing.

One aspect of the present invention contemplates a method for detecting an aberrant cell in a subject or in a biological sample from said subject, said method comprising contacting cells or cell extracts from said subject or said biological sample with an immunointeractive molecule specific for LM04 or antigenic portion thereof and screening for the level of immunointeractive molecule-LM04 complex formation wherein an elevated presence of said complex relative to a normal cell is indicative of an aberrant cell.

Another aspect of the present invention contemplates a method for detecting an aberrant epithelial cell in a subject or in a biological sample from said subject, said method comprising contacting mammary cells or mammary cell extracts from said subject or said biological sample with an immunointeractive molecule specific for LM04 or antigenic

portion thereof and screening for the level of immunointeractive molecule-LM04 complex formation wherein an elevated presence of said complex relative to a normal epithelial cell is indicative of an aberrant epithelial cell.

Yet another aspect of the present invention contemplates a method for detecting an aberrant mammary cell in a subject or in a biological sample from said subject, said method comprising contacting mammary cells or mammary cell extracts from said subject or said biological sample with an immunointeractive molecule specific for LM04 or antigenic portion thereof and screening for the level of immunointeractive molecule-LM04 complex formation wherein an elevated presence of said complex relative to a normal mammary cell is indicative of an aberrant mammary cell.

In a related aspect, the present invention provides a method for detecting an aberrant cell in a subject or in a biological sample from said subject, said method comprising screening the level of a transcription product of a gene encoding LM04 wherein an elevated level of said expression product compared to a normal cell is indicative of an aberrant cell.

In another aspect, there is provided a method for detecting an aberrant epithelial cell in a subject or in a biological sample from said subject, said method comprising screening the level of a transcription product of a gene encoding LM04 wherein an elevated level of said expression product compared to a normal epithelial cell is indicative of an aberrant epithelial cell.

In yet another aspect there is provided a method for detecting an aberrant mammary cell in a subject or in a biological sample from said subject, said method comprising screening the level of a transcription product of a gene encoding LM04 wherein an elevated level of said expression product compared to a normal mammary cell is indicative of an aberrant mammary cell.

Still yet another aspect of the present invention contemplates a method for diagnosing the presence of a neoplasm or neoplasm-like growth in a subject, said method comprising

contacting cells or cell extracts from said subject or a biological sample from said subject with a LM04-binding effective amount of an antibody having specificity for said LM04 or an antigenic determinant or epitope thereon and then quantitatively or qualitatively determining the level of a LM04-antibody complex wherein the presence of elevated levels of said complex compared to a normal cell is indicative of the presence of a neoplasm.

Yet still another aspect of the present invention provides a method for diagnosing the presence of a neoplasm in a subject, said method comprising obtaining mRNA from cells of said subject or from a biological sample from said subject and optionally generating cDNA and contacting said mRNA or cDNA with a genetic probe capable of hybridizing to and/or amplifying all or part of a nucleotide sequence encoding LM04 or its complementary nucleotide sequence and then detecting the level of said mRNA or cDNA wherein the presence of elevated levels of said mRNA or cDNA compared to normal controls is indicative of the presence of a neoplasm.

A further aspect of the present invention provides an antibody and in particular a monoclonal antibody for use in immunological assays for LM04 or for cancer imaging *in vivo*. The antibody may be directed either to the LM04 protein or the LM04 mRNA, for example

In another aspect the subject antibody is 16H2 or 20F8 or derivative, homologue, analogue, chemical equivalent, mutant or mimetic thereof.

Yet another further aspect of the present invention contemplates a deimmunized antibody molecule having specificity for an epitope recognized by a monoclonal antibody to LM04 wherein at least one of the CDRs of the variable domain of said deimmunized antibody is derived from the said monoclonal antibody to LM04 and the remaining immunoglobulin-derived parts of the deimmunized antibody molecule are derived from an immunoglobulin or an analogue thereof from the host for which the antibody is to be deimmunized.

Still another aspect of the present invention contemplates an assay to detect LM04

including the steps of:-

(1) contacting a monoclonal antibody specific to LM04 or an antigenic determinant thereon with a biological sample suspected of containing a cell containing said LM04; and

(2) subjecting the complex formed in step (1) to a signal detection step.

Another aspect of the present invention contemplates a method for detecting neoplastic cells in a human patient, said method comprising introducing into said patient a deimmunized form of a non-human derived monoclonal antibody specific for human LM04 or an antigenic determinant thereon labelled with a reporter molecule, allowing dissemination of the labelled antibody throughout the circulatory system, or to selected parts of the circulatory system and then subjecting said patient to reporter molecule-detection means to identify the location of the antibody.

Yet another aspect of the present invention provides a method of detecting, in a sample, LM04 or fragment, variant or derivative thereof comprising contacting the sample with an antibody or fragment or derivative thereof and detecting the level of a complex comprising said antibody and LM04 or fragment, variant or derivative thereof compared to normal controls wherein elevated levels of LM04 is indicative of cancer growth.

Still another aspect of the present invention provides a method of monitoring for the onset or progression of a neoplasm in a subject, said method comprising screening for the level of LM04 or a transcription product of a gene encoding LM04 in a biological sample from said subject wherein an elevated level of said LM04 or transcription product compared to the levels of a normal cell is indicative of a neoplasm.

Yet still another aspect of the present invention contemplates the use of a monoclonal antibody to LM04 in the manufacture of a quantitative or semi-quantitative diagnostic kit to determine relative levels of LM04 in suspected neoplastic cells from a patient.

Still yet another aspect of the present invention provides a method of modulating LM04 regulated cellular proliferation, said method comprising contacting said cell with an effective amount of an agent for a time and under conditions sufficient to modulate *LM04* expression or LM04 functional activity wherein inhibiting or otherwise antagonising said expression or activity down-regulates said cellular proliferation.

The present invention more particularly provides a method of modulating LM04-regulated mammary cell proliferation, said method comprising contacting said cell with an effective amount of an agent for a time and under conditions sufficient to modulate *LM04* expression or LM04 functional activity wherein inhibiting or otherwise antagonising said expression or activity down-regulates said cellular proliferation.

Another further aspect of the present invention provides a method for detecting an agent capable of modulating *LM04* expression or LM04 functional activity said method comprising contacting a cell or extract thereof containing said *LM04* or LM04 with a putative agent and detecting an altered expression phenotype associated with said interaction.

Another further aspect of the present invention is directed to the method for the treatment and/or prophylaxis of a conditions characterised by aberrant, unwanted or otherwise inappropriate LM04-regulated proliferative activity in a mammal, said method comprising administering to said mammal an effective amount of an agent for a time and under conditions sufficient to modulate *LM04* expression or LM04 functional activity wherein inhibiting or otherwise antagonising said expression or activity down-regulates said cellular proliferation.

In yet another further aspect there is provided a method for the treatment and/or prophylaxis of a neoplastic condition said method comprising administering to said mammal an effective amount of an agent for a time and under conditions sufficient to

down-regulate *LM04* expression or LM04 functional activity wherein inhibiting or otherwise antagonising said expression or activity down-regulates cellular proliferation.

Still another further aspect of the present invention contemplates the use of an agent, as hereinbefore defined, in the manufacture of medicament for the treatment of a condition in a mammal, which condition is characterised by aberrant, unwanted or otherwise inappropriate LM04-regulated cellular proliferation, wherein said agent modulates *LM04* expression or LM04 activity and wherein inhibiting or otherwise antagonising said expression or activity down-regulates said cellular proliferation.

In yet another further aspect, the present invention contemplates a pharmaceutical composition comprising the modulatory agent as hereinbefore defined together with one or more pharmaceutically acceptable carriers and/or diluents. Said agents are referred to as the active ingredients.

Yet another aspect of the present invention relates to the agent as hereinbefore defined, when used in the method of the present invention.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1: *Lmo4* is abundantly expressed in the lobuloalveolar units during pregnancy. (*A*) A single layer of ductal epithelium expressing *Lmo4* transcripts is evident in the adult mammary gland. RNA expression was assessed by *in situ* hybridisation using sense (control) and antisense digoxigenin-labeled riboprobes corresponding to full-length mouse *Lmo4* sequence. Young adult virgin, 12 day pregnant, 2 day lactating and 4 day involuting mammary glands were analysed. The sense probe was hybridised to sections of 3 day involuting (shown), as well as those of lactating and pregnant mammary glands. Orig. mag. 50x (*B*) Northern analysis of mammary glands from virgin, pregnant, lactating and force-weaned (involution) mice. Filters containing 20 μg total RNA were hybridised with a mouse *Lmo4* probe. The lower molecular weight bands may represent either an alternatively spliced variant of *Lmo4* RNA or a cross-hybridising species. The ethidium bromide stained gel showing 28S and 18S ribosomal RNA provides a loading control.

Figure 2: Lmo4 and Ldb1 inhibit *β-casein* and *whey acidic protein* (*Wap*) RNA synthesis in SCp2 mammary cells induced to differentiate. (*A*) RT-PCR analysis was performed using total RNA derived from stably transfected SCp2 pools that were stimulated (+) with prolactin, insulin and hydrocortisone or unstimulated (-) for 96 hrs. *β-casein* and *Hprt* were used as markers of differentiation and loading, respectively. At least five independent transfections were performed. PCR products were fractionated by gel electrophoresis, blotted and hybridised with internal oligonucleotide probes. The ethidium bromide stained gel for Flag-*Ldb1* is shown in rightmost panel. (*B*) RT-PCR analysis was performed on the same pools of transfectants as shown in (A), using primers specific for *Wap* and *Hprt*. (*C*) Immunoprecipitation and Western blot analysis confirmed expression of Flag-Lmo4 and Flag-Ldb1 in SCp2 transfectants. Lysates from cells expressing either gene or containing empty vector were subjected to immunoprecipitation using mouse anti-Flag antibody and then blotted with rabbit anti-Lmo4 or rabbit anti-Ldb1 antibody. Arrows indicate relevant proteins.

Figure 3: *LMO4* is overexpressed in several human breast cancer cell lines. Northern analysis of poly(A)$^+$ RNA (3 μg) from human and mouse (SCp2) breast epithelial cell lines. Filters were sequentially hybridised with mouse *Lmo4*, *Ldb1* and *Gapdh* cDNA probes. The lower molecular weight *LDB1* transcript in human breast cancer cell lines may represent a cross-hybridising species. Sizes of the *Lmo4* and *Ldb1* transcripts were lower in the mouse SCp2 cell line relative to those in human cell lines.

Figure 4: Overexpression of *LMO4* RNA in primary breast cancer. *In situ* hybridisation using full-length human *LMO4* sense and antisense riboprobes labeled with digoxigenin. Low magnification of tumor specimens displaying low (*A* and *E*), moderate (*B* and *F*) and high (*C* and *G*) levels of *LMO4* mRNA. The *LMO4* sense riboprobe gave negligible staining (*D* and *H*). Sense controls (*D* and *H*) correspond to the tumors shown in *C* and *G*, respectively.

Figure 5: Overexpression of *LMO4* RNA and LMO4 protein in primary breast cancer. *In situ* hybridisation (using digoxigenin-labeled human *LMO4* riboprobes) and immunohistochemistry (using a rat anti-LMO4 monoclonal antibody) were performed on tissue arrays containing archival breast specimens. High *LMO4* RNA expression in an infiltrating lobular carcinoma (*A*), and two infiltrating ductal carcinomas (*B* and *C*) (antisense LMO4 probe); (*D*) Benign fibroadenoma, displaying low expression of *LMO4*. Abundant LMO4 protein expression was detected in the corresponding infiltrating lobular and ductal cancer samples (*E*, *F* and *G*). Low levels of LMO4 protein were detected in the benign sample (*H*). Corresponding negative controls (Ig) for immunostaining are shown (*I*, *J* and *K*); (*L*) Ductal carcinoma *in situ* (DCIS), showing high expression of *LMO4* RNA. Sense LMO4 probe gave no signal for any of the tumor samples. Orig. mag. *A-D*, 100x; *E-K*, 200x; *L*, 50x.

Figure 6: Interaction between LM04 and CtIP requires a single LIM domain and appears to be specific for the LMO subclass. *A*, CtIP associates with LMO4 and LMO2. 293T cells were transfected with expression constructs encoding Flag-tagged derivatives of LMO4

(lanes 1, 3 and 4) or LMO2 (lane 2), together with that encoding CtIP. Lysates were prepared and proteins immunoprecipitated with the indicated specific antisera. F, Flag; C, control isotype-matched monoclonal antibody. Immunoblotting was performed with the antibodies indicated under each panel. Lane 4 depicts the reciprocal immunoprecipitation experiment performed using an anti-CtIP antibody. The 25 kD bands in lane 4 represent light chain. Western blot analysis of lysates confirmed expression of CtIP and LMO proteins. Note the different size markers indicated for LMO proteins detected by western analysis using anti-Flag antibody (lane 4). *B*, The first LIM domain but not the second LIM domain of LMO4 interacts with CtIP. 293T cells were transfected with expression constructs encoding Flag-tagged derivatives of LIM1 (lane 1) or LIM2 (lane 2), in the presence of plasmid encoding CtIP. Cell extracts were immunoprecipitated with anti-Flag (F) antibody, then immunoblotted with anti-CtIP antisera. Western blot analysis of lysates confirmed expression of CtIP and LIM polypeptides (lower panels). *C*, Heterologous LIM proteins do not interact with CtIP. 293T cells were transfected with expression constructs encoding Flag-tagged derivatives of LMO4 (lane 1), Lhx1 (lane 2), Lhx3 (lane 3), or myc-tagged LMK1 (lane 4), in the presence of plasmid encoding CtIP. Cell extracts were immunoprecipitated with anti-Flag (F) antibody, then immunoblotted with anti-CtIP antibody. Western blot analysis of lysates confirmed expression of CtIP and LIM proteins (lower panels). *D*, Interaction between endogenous LMO4 and CtIP proteins in HBL100 epithelial cells. Nuclear extracts were immunoprecipitated with pre-immune serum (lane 1) or anti-LMO4 antisera (lane 2), then blotted using anti-CtIP monoclonal antibody. Nuclear extract from these cells was loaded in an adjacent lane to provide a size control for CtIP (lane 3).

Figure 7: Two regions within CtIP specifically interact with LMO4. *A*, Schematic representation of wild-type CtIP and deletion mutant constructs that were tested for interaction with LMO4 in mammalian cells. The region that associates with BRCA1 and two putative leucine zipper (LZ) domains are indicated. A summary of each mutant's ability to interact with LMO4 is shown. *B*, 293T cells were transfected with expression constructs encoding HA-tagged derivatives of CtIP (lanes 1-6), together with that encoding Flag-tagged LMO4. Lysates were prepared and proteins immunoprecipitated using anti-

Flag monoclonal antibody (F) or control isotype-matched (C) monoclonal antibody. After SDS-PAGE electrophoresis, western blotting was performed using α-HA antibody, specific for CtIP protein. Western blot analysis confirmed expression of Flag-LMO4 and CtIP mutant proteins (lower panels).

Figure 8: Coexpression of LMO4 and CtIP in breast epithelial cells. Northern blot analysis of poly(A)$^+$ RNA (3 μg) isolated from the indicated 'normal'(184) and human breast cancer cell lines. The filter was sequentially hybridized with human CtIP and LMO4 cDNA probes, followed by the control GAPDH probe.

Figure 9: LMO4 forms a complex with CtIP and BRCA1 *in vivo* and directly interacts with BRCA1. *A*, Specific interaction between LMO4, CtIP and BRCA1 *in vivo*. 293T cells were transfected with expression constructs encoding Flag-tagged LMO4 and myc-tagged BRCA1 in the presence (lane 2) or absence of plasmid encoding CtIP (lane 1). Lysates were prepared and proteins were immunoprecipitated with anti-myc or control (C) monoclonal antibody, then fractionated by electrophoresis, before blotting with either anti-Flag or anti-CtIP antibody. Expression of individual proteins in these cell extracts was confirmed by western blotting (data not shown). *B*, Endogenous LMO4, BRCA1 and CtIP proteins associate in HBL100 epithelial cells. Nuclear lysates were immunoprecipitated with a rat anti-LMO4 monoclonal (lane 2) or control antibody (lane 3), then immunoblotted with anti-BRCA1 (upper panel) or anti-CtIP (middle panel) monoclonal antibody. The immunoprecipitate was divided between two SDS-polyacrylamide gels, one of which underwent extended electrophoresis for detection of BRCA1 (220 kD) while the other was immunoblotted with anti-CtIP antibody. As a control, immunoprecipitate was also blotted with anti-LMO4 monoclonal antibody (lower panel). Lysate from HBL100 cells was loaded in an adjacent lane to provide a size control for the respective proteins (lane 1), indicated by arrows. *C*, Interaction between LMO4, CtIP, BRCA1 and Ldb1 in mammalian cells. Extracts derived from 293T cells transfected with expression vectors encoding BRCA1, Flag-tagged LMO4, CtIP and Ldb1 were immunoprecipitated with anti-CtIP antibody (lane 2) or control antibody (lane 3), then immunoblotted with the indicated

antibodies. Western blot analysis confirmed high level expression of individual proteins in these transfectants (lane 1).

Figure 10: The C-terminal BRCT domains of BRCA1 mediate interaction with LMO4. *A*, 293T cells were transfected with expression constructs encoding Flag-tagged LMO4 and the C-terminal region (SZ) of BRCA1 carrying an HA-tag. Lysates were immunoprecipitated with anti-Flag (F) or control (C) antibody, then western blotted with anti-HA antibody. *B*, LMO4 and the BRCT domain interact *in vitro*. *In vitro* translated ^{35}S-methionine-labeled BRCA1 (aa 1528 – 1863), corresponding to the SZ fragment, was incubated with GST-LMO4 fusion protein immobilised on glutathione sepharose. Bound proteins were analysed by SDS-PAGE. Arrow depicts the BRCA1-SZ protein. C, LMO4 and the BRCT (SZ) region of BRCA1 interact in yeast Hf7c cells. Yeast cells were cotransformed with the indicated expression vectors and plated on media deficient in his, leu and trp. Staining for β-galactosidase activity verified that the His$^+$ colonies obtained for LMO4 + CtIP and LMO4 + BRCA1 (SZ) transformants were also β-Gal$^+$. No colonies were obtained for Hf7c cells transformed with BRCA1 (SZ) + lamin, BRCA1 (SZ) alone or LMO4 alone.

Figure 11: Tumor-associated mutants of BRCA1 interact with LMO4. 293T cells were transfected with expression constructs encoding Flag-tagged LMO4 together with myc-tagged wild-type BRCA1 (lane 1) or mutants of BRCA1 (lanes 2 - 4). Lysates were prepared and proteins immunoprecipitated with anti-Flag (F) or control (C) monoclonal antibody. Immunoblotting with anti-myc antibody revealed interactions between LMO4 and all BRCA1-derivatives.

Figure 12: LMO4 represses BRCA1 activity in both yeast and mammalian transcriptional activation assays. *A*, Activation of β-galactosidase expression in BJ5462 cells expressing either GAL4-DBD (DNA-binding domain) or GAL4-BRCA1-AD (activation domain) fusion protein in the presence or absence of a yeast LMO4 expression vector. Transcriptional activity is expressed relative to that of the BRCA1-AD domain, which was designated to be 100%. *B*, Activity of the BRCA1 activation domain in 293T cells

cotransfected with the pG5CAT reporter plasmid, containing five Gal binding sites upstream of the chloramphenicol acteyltransferase gene, and either an LMO4 expression construct or empty vector. The BRCA1-AD domain was fused to the GAL4-DBD. Basal activity of the GAL4-DBD is shown in both yeast and mammalian cells. The data in A and B represent an average of three independent experiments with standard error of the mean indicated. Western blot analysis confirmed expression of the relevant proteins, designated by arrows, in yeast or mammalian cells.

Figure 13: Western blot analysis of LMO4 expression in mouse tissue. Tissue lysates were prepared from wild-type and LMO4 knock-out e16.5 mouse embryos and normalised for total protein content. 50 μg of each lysate was subjected to SDS-PAGE and then immunoblotted with anti-LMO4 mAB 20F8 (A) or 16H2 (B).

Figure 14: Expression of LMO4 in the developing mouse brain at e16.5. Immunostaining was performed on formalin-fixed wild-type (A) and LMO4 knock-out (B) embryo sections with anti-LMO4 mAB 20F8.

Figure 15: Expression of LMO4 in the developing mouse brain at e16.5. Immunostaining was performed on formalin-fixed wild-type (A) and LMO4 knock-out (B) embryo sections with anti-LMO4 mAB 16H2.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention is predicated in part on the determination that LM04 expression is up-regulated in cancer cells, in particular in epithelial cancer cells, and most particularly in breast cancer cells relative to normal breast cells. The identification of this cancer-specific marker permits development of a range of diagnostic agents, including cancer imaging agents and cancer targeting agents having therapeutic applications. These determinations also permit the rational design of therapeutic and/or prophylactic methods for treating conditions, such as those characterised by aberrant or unwanted LM04 regulated proliferation.

Accordingly, one aspect of the present invention contemplates a method for detecting an aberrant cell in a subject or in a biological sample from said subject, said method comprising contacting cells or cell extracts from said subject or said biological sample with an immunointeractive molecule specific for LM04 or antigenic portion thereof and screening for the level of immunointeractive molecule-LM04 complex formation wherein an elevated presence of said complex relative to a normal cell is indicative of an aberrant cell.

Reference to an "aberrant" cell should be understood as a reference to a cell which exhibits undesirable, unwanted or otherwise inappropriate functional activity. The subject functional activity is preferably inappropriate proliferation or differentiation. Most preferably, the inappropriate functional activity is inappropriate growth such as is exhibited by, for example, a neoplastic cell.

Reference to a "neoplasm" should be understood as a reference to a lesion, tumour or other encapsulated or unencapsulated mass or other form of growth which comprises neoplastic cells. A "neoplastic cell" should be understood as a reference to a cell exhibiting abnormal growth. The term "growth" should be understood in its broadest sense and includes reference to proliferation. In this regard, an example of abnormal cell growth is the uncontrolled proliferation of a cell. The neoplastic cell may be a benign cell or a

malignant cell. The subject neoplastic cell may be any cell type such as an epithelial or a non-epithelial cell.

The common medical meaning of the term "neoplasia" refers to "new cell growth" that results as a loss of responsiveness to normal growth controls, e.g. to neoplastic cell growth. A "hyperplasia" refers to cells undergoing an abnormally high rate of growth. However, as used herein, the terms "neoplasia" and "hyperplasia" can be used interchangeably, referring generally to cells experiencing abnormal cell growth rates. Neoplasis and hyperplasis include "tumors" which may be either benign, pre-malignant or malignant.

As used herein, the terms "hyperproliferative" and "neoplastic" are used interchangeably and refer to those cells in an abnormal state or condition characterized by rapid proliferation or neplasm. The terms are meant to include all types of cancerous growths or oncogenic processes, metastatic tissues or malignantly transformed cells, tissues or organs irrespective of histopathologic type or state of invasiveness. "Pathologic hyperproliferative" cells occur in disease states characterized by malignant tumor growth.

The term "carcinoma" is recognized by those skilled in the art and refers to malignancies of epithelial or endocrine tissues including respiratory system carcinomas, gastrointestinal system carcinomas, genitourinary system carcinomas, testicular carcinomas, breast carcinomas, prostatis carcinomas, endocrine system carcinomas and melanomas. Exemplary carcinomas include those forming from tissue of the breast. The term also includes carcinosarcomas, e.g. which include malignant tumors composed of carcinomatous and sarcomatous tissues. An "adenocarcinoma" refers to a carcinoma derived from glandular tissue or in which the tumor cells form recognizable glandular structures.

As detailed hereinbefore the term "neoplasm" as used herein encompasses all the terms discussed in the preceding three paragraphs.

Examples of neoplasms and neoplastic cells encompassed by the present invention include, but are not limited to, central nervous system tumors, Retinoblastoma, head and neck cancers (eg. squamous cell cancers), lung cancer (both small and non-small cell lung cancer), kidney cancers (eg. renal cell adenocarcinoma), pancreatic neoplasias (eg. adenocarcinomas and islet cell tumors), colorectal cancer, cervical cancer, testicular cancer (eg. germ cell tumors), ovarian cancer (eg. ovarian epithelial cancer and ovarian germ cell tumors), lymphomas, leukemias, malignant melanomas, neuroendocrine tumors and carcinoid tumors

In one preferred embodiment, the subject aberrant cell is an epithelial cell.

Reference to "epithelial cell" should be understood as a reference to the cell type which can form epithelium and which is derived from either of the endoderm or the ectoderm. Epithelium consists of closely packed cells which form a sheet and generally comprise very little intercellular material. Epithelial cell types can vary thereby giving rise to various types of epithelia including squamous, cuboidal, columnar and ciliated epithelia. There are three main types of epithelial tissue, these being covering/lining epithelium (which generally forms a membrane over the outer surface of the body and walls of the internal cavities, such as the gastrointestinal tract and the respiratory tract), glandular epithelium and sensory epithelium, being the epithelium which can form part of the sensory organs. The phrase "epithelial cells" should also be understood as a reference to cells which exhibit one or more of the morphology, phenotype and/or functional activity of epithelial cells and is also a reference to mutants or variants thereof. "Variants" include, but are not limited to, cells exhibiting some but not all of the morphological or phenotypic features or functional activities of epithelial cells at any differentiative stage of development. "Mutants" include, but are not limited to, epithelial cells which have been naturally or non-naturally modified such as cells which are genetically modified.

It should also be understood that the cells of the present invention may be at any differentiative stage of development. Accordingly, the cells may be immature and therefore functionally incompetent in the absence of further differentiation. In this regard,

highly immature cells such as stem cells, which retain the capacity to differentiate into a particular cell type, such as an epithelial cell or a mammary cell, should nevertheless be understood to satisfy the definition of "epithelial cell" or "mammary cell" as utilised herein due to their *capacity* to differentiate into these cell types under appropriate conditions.

Accordingly, in one preferred embodiment the present invention contemplates a method for detecting an aberrant epithelial cell in a subject or in a biological sample from said subject, said method comprising contacting mammary cells or mammary cell extracts from said subject or said biological sample with an immunointeractive molecule specific for LM04 or antigenic portion thereof and screening for the level of immunointeractive molecule-LM04 complex formation wherein an elevated presence of said complex relative to a normal epithelial cell is indicative of an aberrant epithelial cell.

In another preferred embodiment, the subject aberrant cell is a mammary cell.

Without limiting the present invention to any one theory or mode of action, the mammary gland is a structurally dynamic organ which varies with age, menstrual cycle and reproductive status. It is a branched tubuloalveolar gland exhibiting secretory acinii which are grouped with inner lobules and drain into intralobular ducts which in turn drain into interlobular ducts. The lobules are organised into 15-20 lobes, each of which empty into separate lactiferous sinuses and from there into lactiferous ducts. The intralobular stroma consists of a loose connective tissue with a zone of hormone sensitive fibroblasts surrounding the lobular epithelial components. These are thought to take part in epithelial/basement membrane/stromal inductive interactions during morphogenesis and differentiation. The mammary gland undergoes unique differentiative and proliferative development during the various life cycle stages of an individual. Accordingly, it should be understood that reference to mammary cells is a reference to the epithelial cells comprising the mammary gland at any stage of its development including prepubescent, pubescent, prenatal, postnatal/lactating and post-menopausal stages. In this regard, it should also be understood that any given population of epithelial cells of interest may only

be transiently present in the mammary gland, such as those which are generated during pregnancy for the purpose of facilitating lactation.

Accordingly, in another preferred embodiment the present invention contemplates a method for detecting an aberrant mammary cell in a subject or in a biological sample from said subject, said method comprising contacting mammary cells or mammary cell extracts from said subject or said biological sample with an immunointeractive molecule specific for LM04 or antigenic portion thereof and screening for the level of immunointeractive molecule-LM04 complex formation wherein an elevated presence of said complex relative to a normal mammary cell is indicative of an aberrant mammary cell.

Reference herein to "mammary" cells or tissues should also be understood to extend to both epithelial and non-epithelial cell tissues. Such tissue includes but is not limited to, mammary epithelial cells, stromal cell, the lactiferous duct, ampulla, glandular tissue, areola and nipple. The mammary gland is often referred to by alternative terms such as the "breast" in human. The terms "mammary" and "breast" are herein utilised interchangeably. Reference to "mammary cells" should also be understood to extend to variants and mutants of said mammary cells, in the same context as hereinbefore defined with respect to epithelial cells in general.

In a related aspect, the present invention provides a method for detecting an aberrant cell in a subject or in a biological sample from said subject, said method comprising screening the level of a transcription product of a gene encoding LM04 wherein an elevated level of said expression product compared to a normal cell is indicative of an aberrant cell.

Preferably said aberrant cell is one which is characteristic of central nervous system tumors, retinoblastoma, head and neck cancers (eg. squamous cell cancers), lung cancer (both small and non-small cell lung cancer), kidney cancers (eg. renal cell adenocarcinoma), pancreatic neoplasias (eg. adenocarcinomas and islet cell tumors), colorectal cancer, cervical cancer, testicular cancer (eg. germ cell tumors), ovarian cancer (eg. ovarian epithelial cancer and ovarian germ cell tumors), lymphomas, leukemias,

malignant melanomas, neuroendocrine tumors and carcinoid tumors

In another preferred embodiment, there is provided a method for detecting an aberrant epithelial cell in a subject or in a biological sample from said subject, said method comprising screening the level of a transcription product of a gene encoding LM04 wherein an elevated level of said expression product compared to a normal epithelial cell is indicative of an aberrant epithelial cell.

In yet another preferred embodiment, there is provided a method for detecting an aberrant mammary cell in a subject or in a biological sample from said subject, said method comprising screening the level of a transcription product of a gene encoding LM04 wherein an elevated level of said expression product compared to a normal mammary cell is indicative of an aberrant mammary cell.

Reference to "biological sample" should be understood as a reference to any sample of biological material derived from an individual such, but not limited to, mucus, stool, urine, blood, serum, cell extract, biopsy specimens and fluid which has been introduced into the body of an individual and subsequently removed such as, for example, the saline solution extracted from the lung following lung lavage or the solution retrieved from an enema wash. The biological sample which is tested according to the method of the present invention may be tested directly or may require some form of treatment prior to testing. For example, a biopsy sample may require homogenisation or sectioning prior to testing. Alternatively, the sample may require treatment in order to expose nucleic acid material.

Reference to a "normal" cell includes a cell not regarded as aberrant or cancerous and may be considered an "average" of normal cell types.

The "immunointeractive molecule" is any molecule having specificity and binding affinity for LM04 or its antigenic parts or its homologues or derivatives. Although the preferred immmunointeractive molecule is an immunglobulin molecule, the present invention extends to other immunointeractive molecules such as antibody fragments, single chain

antibodies, deimmunized including humanized antibodies and T-cell associated antigen-binding molecules (TABMs). Most preferably, the immunointeractive molecule is an antibody such as a polyclonal or monoclonal antibody. It should be understood that the subject immunointeractive molecule may be limited, bound or otherwise associated to any other proteinaceous or non-proteinaceous molecule or cell. Most preferably, the antibody is a monoclonal antibody.

The immunointeractive molecule exhibits specificity for LM04 or more particularly an antigenic determinant or epitope on LM04. An antigenic determinant or epitope on LM04 includes that part of the molecule to which an immune response can be directed. The antigenic determinant or epitope may be a B-cell epitope or where appropriate a T-cell receptor binding molecule. The term "antigenic part" includes an antigenic determinant or epitope.

A "transcription product" is generally mRNA, although the present invention should also be understood to extend to cDNA which is reverse transcribed from all or part of an mRNA molecule. The amount of transcription product provides an indicator of the level of LM04 gene expression and provides, therefore, indirect evidence for the presence of LM04. Conveniently, pools of mRNA or cDNA are obtained or cell extracts comprising total mRNA obtained and genetic probes complementary to all or part of the LM04 gene-specific mRNA or cDNA. Binding of probes may then be quantitative or semi-quantitative.

Reference herein to LM04 includes reference to all forms of LM04 or their homologues or derivatives. Reference to "LM04" should be understood to include reference to any isoforms which arise from alternative splicing of LM04 mRNA or mutants or polymorphic variants of LM04. It should also be understood to include reference to any other molecule which exhibits LM04 functional activity to the extent that the subject molecule mimics one or more LM04 cellular proliferation related activities. It is conceivable, for example, that there may be naturally or non-naturally occurring LM04 mimetics (for example, toxins or drugs) which, if they were introduced into an individual, would induce unwanted cellular proliferation. Reference to "*LM04*" in italicised text should be understood as a reference to

LM04 encoding nucleic acid molecules while "LM04" in not italicised text is a reference to the LM04 protein.

Reference to a "level" of LM04 includes an amount quantitatively, semi-quantitatively or qualitatively determined.

In accordance with the present invention, it is proposed that cells associated with a neoplasm, including malignant or non-malignant neoplastic cells, and in particular epithelial cancer cells or mammary cells, produce elevated levels of LM04. The quantitative or qualitative detection of levels of LM04 or expression products of genetic material encoding LM04 provides, therefore, an indicator that a cell is aberrant and is associated with neoplasia or has a propensity to develop into a neoplasia.

Reference herein to a "subject" should be understood to encompass humans, primates, livestock animals (eg. sheep, pigs, cattle, horses, donkeys), laboratory test animals (eg. mice, rabbits, rats, guinea pigs), companion animals (eg. dogs, cats) and captive wild animals (eg. foxes, kangaroos, deer). Preferably, the mammal is a human.

Accordingly, another aspect of the present invention contemplates a method for diagnosing the presence of a neoplasm or neoplasm-like growth in a subject, said method comprising contacting cells or cell extracts from said subject or a biological sample from said subject with a LM04-binding effective amount of an antibody having specificity for said LM04 or an antigenic determinant or epitope thereon and then quantitatively or qualitatively determining the level of a LM04-antibody complex wherein the presence of elevated levels of said complex compared to a normal cell is indicative of the presence of a neoplasm.

Preferably said neoplastic cell is one which is characteristic of central nervous system tumors, retinoblastoma, head and neck cancers (eg. squamous cell cancers), lung cancer (both small and non-small cell lung cancer), kidney cancers (eg. renal cell adenocarcinoma), pancreatic neoplasias (eg. adenocarcinomas and islet cell tumors), colorectal cancer, cervical cancer, testicular cancer (eg. germ cell tumors), ovarian cancer

(eg. ovarian epithelial cancer and ovarian germ cell tumors), lymphomas, leukemias, malignant melanomas, neuroendocrine tumors and carcinoid tumors

More preferably, said neoplasm is an epithelial cell neoplasm or a mammary cell neoplasm.

Most particularly, said mammary cell neoplasm is mammary cell cancer.

In a related embodiment, the present invention provides a method for diagnosing the presence of a neoplasm in a subject, said method comprising obtaining mRNA from cells of said subject or from a biological sample from said subject and optionally generating cDNA and contacting said mRNA or cDNA with a genetic probe capable of hybridizing to and/or amplifying all or part of a nucleotide sequence encoding LM04 or its complementary nucleotide sequence and then detecting the level of said mRNA or cDNA wherein the presence of elevated levels of said mRNA or cDNA compared to normal controls is indicative of the presence of a neoplasm.

Preferably said neoplasm is central nervous system tumors, retinoblastoma, head and neck cancers (eg. squamous cell cancers), lung cancer (both small and non-small cell lung cancer), kidney cancers (eg. renal cell adenocarcinoma), pancreatic neoplasias (eg. adenocarcinomas and islet cell tumors), colorectal cancer, cervical cancer, testicular cancer (eg. germ cell tumors), ovarian cancer (eg. ovarian epithelial cancer and ovarian germ cell tumors), lymphomas, leukemias, malignant melanomas, neuroendocrine tumors and carcinoid tumors

More particularly, said neoplasm is an epithelial cell neoplasm or mammary cell neoplasm.

Most particularly, said mammary cell neoplasm is mammary cell cancer.

The use of antibodies and in particular monoclonal antibodies to detect LM04 is a preferred method of the present invention. Antibodies may be prepared by any of a number

of means. For the detection of human LM04, antibodies are generally but not necessarily derived from non-human animals such as primates, livestock animals (e.g. sheep, cows, pigs, goats, horses), laboratory test animals (e.g. mice, rats, guinea pigs, rabbits) and companion animals (e.g. dogs, cats). Generally, antibody based assays are conducted *in vitro* on cell or tissue biopsies. However, if an antibody is suitably deimmunized or, in the case of human use, humanized, then the antibody can be labelled with, for example, a nuclear tag, administered to a patient and the site of nuclear label accumulation determined by radiological techniques. The LM04 antibody is regarded, therefore, as a cancer targeting agent. Accordingly, the present invention extends to deimmunized forms of the antibodies for use in cancer imaging in human and non-human patients. This is described further below.

The present invention provides, therefore, an antibody and in particular a monoclonal antibody for use in immunological assays for LM04 or for cancer imaging *in vivo*. The antibody may be directed either to the LM04 protein or the LM04 mRNA, for example.

For the generation of antibodies to a LM04, this molecule is required to be extracted from a biological sample whether this be from animal including human tissue or from cell culture if produced by recombinant means. The LM04 can be separated from the biological sample by any suitable means. For example, the separation may take advantage of any one or more of LM04's surface charge properties, size, density, biological activity and its affinity for another entity (e.g. another protein or chemical compound to which it binds or otherwise associates). Thus, for example, separation of LM04 from the biological fluid may be achieved by any one or more of ultra-centrifugation, ion-exchange chromatography (e.g. anion exchange chromatography, cation exchange chromatography), electrophoresis (e.g. polyacrylamide gel electrophoresis, isoelectric focussing), size separation (e.g., gel filtration, ultra-filtration) and affinity-mediated separation (e.g. immunoaffinity separation including, but not limited to, magnetic bead separation such as Dynabead™ separation, immunochromatography, immuno-precipitation). Choice of the separation technique(s) employed may depend on the biological activity or physical properties of the LM04 sought or from which tissues it is obtained.

Preferably, the separation of LM04 from the biological fluid preserves conformational epitopes present on the protein and, thus, suitably avoids techniques that cause denaturation of the enzyme. Persons of skill in the art will recognize the importance of maintaining or mimicking as close as possible physiological conditions peculiar to the LM04 (e.g. the biological fluid from which it is obtained) to ensure that the antigenic determinants or active site/s on the LM04, which are exposed to the animal, are structurally identical to that of the native protein. This ensures the raising of appropriate antibodies in the immunised animal that would recognize the native protein. In a preferred embodiment, LM04 is separated from the biological fluid using any one or more of affinity separation, gel filtration and ultra-filtration.

Immunization and subsequent production of monoclonal antibodies can be carried out using standard protocols as for example described by Köhler and Milstein (1975, 1976), Coligan *et al.* (1991-1997) or Toyama *et al.* (1987). Essentially, an animal is immunized with a LM04-containing biological fluid or fraction thereof by standard methods to produce antibody-producing cells, particularly antibody-producing somatic cells (e.g. B lymphocytes). These cells can then be removed from the immunized animal for immortalization.

Where a fragment of LM04 is used to generate antibodies, it may need to first be associated with a carrier. By "carrier" is meant any substance of typically high molecular weight to which a non- or poorly immunogenic substance (e.g. a hapten) is naturally or artificially linked to enhance its immunogenicity.

Immortalization of antibody-producing cells may be carried out using methods which are well-known in the art. For example, the immortalization may be achieved by the transformation method using Epstein-Barr virus (EBV) (Kozbor *et al.*, 1986). In a preferred embodiment, antibody-producing cells are immortalized using the cell fusion method (described in (Coligan *et al.*, 1991-1997)), which is widely employed for the production of monoclonal antibodies. In this method, somatic antibody-producing cells

with the potential to produce antibodies, particularly B cells, are fused with a myeloma cell line. These somatic cells may be derived from the lymph nodes, spleens and peripheral blood of primed animals, preferably rodent animals such as mice and rats. Mice spleen cells are particularly useful. It would be possible, however, to use rat, rabbit, sheep or goat cells, or cells from other animal species instead.

Specialized myeloma cell lines have been developed from lymphocytic tumours for use in hybridoma-producing fusion procedures (Kohler and Milstein, 1976; Shulman *et al*, 1978; Volk *et al.*, 1982). These cell lines have been developed for at least three reasons. The first is to facilitate the selection of fused hybridomas from unfused and similarly indefinitely self-propagating myeloma cells. Usually, this is accomplished by using myelomas with enzyme deficiencies that render them incapable of growing in certain selective media that support the growth of hybridomas. The second reason arises from the inherent ability of lymphocytic tumour cells to produce their own antibodies. To eliminate the production of tumour cell antibodies by the hybridomas, myeloma cell lines incapable of producing endogenous light or heavy immunoglobulin chains are used. A third reason for selection of these cell lines is for their suitability and efficiency for fusion.

Many myeloma cell lines may be used for the production of fused cell hybrids, including, e.g. P3X63-Ag8, P3X63-AG8.653, P3/NS1-Ag4-1 (NS-1), Sp2/0-Ag14 and S194/5.XXO.Bu.1. The P3X63-Ag8 and NS-1 cell lines have been described by Köhler and Milstein (1976). Shulman *et al.* (1978) developed the Sp2/0-Ag14 myeloma line. The S194/5.XXO.Bu.1 line was reported by Trowbridge (1978).

Methods for generating hybrids of antibody-producing spleen or lymph node cells and myeloma cells usually involve mixing somatic cells with myeloma cells in a 10:1 proportion (although the proportion may vary from about 20:1 to about 1:1), respectively, in the presence of an agent or agents (chemical, viral or electrical) that promotes the fusion of cell membranes. Fusion methods have been described (Kohler and Milstein, 1975; 1976; Gafter *et al.*, 1977; Volk *et al.*, 1982). The fusion-promoting agents used by those investigators were Sendai virus and polyethylene glycol (PEG).

Because fusion procedures produce viable hybrids at very low frequency (e.g. when spleens are used as a source of somatic cells, only one hybrid is obtained for roughly every $1x10^5$ spleen cells), it is preferable to have a means of selecting the fused cell hybrids from the remaining unfused cells, particularly the unfused myeloma cells. A means of detecting the desired antibody-producing hybridomas among other resulting fused cell hybrids is also necessary. Generally, the selection of fused cell hybrids is accomplished by culturing the cells in media that support the growth of hybridomas but prevent the growth of the unfused myeloma cells, which normally would go on dividing indefinitely. The somatic cells used in the fusion do not maintain long-term viability in *in vitro* culture and hence do not pose a problem. In the example of the present invention, myeloma cells lacking hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT-negative) were used. Selection against these cells is made in hypoxanthine/aminopterin/thymidine (HAT) medium, a medium in which the fused cell hybrids survive due to the HPRT-positive genotype of the spleen cells. The use of myeloma cells with different genetic deficiencies (drug sensitivities, etc.) that can be selected against in media supporting the growth of genotypically competent hybrids is also possible.

Several weeks are required to selectively culture the fused cell hybrids. Early in this time period, it is necessary to identify those hybrids which produce the desired antibody, so that they may subsequently be cloned and propagated. Generally, around 10% of the hybrids obtained produce the desired antibody, although a range of from about 1 to about 30% is not uncommon. The detection of antibody-producing hybrids can be achieved by any one of several standard assay methods, including enzyme-linked immunoassay and radioimmunoassay techniques as, for example, described in Kennet *et al.* (1980) and by FACS analysis (1998).

Once the desired fused cell hybrids have been selected and cloned into individual antibody-producing cell lines, each cell line may be propagated in either of two standard ways. A suspension of the hybridoma cells can be injected into a histocompatible animal. The injected animal will then develop tumours that secrete the specific monoclonal

antibody produced by the fused cell hybrid. The body fluids of the animal, such as serum or ascites fluid, can be tapped to provide monoclonal antibodies in high concentration. Alternatively, the individual cell lines may be propagated *in vitro* in laboratory culture vessels. The culture medium containing high concentrations of a single specific monoclonal antibody can be harvested by decantation, filtration or centrifugation, and subsequently purified.

The cell lines are tested for their specificity to detect the LM04 by any suitable immunodetection means. For example, cell lines can be aliquoted into a number of wells and incubated and the supernatant from each well is analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indirect fluorescent antibody technique, or the like. The cell line(s) producing a monoclonal antibody capable of recognizing the target LM04 but which does not recognize non-target epitopes are identified and then directly cultured *in vitro* or injected into a histocompatible animal to form tumours and to produce, collect and purify the required antibodies.

These antibodies are LM04 specific. This means that the antibodies are capable of distinguishing LM04 from other molecules. More broad spectrum antibodies may be used provided that they do not cross react with molecules in a normal cell.

In a preferred embodiment, the subject antibody is 16H2 or 20F8 or derivative, homologue, analogue, chemical equivalent, mutant or mimetic thereof.

Hybridoma cell lines secreting 16H2 and 20F8 were deposited with ECACC on ***(insert date)***.

The present invention should also be understood to extend to the cell lines which express the subject immunointeractive molecule, in particular a hybridoma which expresses a monoclonal antibody. Most preferably said hybridoma is the hybridoma cell line 16H2 or 20F8 or mutant or variant thereof.

Where the monoclonal antibody is destined for use in *in vivo* cancer imaging or treatment, it will need to be deimmunized with respect to the host into which it will be introduced (e.g. a human). The deimmunization process may take any of a number of forms including the preparation of chimeric antibodies which have the same or similar specificity as the monoclonal antibodies prepared according to the present invention. Chimeric antibodies are antibodies whose light and heavy chain genes have been constructed, typically by genetic engineering, from immunoglobulin variable and constant region genes belonging to different species. Thus, in accordance with the present invention, once a hybridoma producing the desired monoclonal antibody is obtained, techniques are used to produce interspecific monoclonal antibodies wherein the binding region of one species is combined with a non-binding region of the antibody of another species (Liu *et al.*, 1987). For example, complementary determining regions (CDRs) from a non-human (e.g. murine) monoclonal antibody can be grafted onto a human antibody, thereby "humanizing" the murine antibody (European Patent Publication No. 0 239 400; Jones *et al.*, 1986; Verhoeyen *et al.*, 1988; Richmann *et al.*, 1988). In this case, the deimmunizing process is specific for humans. More particularly, the CDRs can be grafted onto a human antibody variable region with or without human constant regions. The non-human antibody providing the CDRs is typically referred to as the "donor" and the human antibody providing the framework is typically referred to as the "acceptor". Constant regions need not be present, but if they are, they must be substantially identical to human immunoglobulin constant regions, i.e. at least about 85-90%, preferably about 95% or more identical. Hence, all parts of a humanized antibody, except possibly the CDRs, are substantially identical to corresponding parts of natural human immunoglobulin sequences. Thus, a "humanized antibody" is an antibody comprising a humanized light chain and a humanized heavy chain immunoglobulin. A donor antibody is said to be "humanized", by the process of "humanization", because the resultant humanized antibody is expected to bind to the same antigen as the donor antibody that provides the CDRs. Reference herein to "humanized" includes reference to an antibody deimmunized to a particular host, in this case, a human host.

It will be understood that the deimmunized antibodies may have additional conservative

amino acid substitutions which have substantially no effect on antigen binding or other immunoglobulin functions. Exemplary conservative substitutions may be made according to Table 1.

TABLE 1

ORIGINAL RESIDUE	EXEMPLARY SUBSTITUTIONS
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Exemplary methods which may be employed to produce deimmunized antibodies according to the present invention are described, for example, in references Richmann *et al.*, 1988; European Patent Publication No. 0 239 400; Chou *et al*; Queen *et al*; Morgan *et al*.

Thus, in one embodiment, the present invention contemplates a deimmunized antibody molecule having specificity for an epitope recognized by a monoclonal antibody to LM04 wherein at least one of the CDRs of the variable domain of said deimmunized antibody is derived from the said monoclonal antibody to LM04 and the remaining immunoglobulin-derived parts of the deimmunized antibody molecule are derived from an immunoglobulin or an analogue thereof from the host for which the antibody is to be deimmunized.

This aspect of the present invention involves manipulation of the framework region of a non-human antibody.

The present invention extends to mutants, analogues and derivatives of the subject antibodies but which still retain specificity for LM04.

The terms "mutant" or "derivatives" includes one or more amino acid substitutions, additions and/or deletions.

As used herein, the term "CDR" includes CDR structural loops which covers the three light chain and the three heavy chain regions in the variable portion of an antibody framework region which bridge β strands on the binding portion of the molecule. These loops have characteristic canonical structures (Chothia *et al.*, 1987; Chothia *et al.*, 1992).

By "framework region" is meant region of an immunoglobulin light or heavy chain variable region, which is interrupted by three hypervariable regions, also called CDRs. The extent of the framework region and CDRs have been precisely defined (see, for example, Kabat *et al.*, 1983). The sequences of the framework regions of different light or heavy chains are relatively conserved within a species. As used herein, a "human framework region" is a framework region that is substantially identical (about 85% or more, usually 90-95% or more) to the framework region of a naturally occurring human immunoglobulin. The framework region of an antibody, that is the combined framework

regions of the constituent light and heavy chains, serves to position and align the CDRs. The CDRs are primarily responsible for binding to an epitope of LM04.

As used herein, the term "heavy chain variable region" means a polypeptide which is from about 110 to 125 amino acid residues in length, the amino acid sequence of which corresponds to that of a heavy chain of a monoclonal antibody of the invention, starting from the amino-terminal (N-terminal) amino acid residue of the heavy chain. Likewise, the term "light chain variable region" means a polypeptide which is from about 95 to 130 amino acid residues in length, the amino acid sequence of which corresponds to that of a light chain of a monoclonal antibody of the invention, starting from the N-terminal amino acid residue of the light chain. Full-length immunoglobulin "light chains" (about 25 Kd or 214 amino acids) are encoded by a variable region gene at the NH_2-terminus (about 110 amino acids) and a κ or λ constant region gene at the COOH-terminus. Full-length immunoglobulin "heavy chains" (about 50 Kd or 446 amino acids), are similarly encoded by a variable region gene (about 116 amino acids) and one of the other aforementioned constant region genes, e.g. γ (encoding about 330 amino acids).

The term "immunoglobulin" or "antibody" is used herein to refer to a protein consisting of one or more polypeptides substantially encoded by immunoglobulin genes. The recognized immunoglobulin genes include the κ, λ, α, γ (IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4), δ, ε and μ constant region genes, as well as the myriad immunoglobulin variable region genes. One form of immunoglobulin constitutes the basic structural unit of an antibody. This form is a tetramer and consists of two identical pairs of immunoglobulin chains, each pair having one light and one heavy chain. In each pair, the light and heavy chain variable regions are together responsible for binding to an antigen, and the constant regions are responsible for the antibody effector functions. In addition to antibodies, immunoglobulins may exist in a variety of other forms including, for example, Fv, Fab, Fab' and $(Fab')_2$.

The invention also contemplates the use and generation of fragments of monoclonal antibodies produced by the method of the present invention including, for example, Fv,

Fab, Fab' and $F(ab')_2$ fragments. Such fragments may be prepared by standard methods as for example described by Coligan *et al.* (1991-1997).

The present invention also contemplates synthetic or recombinant antigen-binding molecules with the same or similar specificity as the monoclonal antibodies of the invention. Antigen-binding molecules of this type may comprise a synthetic stabilised Fv fragment. Exemplary fragments of this type include single chain Fv fragments (sFv, frequently termed scFv) in which a peptide linker is used to bridge the N terminus or C terminus of a V_H domain with the C terminus or N-terminus, respectively, of a V_L domain. ScFv lack all constant parts of whole antibodies and are not able to activate complement. Suitable peptide linkers for joining the V_H and V_L domains are those which allow the V_H and V_L domains to fold into a single polypeptide chain having an antigen binding site with a three dimensional structure similar to that of the antigen binding site of a whole antibody from which the Fv fragment is derived. Linkers having the desired properties may be obtained by the method disclosed in U.S. Patent No 4,946,778. However, in some cases a linker is absent. ScFvs may be prepared, for example, in accordance with methods outlined in Krebber *et al.* (Krebber *et al.*, 1997). Alternatively, they may be prepared by methods described in U.S. Patent No 5,091,513, European Patent No 239,400 or the articles by Winter and Milstein (Winter and Milstein, 1991) and Plückthun *et al.* (Pluckthum *et al.*, 1996).

Alternatively, the synthetic stabilized Fv fragment comprises a disulphide stabilized Fv (dsFv) in which cysteine residues are introduced into the V_H and V_L domains such that in the fully folded Fv molecule the two residues will form a disulphide bond therebetween. Suitable methods of producing dsFv are described, for example, in (Glockshuber *et al.*, 1990; Reiter *et al.*, 1994; Reiter *et al.*, 1994; Reiter *et al.*, 1994; Webber *et al.*, 1995).

Also contemplated as synthetic or recombinant antigen-binding molecules are single variable region domains (termed dAbs) as, for example, disclosed in (Ward *et al.*, 1989; Hamers-Casterman *et al.*, 1993; Davies & Reichmann, 1994).

Alternatively, the synthetic or recombinant antigen-binding molecule may comprise a "minibody". In this regard, minibodies are small versions of whole antibodies, which encode in a single chain the essential elements of a whole antibody. Suitably, the minibody is comprised of the V_H and V_L domains of a native antibody fused to the hinge region and CH3 domain of the immunoglobulin molecule as, for example, disclosed in U.S. Patent No 5,837,821.

In an alternate embodiment, the synthetic or recombinant antigen binding molecule may comprise non-immunoglobulin derived, protein frameworks. For example, reference may be made to (Ku & Schutz, 1995) which discloses a four-helix bundle protein cytochrome b562 having two loops randomized to create CDRs, which have been selected for antigen binding.

The synthetic or recombinant antigen-binding molecule may be multivalent (i.e. having more than one antigen binding site). Such multivalent molecules may be specific for one or more antigens. Multivalent molecules of this type may be prepared by dimerization of two antibody fragments through a cysteinyl-containing peptide as, for example disclosed by (Adams *et al.*, 1993; Cumber *et al.*, 1992). Alternatively, dimerization may be facilitated by fusion of the antibody fragments to amphiphilic helices that naturally dimerize (Pluckthun, 1992) or by use of domains (such as leucine zippers *jun* and *fos*) that preferentially heterodimerize (Kostelny *et al.*, 1992).

The present invention further encompasses chemical analogues of amino acids in the subject antibodies. The use of chemical analogues of amino acids is useful *inter alia* to stabilize the molecules such as if required to be administered to a subject. The analogues of the amino acids contemplated herein include, but are not limited to, modifications of side chains, incorporation of unnatural amino acids and/or their derivatives during peptide, polypeptide or protein synthesis and the use of crosslinkers and other methods which impose conformational constraints on the proteinaceous molecule or their analogues.

Examples of side chain modifications contemplated by the present invention include modifications of amino groups such as by reductive alkylation by reaction with an aldehyde followed by reduction with $NaBH_4$; amidination with methylacetimidate; acylation with acetic anhydride; carbamoylation of amino groups with cyanate; trinitrobenzylation of amino groups with 2, 4, 6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS); acylation of amino groups with succinic anhydride and tetrahydrophthalic anhydride; and pyridoxylation of lysine with pyridoxal-5-phosphate followed by reduction with $NaBH_4$.

The guanidine group of arginine residues may be modified by the formation of heterocyclic condensation products with reagents such as 2,3-butanedione, phenylglyoxal and glyoxal.

The carboxyl group may be modified by carbodiimide activation *via* O-acylisourea formation followed by subsequent derivitisation, for example, to a corresponding amide. Sulphydryl groups may be modified by methods such as carboxymethylation with iodoacetic acid or iodoacetamide; performic acid oxidation to cysteic acid; formation of a mixed disulphides with other thiol compounds; reaction with maleimide, maleic anhydride or other substituted maleimide; formation of mercurial derivatives using 4-chloromercuribenzoate, 4-chloromercuriphenylsulphonic acid, phenylmercury chloride, 2-chloromercuri-4-nitrophenol and other mercurials; carbamoylation with cyanate at alkaline pH.

Tryptophan residues may be modified by, for example, oxidation with N-bromosuccinimide or alkylation of the indole ring with 2-hydroxy-5-nitrobenzyl bromide or sulphenyl halides. Tyrosine residues on the other hand, may be altered by nitration with tetranitromethane to form a 3-nitrotyrosine derivative.

Modification of the imidazole ring of a histidine residue may be accomplished by alkylation with iodoacetic acid derivatives or N-carbethoxylation with diethylpyrocarbonate.

Examples of incorporating unnatural amino acids and derivatives during peptide synthesis include, but are not limited to, use of norleucine, 4-amino butyric acid, 4-amino-3-hydroxy-5-phenylpentanoic acid, 6-aminohexanoic acid, t-butylglycine, norvaline, phenylglycine, ornithine, sarcosine, 4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanoic acid, 2-thienyl alanine and/or D-isomers of amino acids. A list of unnatural amino acid, contemplated herein is shown in Table 2.

TABLE 2

Non-conventional amino acid	Code	Non-conventional amino acid	Code
α-aminobutyric acid	Abu	L-N-methylalanine	Nmala
α-amino-α-methylbutyrate	Mgabu	L-N-methylarginine	Nmarg
aminocyclopropane-	Cpro	L-N-methylasparagine	Nmasn
carboxylate		L-N-methylaspartic acid	Nmasp
aminoisobutyric acid	Aib	L-N-methylcysteine	Nmcys
aminonorbornyl-	Norb	L-N-methylglutamine	Nmgln
carboxylate		L-N-methylglutamic acid	Nmglu
cyclohexylalanine	Chexa	L-Nmethylhistidine	Nmhis
cyclopentylalanine	Cpen	L-N-methylisolleucine	Nmile
D-alanine	Dal	L-N-methylleucine	Nmleu
D-arginine	Darg	L-N-methyllysine	Nmlys
D-aspartic acid	Dasp	L-N-methylmethionine	Nmmet
D-cysteine	Dcys	L-N-methylnorleucine	Nmnle
D-glutamine	Dgln	L-N-methylnorvaline	Nmnva
D-glutamic acid	Dglu	L-N-methylornithine	Nmorn
D-histidine	Dhis	L-N-methylphenylalanine	Nmphe
D-isoleucine	Dile	L-N-methylproline	Nmpro
D-leucine	Dleu	L-N-methylserine	Nmser
D-lysine	Dlys	L-N-methylthreonine	Nmthr
D-methionine	Dmet	L-N-methyltryptophan	Nmtrp
D-ornithine	Dorn	L-N-methyltyrosine	Nmtyr
D-phenylalanine	Dphe	L-N-methylvaline	Nmval
D-proline	Dpro	L-N-methylethylglycine	Nmetg
D-serine	Dser	L-N-methyl-t-butylglycine	Nmtbug
D-threonine	Dthr	L-norleucine	Nle
D-tryptophan	Dtrp	L-norvaline	Nva

D-tyrosine	Dtyr	α-methyl-aminoisobutyrate	Maib
D-valine	Dval	α-methyl-γ-aminobutyrate	Mgabu
D-α-methylalanine	Dmala	α-methylcyclohexylalanine	Mchexa
D-α-methylarginine	Dmarg	α-methylcylcopentylalanine	Mcpen
D-α-methylasparagine	Dmasn	α-methyl-α-napthylalanine	Manap
D-α-methylaspartate	Dmasp	α-methylpenicillamine	Mpen
D-α-methylcysteine	Dmcys	N-(4-aminobutyl)glycine	Nglu
D-α-methylglutamine	Dmgln	N-(2-aminoethyl)glycine	Naeg
D-α-methylhistidine	Dmhis	N-(3-aminopropyl)glycine	Norn
D-α-methylisoleucine	Dmile	N-amino-α-methylbutyrate	Nmaabu
D-α-methylleucine	Dmleu	α-napthylalanine	Anap
D-α-methyllysine	Dmlys	N-benzylglycine	Nphe
D-α-methylmethionine	Dmmet	N-(2-carbamylethyl)glycine	Ngln
D-α-methylornithine	Dmorn	N-(carbamylmethyl)glycine	Nasn
D-α-methylphenylalanine	Dmphe	N-(2-carboxyethyl)glycine	Nglu
D-α-methylproline	Dmpro	N-(carboxymethyl)glycine	Nasp
D-α-methylserine	Dmser	N-cyclobutylglycine	Ncbut
D-α-methylthreonine	Dmthr	N-cycloheptylglycine	Nchep
D-α-methyltryptophan	Dmtrp	N-cyclohexylglycine	Nchex
D-α-methyltyrosine	Dmty	N-cyclodecylglycine	Ncdec
D-α-methylvaline	Dmval	N-cylcododecylglycine	Ncdod
D-N-methylalanine	Dnmala	N-cyclooctylglycine	Ncoct
D-N-methylarginine	Dnmarg	N-cyclopropylglycine	Ncpro
D-N-methylasparagine	Dnmasn	N-cycloundecylglycine	Ncund
D-N-methylaspartate	Dnmasp	N-(2,2-diphenylethyl)glycine	Nbhm
D-N-methylcysteine	Dnmcys	N-(3,3-diphenylpropyl)glycine	Nbhe
D-N-methylglutamine	Dnmgln	N-(3-guanidinopropyl)glycine	Narg
D-N-methylglutamate	Dnmglu	N-(1-hydroxyethyl)glycine	Nthr
D-N-methylhistidine	Dnmhis	N-(hydroxyethyl))glycine	Nser
D-N-methylisoleucine	Dnmile	N-(imidazolylethyl))glycine	Nhis

D-N-methylleucine	Dnmleu	N-(3-indolylyethyl)glycine	Nhtrp
D-N-methyllysine	Dnmlys	N-methyl-γ-aminobutyrate	Nmgabu
N-methylcyclohexylalanine	Nmchexa	D-N-methylmethionine	Dnmmet
D-N-methylornithine	Dnmorn	N-methylcyclopentylalanine	Nmcpen
N-methylglycine	Nala	D-N-methylphenylalanine	Dnmphe
N-methylaminoisobutyrate	Nmaib	D-N-methylproline	Dnmpro
N-(1-methylpropyl)glycine	Nile	D-N-methylserine	Dnmser
N-(2-methylpropyl)glycine	Nleu	D-N-methylthreonine	Dnmthr
D-N-methyltryptophan	Dnmtrp	N-(1-methylethyl)glycine	Nval
D-N-methyltyrosine	Dnmtyr	N-methyla-napthylalanine	Nmanap
D-N-methylvaline	Dnmval	N-methylpenicillamine	Nmpen
γ-aminobutyric acid	Gabu	N-(*p*-hydroxyphenyl)glycine	Nhtyr
L-*t*-butylglycine	Tbug	N-(thiomethyl)glycine	Ncys
L-ethylglycine	Etg	penicillamine	Pen
L-homophenylalanine	Hphe	L-α-methylalanine	Mala
L-α-methylarginine	Marg	L-α-methylasparagine	Masn
L-α-methylaspartate	Masp	L-α-methyl-*t*-butylglycine	Mtbug
L-α-methylcysteine	Mcys	L-methylethylglycine	Metg
L-α-methylglutamine	Mgln	L-α-methylglutamate	Mglu
L-α-methylhistidine	Mhis	L-α-methylhomophenylalanine	Mhphe
L-α-methylisoleucine	Mile	N-(2-methylthioethyl)glycine	Nmet
L-α-methylleucine	Mleu	L-α-methyllysine	Mlys
L-α-methylmethionine	Mmet	L-α-methylnorleucine	Mnle
L-α-methylnorvaline	Mnva	L-α-methylornithine	Morn
L-α-methylphenylalanine	Mphe	L-α-methylproline	Mpro
L-α-methylserine	Mser	L-α-methylthreonine	Mthr
L-α-methyltryptophan	Mtrp	L-α-methyltyrosine	Mtyr
L-α-methylvaline	Mval	L-N-methylhomophenylalanine	Nmhphe
N-(N-(2,2-diphenylethyl) carbamylmethyl)glycine	Nnbhm	N-(N-(3,3-diphenylpropyl) carbamylmethyl)glycine	Nnbhe

1-carboxy-1-(2,2-diphenyl-ethylamino)cyclopropane	Nmbc

Crosslinkers can be used, for example, to stabilize 3D conformations, using homo-bifunctional crosslinkers such as the bifunctional imido esters having $(CH_2)_n$ spacer groups with n=1 to n=6, glutaraldehyde, N-hydroxysuccinimide esters and hetero-bifunctional reagents which usually contain an amino-reactive moiety such as N-hydroxysuccinimide and another group specific-reactive moiety such as maleimido or dithio moiety (SH) or carbodiimide (COOH). In addition, peptides can be conformationally constrained by, for example, incorporation of C_α and N $_\alpha$-methylamino acids, introduction of double bonds between C_α and C_β atoms of amino acids and the formation of cyclic peptides or analogues by introducing covalent bonds such as forming an amide bond between the N and C termini, between two side chains or between a side chain and the N or C terminus.

The present invention further contemplates an assay to detect LM04 including the steps of:-

(3) contacting a monoclonal antibody specific to LM04 or an antigenic determinant thereon with a biological sample suspected of containing a cell containing said LM04; and

(4) subjecting the complex formed in step (1) to a signal detection step.

The signal detection step may include ELISA or any other reporter molecule based assays. As part of this detection step, the signal may first need to be amplified.

A deimmunized monoclonal antibody of the present invention may also be useful for cancer imaging *in vivo* as well as for targeting cancer cells in order to bring the cancer cells into contact with cell growth retarding or cell killing agents, i.e. cytostatic or cytocidal agents.

With respect to cancer imaging, a reporter molecule is attached to the deimmunized monoclonal antibody and this is then introduced to a host, such as a human. By detecting the reporter molecule, cancer growths can be visualized. One particularly useful form of reporter molecule is a nuclear tag.

Accordingly, another aspect of the present invention contemplates a method for detecting neoplastic cells in a human patient, said method comprising introducing into said patient a deimmunized form of a non-human derived monoclonal antibody specific for human LM04 or an antigenic determinant thereon labelled with a reporter molecule, allowing dissemination of the labelled antibody throughout the circulatory system, or to selected parts of the circulatory system and then subjecting said patient to reporter molecule-detection means to identify the location of the antibody.

Preferably said neoplastic cell is one which is characteristic of central nervous system tumors, retinoblastoma, head and neck cancers (eg. squamous cell cancers), lung cancer (both small and non-small cell lung cancer), kidney cancers (eg. renal cell adenocarcinoma), pancreatic neoplasias (eg. adenocarcinomas and islet cell tumors), colorectal cancer, cervical cancer, testicular cancer (eg. germ cell tumors), ovarian cancer (eg. ovarian epithelial cancer and ovarian germ cell tumors), lymphomas, leukemias, malignant melanomas, neuroendocrine tumors and carcinoid tumors

Preferably, said neoplastic cells are neoplastic epithelial cells or neoplastic mammary cells. More particularly, said neoplastic mammary cells are malignant mammary cells.

Immunological based LM04 detection protocols may take a variety of forms. For example, a plurality of antibodies may be immobilized in an array each with different specificities to particular antigens or cancer cells including LM04. Cells from a biopsy are then brought into contact with the antibody array and a diagnosis may be made as to the type of cancer based on the cells which are immobilized.

Other more conventional assays may also be conducted such as by ELISA, Western blot analysis, immunoprecipitation analysis, immunofluorescence analysis, immunochemistry analysis or FACS analysis.

The present invention provides, therefore, a method of detecting, in a sample, LM04 or fragment, variant or derivative thereof comprising contacting the sample with an antibody or fragment or derivative thereof and detecting the level of a complex comprising said antibody and LM04 or fragment, variant or derivative thereof compared to normal controls wherein elevated levels of LM04 is indicative of cancer growth.

As discussed above, any suitable technique for determining formation of the complex may be used. For example, an antibody according to the invention, having a reporter molecule associated therewith, may be utilized in immunoassays. Such immunoassays include but are not limited to radioimmunoassays (RIAs), enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) and immunochromatographic techniques (ICTs), Western blotting which are well known to those of skill in the art. For example, reference may be made to "Current Protocols in Immunology", 1994 which discloses a variety of immunoassays which may be used in accordance with the present invention. Immunoassays may include competitive assays. It will be understood that the present invention encompasses qualitative and quantitative immunoassays.

Suitable immunoassay techniques are described, for example, in U.S. Patent Nos. 4,016,043, 4,424,279 and 4,018,653. These include both single-site and two-site assays of the non-competitive types, as well as the traditional competitive binding assays. These assays also include direct binding of a labelled antigen-binding molecule to a target antigen. The antigen in this case is LM04 or a fragment thereof.

Two-site assays are particularly favoured for use in the present invention. A number of variations of these assays exist, all of which are intended to be encompassed by the present invention. Briefly, in a typical forward assay, an unlabelled antigen-binding molecule such as an unlabelled antibody is immobilized on a solid substrate and the sample to be tested

brought into contact with the bound molecule. After a suitable period of incubation, for a period of time sufficient to allow formation of an antibody-antigen complex, another antigen-binding molecule, suitably a second antibody specific to the antigen, labelled with a reporter molecule capable of producing a detectable signal is then added and incubated, allowing time sufficient for the formation of another complex of antibody-antigen-labelled antibody. Any unreacted material is washed away and the presence of the antigen is determined by observation of a signal produced by the reporter molecule. The results may be either qualitative, by simple observation of the visible signal, or may be quantitated by comparing with a control sample containing known amounts of antigen. Variations on the forward assay include a simultaneous assay, in which both sample and labelled antibody are added simultaneously to the bound antibody. These techniques are well known to those skilled in the art, including minor variations as will be readily apparent.

In the typical forward assay, a first antibody having specificity for the antigen or antigenic parts thereof is either covalently or passively bound to a solid surface. The solid surface is typically glass or a polymer, the most commonly used polymers being cellulose, polyacrylamide, nylon, polystyrene, polyvinyl chloride or polypropylene. The solid supports may be in the form of tubes, beads, discs of microplates, or any other surface suitable for conducting an immunoassay. The binding processes are well known in the art and generally consist of cross-linking covalently binding or physically adsorbing, the polymer-antibody complex is washed in preparation for the test sample. An aliquot of the sample to be tested is then added to the solid phase complex and incubated for a period of time sufficient and under suitable conditions to allow binding of any antigen present to the antibody. Following the incubation period, the antigen-antibody complex is washed and dried and incubated with a second antibody specific for a portion of the antigen. The second antibody has generally a reporter molecule associated therewith that is used to indicate the binding of the second antibody to the antigen. The amount of labelled antibody that binds, as determined by the associated reporter molecule, is proportional to the amount of antigen bound to the immobilized first antibody.

An alternative method involves immobilizing the antigen in the biological sample and then exposing the immobilized antigen to specific antibody that may or may not be labelled with a reporter molecule. Depending on the amount of target and the strength of the reporter molecule signal, a bound antigen may be detectable by direct labelling with the antibody. Alternatively, a second labelled antibody, specific to the first antibody is exposed to the target-first antibody complex to form a target-first antibody-second antibody tertiary complex. The complex is detected by the signal emitted by the reporter molecule.

From the foregoing, it will be appreciated that the reporter molecule associated with the antigen-binding molecule may include the following:-

(a) direct attachment of the reporter molecule to the antibody;

(b) indirect attachment of the reporter molecule to the antibody; i.e., attachment of the reporter molecule to another assay reagent which subsequently binds to the antibody; and

(c) attachment to a subsequent reaction product of the antibody.

The reporter molecule may be selected from a group including a chromogen, a catalyst, an enzyme, a fluorochrome, a chemiluminescent molecule, a paramagnetic ion, a lanthanide ion such as Europium (Eu^{34}), a radioisotope including other nuclear tags and a direct visual label.

In the case of a direct visual label, use may be made of a colloidal metallic or non-metallic particle, a dye particle, an enzyme or a substrate, an organic polymer, a latex particle, a liposome, or other vesicle containing a signal producing substance and the like.

A large number of enzymes suitable for use as reporter molecules is disclosed in U.S. Patent Nos. U.S. 4,366,241, U.S. 4,843,000, and U.S. 4,849,338. Suitable enzymes useful in the present invention include alkaline phosphatase, horseradish peroxidase, luciferase,

β-galactosidase, glucose oxidase, lysozyme, malate dehydrogenase and the like. The enzymes may be used alone or in combination with a second enzyme that is in solution.

Suitable fluorochromes include, but are not limited to, fluorescein isothiocyanate (FITC), tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC), R-Phycoerythrin (RPE), and Texas Red. Other exemplary fluorochromes include those discussed by Dower *et al.*, International Publication No. WO 93/06121. Reference also may be made to the fluorochromes described in U.S. Patent Nos. 5,573,909 (Singer *et al*), 5,326,692 (Brinkley *et al*). Alternatively, reference may be made to the fluorochromes described in U.S. Patent Nos. 5,227,487, 5,274,113, 5,405,975, 5,433,896, 5,442,045, 5,451,663, 5,453,517, 5,459,276, 5,516,864, 5,648,270 and 5,723,218.

In the case of an enzyme immunoassay, an enzyme is conjugated to the second antibody, generally by means of glutaraldehyde or periodate. As will be readily recognized, however, a wide variety of different conjugation techniques exist which are readily available to the skilled artisan. The substrates to be used with the specific enzymes are generally chosen for the production of, upon hydrolysis by the corresponding enzyme, a detectable colour change. Examples of suitable enzymes include those described *supra*. It is also possible to employ fluorogenic substrates, which yield a fluorescent product rather than the chromogenic substrates noted above. In all cases, the enzyme-labelled antibody is added to the first antibody-antigen complex, allowed to bind, and then the excess reagent washed away. A solution containing the appropriate substrate is then added to the complex of antibody-antigen-antibody. The substrate will react with the enzyme linked to the second antibody, giving a qualitative visual signal, which may be further quantitated, usually spectrophotometrically, to give an indication of the amount of antigen which was present in the sample.

Alternately, fluorescent compounds, such as fluorescein, rhodamine and the lanthanide, europium (EU), may be chemically coupled to antibodies without altering their binding capacity. When activated by illumination with light of a particular wavelength, the fluorochrome-labelled antibody adsorbs the light energy, inducing a state to excitability in

the molecule, followed by emission of the light at a characteristic colour visually detectable with a light microscope. The fluorescent-labelled antibody is allowed to bind to the first antibody-antigen complex. After washing off the unbound reagent, the remaining tertiary complex is then exposed to light of an appropriate wavelength. The fluorescence observed indicates the presence of the antigen of interest. Immunofluorometric assays (IFMA) are well established in the art and are particularly useful for the present method. However, other reporter molecules, such as radioisotope, chemiluminescent or bioluminescent molecules may also be employed.

In another embodiment, the method for detection comprises detecting the level of expression in a cell of a polynucleotide encoding a LM04. Expression of said polynucleotide may be determined using any suitable technique. For example, a labelled polynucleotide encoding a LM04 may be utilized as a probe in a Northern blot of an RNA extract obtained from the cell. Preferably, a nucleic acid extract from the animal is utilized in concert with oligonucleotide primers corresponding to sense and antisense sequences of a polynucleotide encoding the kinase, or flanking sequences thereof, in a nucleic acid amplification reaction such as RT PCR, real time PCR or SAGE. A variety of automated solid-phase detection techniques are also appropriate. For example, a very large scale immobilized primer arrays (VLSIPS™) are used for the detection of nucleic acids as, for example, described by Fodor *et al.*, 1991 and Kazal *et al.*, 1996. The above genetic techniques are well known to persons skilled in the art.

For example, to detect LM04 encoding RNA transcripts, RNA is isolated from a cellular sample suspected of containing LM04 RNA, e.g. total RNA isolated from human breast cancer tissue. RNA can be isolated by methods known in the art, e.g. using TRIZOL™ reagent (GIBCO-BRL/Life Technologies, Gaithersburg, Md.). Oligo-dT, or random-sequence oligonucleotides, as well as seuqence-specific oligonucleotides can be employed as a primer in a reverse transcriptase reaction to prepare first-strand cDNAs from the isolated RNA. Resultant first-strand cDNAs are then amplified with sequence-specific oligonucleotides in PCR reactions to yield an amplified product.

"Polymerase chain reaction" or "PCR" refers to a procedure or technique in which amounts of a preselected fragment of nucleic acid, RNA and/or DNA, are amplified as described in U.S. Patent No. 4,683,195. Generally, sequence information from the ends of the region of interest or beyond is employed to design oligonucleotide primers. These primers will be identical or similar in sequence to opposite strands of the template to be amplified. PCR can be used to amplify specific RNA sequences and cDNA transcribed from total cellular RNA. See generally Mullis *et al.*, 1987; Erlich, 1989. Thus, amplification of specific nucleic acid sequences by PCR relies upon oligonucleotides or "primers" having conserved nucleotide sequences wherein the conserved sequences are deduced from alignments of related gene or protein sequences, e.g. a sequence comparison of mammalian LM04 genes. For example, one primer is prepared which is predicted to anneal to the antisense strand and another primer prepared which is predicted to anneal to the sense strand of a cDNA molecule which encodes LM04.

To detect the amplified product, the reaction mixture is typically subjected to agarose gel electrophoresis or other convenient separation technique and the relative presence of the LM04 specific amplified DNA detected. For example, LM04 amplified DNA may be detected using Southern hybridization with a specific oligonucleotide probe or comparing is electrophoretic mobility with DNA standards of known molecular weight. Isolation, purification and characterization of the amplified LM04 DNA may be accomplished by excising or eluting the fragment from the gel (for example, see references Lawn *et al.*, 1981; Goeddel *et al.*, 1980), cloning the amplified product into a cloning site of a suitable vector, such as the pCRII vector (Invitrogen), sequencing the cloned insert and comparing the DNA sequence to the known sequence of LM04. The relative amounts of LM04 mRNA and cDNA can then be determined.

The present invention may be used to detect any neoplasm which comprises cells which express elevated levels of LM04.

The method of the present invention is useful as a one off test or as an on-going monitor of those individuals thought to be at risk of neoplasm development or as a monitor of the

effectiveness of therapeutic or prophylactic treatment regimes directed to inhibiting or otherwise slowing neoplasm development, in particular, epithelial cell cancers and most particularly breast cancer development. In these situation, mapping the modulation of LM04 levels in any one or more classes of biological samples is a valuable indicator of the status of an individual or the effectiveness of a therapeutic or prophylactic regime which is currently in use. Accordingly, the method of the present invention should be understood to extend to monitoring for increases or decreases in marker levels in an individual relative to their normal level (as hereinbefore defined) or relative to one or more earlier marker levels determined from a biological sample of said individual.

Accordingly, another aspect of the present invention provides a method of monitoring for the onset or progression of a neoplasm in a subject, said method comprising screening for the level of LM04 or a transcription product of a gene encoding LM04 in a biological sample from said subject wherein an elevated level of said LM04 or transcription product compared to the levels of a normal cell is indicative of a neoplasm.

The present invention further contemplates the use of a monoclonal antibody to LM04 in the manufacture of a quantitative or semi-quantitative diagnostic kit to determine relative levels of LM04 in suspected neoplastic cells from a patient. The kit may come with instructions for use and may be automated or semi-automated or in a form which is compatible with automated machine or software.

The generation of antibodies to LM04 may, in accordance with the present invention, be directed to the active or inactive forms of the molecule. Antibodies directed to an active LM04 are particularly useful in detecting an increase or decrease in LM04 activity.

The identification of LM04 as a cancer-specific molecule, in particular a breast cancer specific molecule, permits the generation of targeting agents to destroy or at least retard the growth of the cancer cells. In particular, the cancer targeting agents comprising LM04 specific antibodies are fused, bound or otherwise associated with a cell growth inhibiting or killing agent. Such agents include but are not limited to cytocidal or cytostatic agents

which act at the protein or corresponding mRNA or DNA levels. For example, the cell growth or killing agent maybe a nuclear tag or may be an agent which promotes induction of antagonists of LM04 RNAi or RNA oligonucleotides.

Accordingly, one aspect of the present invention provides a method of modulating LM04 regulated cellular proliferation, said method comprising contacting said cell with an effective amount of an agent for a time and under conditions sufficient to modulate *LM04* expression or LM04 functional activity wherein inhibiting or otherwise antagonising said expression or activity down-regulates said cellular proliferation.

Reference to "LM04 regulated cellular proliferation" should be understood as a reference to proliferative activity which is either directly or indirectly induced or otherwise regulated by LM04.

Without limiting the present invention to any one theoy or mode of action, up-regulation of LM04 expression has been identified as a marker of uncontrolled breast cell proliferation, in particular epithelial breast cell proliferation. However, it should be understood that the diagnostic, therapeutic and prophylactic methodology disclosed herein should not be limited to uncontrolled breast cell proliferation but extended to any cell type, the proliferation of which is directly or indirectly regulated by LM04.

The present invention more particularly provides a method of modulating LM04-regulated mammary cell proliferation, said method comprising contacting said cell with an effective amount of an agent for a time and under conditions sufficient to modulate *LM04* expression or LM04 functional activity wherein inhibiting or otherwise antagonising said expression or activity down-regulates said cellular proliferation.

It should be understood that antagonism of LM04 expression or activity may be partial or complete. Partial modulation occurs where only some LM04 expression or activity occurring in a given cell is down-regulated. LM04 expression or functional activity is down-regulated.

Down-regulation of *LM04* expression or LM04 functional activity may be achieved by any one of a number of techniques including, but not limited to:

(i) introducing into a cell a proteinaceous or non-proteinaceous molecule which modulates the transcriptional and/or translational regulation of the LM04 gene or a gene, the expression product of which regulates LM04 expression.

(ii) introducing into a cell a proteinaceous or non-proteinaceous molecule which antagonises the interaction between LM04 and one or more of its ligands (for example, bdb1, Nb1, CL1M, CtIP or BRCA1).

Up-regulation of LM04 may also be desired in certain circumstances and may be achieved by introducing into a cell, LM04, *LM04* or derivative, chemical equivalent, homologue or mimetic thereof or a proteinaceous or non-proteinaceous molecule which agonises the interaction between LM04 and its ligands or otherwise upregulates its activity or *LM04* expression.

Reference to "agent" should be understood as a reference to any proteinaceous or non-proteinaceous molecule which achieves the above objectives and includes, for example, the molecules detailed in the points above. The subject agent may be linked, bound or otherwise associated with any proteinaceous or non-proteinaceous molecule. For example, it may be associated with a molecule which permits its targeting to a localised region, for example the breast.

Said proteinaceous molecule may be derived from natural, recombinant or synthetic sources including fusion proteins or following, for example, natural product screening. Said non-proteinaceous molecule may be derived from natural sources, such as for example natural product screening or may be chemically synthesised. The present invention contemplates chemical analogues of said LM04 capable of acting as antagonists of LM04 interactions. Antagonists may be any compound capable of blocking, inhibiting

or otherwise preventing said LM04 from interacting. Antagonists include monoclonal antibodies specific for said LM04, or parts of said LM04, and antisense nucleic acids which prevent transcription or translation of genes or mRNA in the subject cells. Modulation of expression may also be achieved utilising antigens, RNA, ribosomes, DNAzymes, RNA aptamers, antibodies or molecules suitable for use in co-suppression or to induce RNAi-mediated down-regulation of LM04 mRNA transcript.

Synthetic sources of said agent include for example chemically synthesised molecules. In other examples, phage display libraries can be screened for peptides while chemical libraries can be screened for existing small molecules. Rational drug design/structure based design can be achieved by performing crystallisation, further analysing the LM04 binding sites and fitting molecules into that site by design.

For example chemical or functional equivalents of LM04 can be designed and/or identified utilising well known methods such as combinatorial chemistry or high throughput screening of recombinant libraries or following natural product screening.

In another example, libraries containing small organic molecules may be screened, wherein organic molecules having a large number of specific parent group substitutions are used. A general synthetic scheme may follow published methods (e.g. Bunin *et al.*, 1994; DeWitt *et al.*, 1993). Briefly, at each successive synthetic step, one of a plurality of different selected substituents is added to each of a selected subset of tubes in an array, with the selection of tube subsets being such as to generate all possible permutation of the different substituents employed in producing the library. One suitable permutation strategy is outlined in US. Patent No. 5,763,263.

There is currently widespread interest in using combinational libraries of random organic molecules to search for biologically active compounds (see for example U.S. Patent No. 5,763,263). Ligands discovered by screening libraries of this type may be useful in mimicking or blocking natural ligands or interfering with the naturally occurring ligands of a biological target. In the present context, for example, they may be used as a starting

point for developing analogues which exhibit properties such as more potent pharmacological effects. LM04 or a functional part thereof may according to the present invention be used in combination libraries formed by various solid-phase or solution-phase synthetic methods (see for example U.S. Patent No. 5,763,263 and references cited therein). By use of techniques, such as that disclosed in U.S. Patent No. 5,753,187, millions of new chemical and/or biological compounds may be routinely screened in less than a few weeks. Of the large number of compounds identified, only those exhibiting appropriate biological activity are further analysed.

With respect to high throughput library screening methods, oligomeric or small-molecule library compounds capable of interacting specifically with a selected biological agent, such as a biomolecule, a macromolecule complex, or cell, are screened utilising a combinational library device which is easily chosen by the person of skill in the art from the range of well-known methods, such as those described above. In such a method, each member of the library is screened for its ability to interact specifically with the selected agent. In practising the method, a biological agent is drawn into compound-containing tubes and allowed to interact with the individual library compound in each tube. The interaction is designed to produce a detectable signal that can be used to monitor the presence of the desired interaction. Preferably, the biological agent is present in an aqueous solution and further conditions are adapted depending on the desired interaction. Detection may be performed for example by any well-known functional or non-functional based method for the detection of substances.

In addition to screening for molecules which mimic the activity of LM04, it may also be desirable to identify and utilise molecules which function agonistically or antagonistically in order to up or down-regulate the functional activity of the LM04. The use of such molecules is described in more detail below. To the extent that the subject molecule is proteinaceous, it may be derived, for example, from natural or recombinant sources including fusion proteins or following, for example, the screening methods described above. The non-proteinaceous molecule may be, for example, a chemical or synthetic molecule which has also been identified or generated in accordance with the methodology

identified above. Accordingly, the present invention contemplates the use of chemical analogues capable of acting as agonists or antagonists. Chemical agonists may not necessarily be derived from LM04 but may share certain conformational similarities. Alternatively, chemical agonists may be specifically designed to mimic certain physiochemical properties of LM04.

Screening for the modulatory agents hereinbefore defined can be achieved by any one of several suitable methods including, but in no way limited to, contacting a cell comprising LM04 with an agent and screening for the modulation of LM04-related functional activity or modulation of the activity or expression of a downstream LM04 cellular target. Detecting such modulation can be achieved utilising techniques such as Western blotting, electrophoretic mobility shift assays and/or the readout of reporters of sphingosine kinase or TRAF activity such as luciferases, CAT and the like.

It should be understood that the LM04 protein may be naturally occurring in the cell which is the subject of testing or the gene encoding it may have been transfected into a host cell for the purpose of testing. Further, the naturally occurring or transfected gene may be constitutively expressed - thereby providing a model useful for, *inter alia*, screening for agents which down-regulate LM04 expression or activity or the gene may require activation - thereby providing a model useful for, *inter alia*, screening for agents which modulate LM04 expression or activity under certain stimulatory conditions. Further, to the extent that a LM04 nucleic acid molecule is transfected into a cell, that molecule may comprise the entire LM04 gene or it may merely comprise a portion of the gene such as the LM04 binding portion.

In another example, the subject of detection could be a downstream LM04 regulatory target, rather than LM04 itself, such as CtIP or BRCA1. Yet another example includes LM04 binding sites ligated to a minimal reporter. This is an example of a system where modulation of the molecules which LM04 regulates the activity of, are monitored. Where the cell which is the subject of the screening system is a neoplastic cell, for example,

modulation of LM04 expression or activity could be detected by screening for the modulation of cellular proliferation.

Accordingly, another aspect of the present invention provides a method for detecting an agent capable of modulating *LM04* expression or LM04 functional activity said method comprising contacting a cell or extract thereof containing said *LM04* or LM04 with a putative agent and detecting an altered expression phenotype associated with said interaction.

Reference to detecting an "altered expression phenotype associated with said interaction" should be understood as the detection of cellular changes associated with modulation of *LM04* expression or LM04 activity. These may be detectable, for example, as intracellular changes or changes observable extracellularly. For example, this includes, but is not limited to, detecting changes in downstream product levels or activities.

In a related aspect, the present invention should be understood to extend to the agents identified utilising any of the methods hereinbefore defined. In this regard, reference to an agent should be understood as a reference to any proteinaceous or non-proteinaceous molecule which modulates at least one LM04-related functional activity.

Said proteinaceous or non-proteinaceous molecule may act either directly or indirectly to modulate *LM04* expression or LM04 activity. Said molecule acts directly if it associates with LM04 molecules Said molecule acts indirectly if it associates with a molecule other than LM04, which other molecule either directly or indirectly modulates the expression or activity of LM04. Accordingly, the method of the present invention encompasses regulation of LM04 expression or activity via the induction of a cascade of regulatory steps.

Although the preferred method is to down-regulate *LM04* expression or LM04 functional activity, it should be understood that there may be situations in which it is desirable to up-regulate proliferation, in a controlled manner for example, by up-regulating *LM04*

expression or LM04 functional activity. Accordingly, the method of the present invention should be understood to extend to such applications.

It should be understood that the cell which is treated according to the method of the present invention may be located *ex vivo* or *in vivo*. By "*ex vivo*" is meant that the cell has been removed from the body of a subject wherein the modulation of its proliferation will be initiated *in vitro*. For example, the cell may be a non-neoplastic cell which is to undergo long term culture and is therefore stimulated to undergo ongoing LM04 induced proliferation, which proliferation is up-regulated by agonists of LM04 activity. In accordance with the preferred aspects of the present invention, the cell may be a neoplastic cell, such as a malignant cell, located *in vivo* (such as in the breast) and the down-regulation of its growth will be achieved by applying the method of the present invention *in vivo* to down-regulate the level of LM04.

A further aspect of the present invention relates to the use of the invention in relation to the treatment and/or prophylaxis of disease conditions. Without limiting the present invention to any one theory or mode of action, LM04 has been shown to regulate mammary cell proliferation. Accordingly, the method of the present invention provides a valuable tool for modulating aberrant or otherwise unwanted LM04-regulated proliferative activity.

Accordingly, another aspect of the present invention is directed to the method for the treatment and/or prophylaxis of a conditions characterised by aberrant, unwanted or otherwise inappropriate LM04-regulated proliferative activity in a mammal, said method comprising administering to said mammal an effective amount of an agent for a time and under conditions sufficient to modulate *LM04* expression or LM04 functional activity wherein inhibiting or otherwise antagonising said expression or activity down-regulates said cellular proliferation.

Reference to "aberrant, unwanted or otherwise inappropriate" cellular proliferation should be understood as a reference to overactive cellular proliferation, to physiologically normal cellular proliferation which is inappropriate in that it is unwanted or to insufficient cellular

proliferation. For example, LM04 expression in mammary cells is thought to lead to deregulation of differentiation and subsequently to uncontrolled breast cell proliferation.

Accordingly, in one preferred embodiment there is provided a method for the treatment and/or prophylaxis of a neoplastic condition said method comprising administering to said mammal an effective amount of an agent for a time and under conditions sufficient to down-regulate *LM04* expression or LM04 functional activity wherein inhibiting or otherwise antagonising said expression or activity down-regulates cellular proliferation.

Preferably, said neoplastic condition is breast cancer.

The term "mammal" as used herein includes humans, primates, livestock animals (eg. sheep, pigs, cattle, horses, donkeys), laboratory test animals (eg. mice, rabbits, rats, guinea pigs), companion animals (eg. dogs, cats) and captive wild animals (eg. foxes, kangaroos, deer). Preferably, the mammal is human or a laboratory test animal Even more preferably, the mammal is a human.

An "effective amount" means an amount necessary at least partly to attain the desired response, or to delay the onset or inhibit progression or halt altogether, the onset or progression of a particular condition being treated. The amount varies depending upon the health and physical condition of the individual to be treated, the taxonomic group of individual to be treated, the degree of protection desired, the formulation of the composition, the assessment of the medical situation, and other relevant factors. It is expected that the amount will fall in a relatively broad range that can be determined through routine trials.

Reference herein to "treatment" and "prophylaxis" is to be considered in its broadest context. The term "treatment" does not necessarily imply that a subject is treated until total recovery. Similarly, "prophylaxis" does not necessarily mean that the subject will not eventually contract a disease condition. Accordingly, treatment and prophylaxis include amelioration of the symptoms of a particular condition or preventing or otherwise reducing

the risk of developing a particular condition. The term "prophylaxis" may be considered as reducing the severity or onset of a particular condition. "Treatment" may also reduce the severity of an existing condition.

The present invention further contemplates a combination of therapies, such as the administration of the agent together with subjection of the mammal to circulating cytotoxic agents or to radiotherapy in the treatment of cancer.

Administration of the modulatory agent, in the form of a pharmaceutical composition, may be performed by any convenient means. The modulatory agent of the pharmaceutical composition is contemplated to exhibit therapeutic activity when administered in an amount which depends on the particular case. The variation depends, for example, on the human or animal and the modulatory agent chosen. A broad range of doses may be applicable. Considering a patient, for example, from about 0.1 mg to about 1 mg of modulatory agent may be administered per kilogram of body weight per day. Dosage regimes may be adjusted to provide the optimum therapeutic response. For example, several divided doses may be administered daily, weekly, monthly or other suitable time intervals or the dose may be proportionally reduced as indicated by the exigencies of the situation.

The modulatory agent may be administered in a convenient manner such as by the oral, intravenous (where water soluble), intraperitoneal, intramuscular, subcutaneous, intradermal or suppository routes or implanting (e.g. using slow release molecules). The modulatory agent may be administered in the form of pharmaceutically acceptable nontoxic salts, such as acid addition salts or metal complexes, e.g. with zinc, iron or the like (which are considered as salts for purposes of this application). Illustrative of such acid addition salts are hydrochloride, hydrobromide, sulphate, phosphate, maleate, acetate, citrate, benzoate, succinate, malate, ascorbate, tartrate and the like. If the active ingredient is to be administered in tablet form, the tablet may contain a binder such as tragacanth, corn starch or gelatin; a disintegrating agent, such as alginic acid; and a lubricant, such as magnesium stearate.

Routes of administration include, but are not limited to, respiratorally, intratracheally, nasopharyngeally, intravenously, intraperitoneally, subcutaneously, intracranially, intradermally, intramuscularly, intraocularly, intrathecally, intracereberally, intranasally, infusion, orally, rectally, *via* IV drip patch and implant.

In accordance with these methods, the agent defined in accordance with the present invention may be coadministered with one or more other compounds or molecules. By "coadministered" is meant simultaneous administration in the same formulation or in two different formulations via the same or different routes or sequential administration by the same or different routes. For example, the subject agent may be administered together with an agonistic agent in order to enhance its effects. By "sequential" administration is meant a time difference of from seconds, minutes, hours or days between the administration of the two types of molecules. These molecules may be administered in any order.

Another aspect of the present invention contemplates the use of an agent, as hereinbefore defined, in the manufacture of medicament for the treatment of a condition in a mammal, which condition is characterised by aberrant, unwanted or otherwise inappropriate LM04-regulated cellular proliferation, wherein said agent modulates *LM04* expression or LM04 activity and wherein inhibiting or otherwise antagonising said expression or activity down-regulates said cellular proliferation.

In yet another further aspect, the present invention contemplates a pharmaceutical composition comprising the modulatory agent as hereinbefore defined together with one or more pharmaceutically acceptable carriers and/or diluents. Said agents are referred to as the active ingredients.

The pharmaceutical forms suitable for injectable use include sterile aqueous solutions (where water soluble) or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersion or may be in the form of a cream or

other form suitable for topical application. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and vegetable oils. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of superfactants. The preventions of the action of microorganisms can be brought about by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the active compounds in the required amount in the appropriate solvent with various of the other ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilisation. Generally, dispersions are prepared by incorporating the various sterilised active ingredient into a sterile vehicle which contains the basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum drying and the freeze-drying technique which yield a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from previously sterile-filtered solution thereof.

When the active ingredients are suitably protected they may be orally administered, for example, with an inert diluent or with an assimilable edible carrier, or it may be enclosed in hard or soft shell gelatin capsule, or it may be compressed into tablets, or it may be incorporated directly with the food of the diet. For oral therapeutic administration, the active compound may be incorporated with excipients and used in the form of ingestible tablets, buccal tablets, troches, capsules, elixirs, suspensions, syrups, wafers, and the like.

Such compositions and preparations should contain at least 1% by weight of active compound. The percentage of the compositions and preparations may, of course, be varied and may conveniently be between about 5 to about 80% of the weight of the unit. The amount of active compound in such therapeutically useful compositions in such that a suitable dosage will be obtained. Preferred compositions or preparations according to the present invention are prepared so that an oral dosage unit form contains between about 0.1 μg and 2000 mg of active compound.

The tablets, troches, pills, capsules and the like may also contain the components as listed hereafter: a binder such as gum, acacia, corn starch or gelatin; excipients such as dicalcium phosphate; a disintegrating agent such as corn starch, potato starch, alginic acid and the like; a lubricant such as magnesium stearate; and a sweetening agent such as sucrose, lactose or saccharin may be added or a flavouring agent such as peppermint, oil of wintergreen, or cherry flavouring. When the dosage unit form is a capsule, it may contain, in addition to materials of the above type, a liquid carrier. Various other materials may be present as coatings or to otherwise modify the physical form of the dosage unit. For instance, tablets, pills, or capsules may be coated with shellac, sugar or both. A syrup or elixir may contain the active compound, sucrose as a sweetening agent, methyl and propylparabens as preservatives, a dye and flavouring such as cherry or orange flavour. Of course, any material used in preparing any dosage unit form should be pharmaceutically pure and substantially non-toxic in the amounts employed. In addition, the active compound(s) may be incorporated into sustained-release preparations and formulations.

The pharmaceutical composition may also comprise genetic molecules such as a vector capable of transfecting target cells where the vector carries a nucleic acid molecule encoding a modulatory agent. The vector may, for example, be a viral vector.

Yet another aspect of the present invention relates to the agent as hereinbefore defined, when used in the method of the present invention.

The present invention is further defined by the following non-limiting examples:

EXAMPLE 1
THE LIM DOMAIN PROTEIN LM04 INHIBITS DIFFERENTIATION OF MAMMARY EPITHELIAL CELLS *IN VITRO* AND IS OVEREXPRESSED IN BREAST CANCER
MATERIALS AND METHODS

Cell Lines

Most of the cell lines have been cited in previous studies (Douglas, A. M., Grant, S. L., Goss, G. A., Clouston, D. R., Sutherland, R. L. & Begley, C. G. (1998) *Int J Cancer* **75**, 64-73). SCp2 mammary epithelial cells (Desprez, P.-Y., Roskelley, C., Campisi, J. & Bissell, M. J. (1993) *Mol. Cell. Diff.* **1**, 99-110) were kindly provided by Dr M. Bissell.

***In situ* Hybridisation**

Mouse *Lmo4* was isolated from mouse T cells by affinity chromatography using rabbit anti-Ldb1 antisera (19). The purification and cloning of *Lmo4* will be described elsewhere (K. H.). Full-length human *LMO4* (from ATCC, Acc. No. T09407) or mouse *Lmo4* cDNAs were cloned into Bluescript SKII (Stratagene). Antisense and sense riboprobes were generated using T3 or T7 RNA polymerase (Promega) with digoxigenin-UTP (Roche). Standard *in situ* hybridisations were performed as described (Wilkinson, D. (1992) *In Situ Hybridisation* (IRL, New York)). Breast cancer tissue arrays were either purchased from Clinomics or prepared from breast cancer samples at the Peter MacCallum Cancer Institute (PMCI), Melbourne, Australia. All specimens evaluated were anonymous, archival tissue specimens. The Peter MacCallum Institutional Review Board approved the use of PMCI specimens for tissue array analysis.

SCp2 Cell Differentiation Assay

SCp2 mammary epithelial cells (Desprez, P.-Y., Roskelley, C., Campisi, J. & Bissell, M. J. (1993) *Mol. Cell. Diff. 1*:99-110) were passaged in DMEM-F12 media containing DMEM-HAM, 10% FCS, and insulin 5 μg/ml (Sigma). Full-length mouse cDNAs corresponding to *Lmo4* or *Ldb1* were cloned into both the pEF1α-puro and pEF1α-Flag-puro mammalian expression vectors (Huang, D. C., Cory, S. & Strasser, A. (1997) *Oncogene* **14,** 405-14). Protein expression was confirmed by transient transfection of 293T cells. Linearized expression vectors (10 μg) were introduced into SCp2 cells using Superfect (Qiagen) and selected in puromycin for 8 – 10 days. Pools of stable transfectants expressing the appropriate gene or vector alone (control) were then used in the differentiation assay, essentially as described (Desprez, P.-Y., Roskelley, C., Campisi, J. & Bissell, M. J. (1993) *Mol. Cell. Diff. 1*:99-110). Transfectants were induced to differentiate by the addition of DMEM-F12 containing insulin (5 μg/ml), hydrocortisone (1 μg/ml) and prolactin (5 μg/ml), which was generously provided by Dr A. Parlow (National Hormone and Pituitary Program). After 96 hours, cells were harvested directly for RNA extraction.

RNA Analysis and RT-PCR

Northern analysis of poly(A)$^+$ RNA was performed as described (Visvader, J., Begley, C. G. & Adams, J. M. (1991) *Oncogene* **6,** 187-94). Total RNA was isolated from SCp2 cells on ECM using RNAzol (Tel-Test); cDNA synthesis and PCR were performed as described (Weiss, M. J., Keller, G. & Orkin, S. H. (1994) *Genes Dev* **8,** 1184-97), using primers for β-casein, Wap and Hprt (Weiss, M. J., Keller, G. & Orkin, S. H. (1994) *Genes Dev* **8,** 1184-97). Sequences of the β-casein primers were: forward 5'-ATGAAGGTCTTCATCCTCGCCTGCC-3' (SEQ ID NO:1) and reverse 5'-GCTGGACCAGAGACTGAGGAAGGTGC-3' (SEQ ID NO:2). Sequences of the Wap primers were: forward 5'-TAGCAGCAGATTGAAAGCATTATG-3' (SEQ ID NO:3) and reverse 5'-GACACCGGTACCATGCGTTG-3' (SEQ ID NO:4). Samples were fractionated on agarose gels, ethidium bromide stained, blotted, then hybridised with specific internal oligonucleotides.

Immunoprecipitation and Western Analysis

Whole cell lysates were generated from stably transfected SCp2 pools by lysing cells in KALB lysis buffer (Nicholson, S. E., Willson, T. A., Farley, A., Starr, R., Zhang, J. G., Baca, M., Alexander, W. S., Metcalf, D., Hilton, D. J. & Nicola, N. A. (1999) *EMBO J* **18,** 375-85) containing protease inhibitors. Proteins were immunoprecipitated with anti-Flag M2 (Sigma) and protein G Sepharose (Pharmacia), and separated by SDS-PAGE (Novex). After transfer, filters were blocked and incubated with rabbit antisera to either full-length mouse Lmo4 or a C-terminal Ldb1 polypeptide (19). Antibody binding was visualised with peroxidase-conjugated anti-mouse antibody by ECL (Amersham).

Immunohistochemistry

For immunostaining, tissue arrays (Clinomics) were incubated with supernatant containing rat anti-LMO4 monoclonal antibody, followed by incubation with biotinylated anti-rat IgG and HRP-Streptavidin (Dako), before detection using DAB (Dako), as described (Armes, J. E., Trute, L., White, D., Southey, M. C., Hammet, F., Tesoriero, A., Hutchins, A. M., Dite, G. S., McCredie, M. R., Giles, G. G., Hopper, J. L. & Venter, D. J. (1999) *Cancer Res* **59,** 2011-7). Generation of the LMO4 monoclonal antibody will be described elsewhere. Other primary monoclonal antibodies used were: anti-ERα (1D5), anti-PgR (636) and anti-ErbB2 (all from Dako).

EXAMPLE 2
LM04 IS DEVELOPMENTALLY REGULATED
IN THE MOUSE MAMMARY GLAND

In situ hybridisation analysis revealed that *Lmo4* was prominently expressed in the lobuloalveolar units of the mammary gland during pregnancy (Fig. 1*A*). At this stage, there is a high rate of proliferation accompanying the formation and expansion of the lobuloalveoli. Lower levels of *Lmo4* mRNA were present in the ductal epithelium of the virgin mammary gland, evident as a single layer, and in the early lactating and involuting mammary glands. Staining of the surrounding stroma was also apparent in the virgin

mammary gland. The high level of *Lmo4* in the pregnant mammary gland (Fig. 1*A*) was confirmed by Northern analysis, which revealed that levels of the two major transcripts (approximately 1.8 and 2.3 kb) peaked at mid-pregnancy (day 12) and remained high until late pregnancy (Fig. 1*B*). Interestingly, although *Lmo4* expression decreased during lactation, it appeared to be upregulated during involution.

EXAMPLE 3

FORCED EXPRESSION OF THE LM04 AND LDB1 GENES INHIBITS β-CASEIN SYNTHESIS IN MAMMARY EPITHELIAL CELLS

Lmo4 binds with high affinity to Ldb1, a nuclear protein that serves as an adaptor for several LIM domain-containing proteins. To examine the role of Lmo4 and its partner protein Ldb1 in mammary differentiation, we introduced the genes into SCp2 mammary epithelial cells, which express moderate levels of *Lmo4* and *Ldb1* RNA (Fig. 3). The SCp2 cell line was originally isolated from the mammary gland of a mid-gestation mouse and mimics the essential features of mammary differentiation in the presence of extracellular matrix (ECM) and a lactogenic stimulus (Desprez, P.-Y., Roskelley, C., Campisi, J. & Bissell, M. J. (1993) *Mol. Cell. Diff.* 1, 99-110). Differentiation of SCp2 cells is accompanied by the production of milk proteins, such as β-casein and whey acidic protein (Wap), which we have used here as molecular markers. Stable transfectants of SCp2 cells harboring *Lmo4* or *Ldb1* cDNAs (either epitope-tagged or untagged) together with a puromycin resistance marker, were generated and pools of cells assayed for their ability to undergo differentiation. For the latter assay, transfectants were plated on ECM in the presence or absence of a lactogenic stimulus (prolactin, insulin and hydrocortisone).

Overexpression of *Lmo4* or *Ldb1* markedly inhibited mRNA expression of *β-casein* and *Wap* upon treatment with a lactogenic stimulus. In contrast, transfectants expressing empty vector were indistinguishable from parental cells (Fig. 2*A* and *B*). Expression of the Flag-tagged Lmo4 and Ldb1 proteins was readily detectable in several SCp2 transfectants, examples of which are shown in Fig. 2*C*, while expression of the untagged transgenes was verified by Northern analysis (data not shown). Forced expression of antisense *Lmo4* RNA

in SCp2 and HC11 mammary epithelial cells consistently augmented *β-casein* synthesis by several-fold, although Lmo4 protein levels were only slightly reduced by western analysis (data not shown). Taken together, the data indicate that Lmo4 and its partner protein Ldb1 play a role in maintaining proliferation rather than differentiation of mammary epithelial cells.

EXAMPLE 4

OVEREXPRESSION OF LM04 IN BREAST CANCER CELL LINES AND PRIMARY INVASIVE CANCERS

LMO4 RNA levels vary markedly between different human breast epithelial cancer cell lines (Fig. 3). High levels of *LMO4* mRNA were detected in five out of ten breast cancer cell lines. Interestingly, transcript levels were low in the immortalised cell line 184 but were substantially higher in a transformed variant of this line, 184B5 (Douglas, A. M., Grant, S. L., Goss, G. A., Clouston, D. R., Sutherland, R. L. & Begley, C. G. (1998) *Int J Cancer* 75, 64-73). *LDB1* was expressed as two major transcripts (2.3 and 3.5 kb) amongst the panel of breast cancer cell lines and showed less variation in the extent of expression. The size of the *Lmo4* and *Ldb1* transcripts in SCp2 (Fig. 3), HC11 and EpH4 (not shown) mouse mammary epithelial cells was lower than that of the corresponding human RNAs, and reflects a species difference.

To assess whether *LMO4* was upregulated in primary breast cancers, we performed *in situ* hybridisation on tissue arrays comprising 177 invasive breast cancers. Tumor specimens were scored as low/negative, moderate or high for expression of *LMO4* based on their intensity of hybridisation to the human *LMO4* riboprobe. Two examples within each intensity group are given in Fig. 4 at low magnification. The control sense probe gave a negligible signal (Fig. 4*D*, *H*). Strong to moderate staining of *LMO4* RNA was evident in 99 of 177 (56%) cancers, most of which corresponded to infiltrating ductal carcinomas but also included invasive lobular and mixed ductal and lobular carcinomas. Figure 5 depicts prominent expression of *LMO4* in an invasive lobular carcinoma (Fig. 5*A*) and two infiltrating ductal carcinomas (Fig. 5*B*, *C*). Low levels were detected in 7 out of 20 (35%)

benign breast fibroadenomas (Fig. 5*D*) or normal breast tissue samples. *LMO4* RNA levels appeared to be elevated in ductal carcinoma *in situ* (DCIS) (Fig. 5*L*), in which 7 of 18 (38%) pre-invasive tumors showed strong to moderate staining. A subset comprising 60 tumors was also analysed by immunohistochemistry using a rat anti-LMO4 monoclonal antibody. Overexpression of LMO4 protein was observed in 62% of tumors. A comparison of *in situ* RNA and immunohistochemical staining for three tumors is shown in Figure 5 (*A* and *E*, *B* and *F*, *C* and *G*, respectively), revealing overexpression of LMO4 at both the RNA and protein levels. Benign breast tissue displayed either low (Fig. 5*H*) or undetectable levels of LMO4 protein. Anti-immunoglobulin antibody controls gave negligible staining for all tumor samples (Fig. 5*I*, *J* and *K*). In this subset of 60 tumors, 35 (58%) scored high for RNA expression. Of these, 25 tumors (71%) also expressed high levels of LMO4 protein while 10 tumors displayed lower levels of protein. Conversely, 11 (17%) of 60 tumors that gave weak staining for *LMO4* RNA, scored high for protein expression. In summary, there was a strong correlation between RNA and protein overexpression in 71% of cases. The discordance observed for a minority of tumors is likely to reflect the numerous mechanisms that regulate the stability and turnover of RNA and protein, as well as the integrity of the primary cancer tissues collected by biopsy. For example, deregulation of a Cyclin D1 protein degradation pathway has been reported in breast cancer, such that Cyclin D1 proteins levels are high despite low RNA expression (Russell, A., Thompson, M. A., Hendley, J., Trute, L., Armes, J. & Germain, D. (1999) *Oncogene* **18,** 1983-91).

Subcellular localisation of LMO4 was found to be variable. In some tumors, prominent nuclear staining was detected (Fig. 5*E* and *G*) whereas in other tumors, nuclear plus cytoplasmic staining was visualised (Fig. 5*F*). These findings are consistent with subcellular localisation studies of LMO4 in transfected cells (Kenny, D. A., Jurata, L. W., Saga, Y. & Gill, G. N. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95,** 11257-62,Sugihara, T. M., Bach, I., Kioussi, C., Rosenfeld, M. G. & Andersen, B. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95,** 15418-23). The same tumor set of 60 samples was evaluated for expression of the Estrogen (ERα), Progesterone and ErbB2 receptors by immunohistochemistry, in which

32%, 40% and 30% were positive for the respective receptors. No correlation was found between overexpression of LMO4 and expression of these markers.

EXAMPLE 5

THE LIM DOMAIN PROTEIN LM04 INTERACTS WITH THE COREPRESSOR CtIP AND THE TUMOR SUPPRESSOR BRCA1 AND INHIBITS BRCA1 ACTIVITY

MATERIALS AND METHODS

Plasmids

The pGBT9-LMO4 bait plasmid was generated by PCR amplification of mouse LMO4 in pSP72 using the following primers: forward 5'-CGCGGATCCCCGGCTCCCTCTCCTGGAAGCGCTGC-3' (SEQ ID NO:5) and reverse 5'-CGC GGATCCTCAGCAGACCTTCTGGTCTGCCAG-3' (SEQ ID NO:6); the resultant product was inserted into the BamHI site of pGBT9 (Clontech). The first LIM domain (residues 1 - 82) of LMO4 was PCR amplified using the forward primer 5'-CGCGGATCCTGAATCCGGGCAGCAGCTCGC-3' (SEQ ID NO:7) and the reverse primer 5'-CGCGGATCCTCACCCAAATAACCTAATGTAGTCATT-3' (SEQ ID NO:8), then cloned into the BamH1 site of the Flag-pEF1α-puro vector (Huang, D. C., Cory, S., and Strasser, A. (1997) *Oncogene* **14**(4), 405-14). The second LIM domain (residues 79 - 165) of LMO4 was PCR amplified using the forward primer 5'-CGCGGATCCGGTTATTTGGGAATAGCGGTGCTTG-3' (SEQ ID NO:9)and the reverse primer 5'-CGCGGATCCTCAGCAGACCTTCTGGTCTGCCAG -3' (SEQ ID NO:10), and subsequently cloned into the BamH1 site of the Flag-pEF1α-puro vector. Expression vectors encoding Lhx1 or Lhx3 (pSV-sport-Flag) and LMK1 were kindly provided by A. Agulnick and O. Bernard, respectively. Full-length cDNAs corresponding to the coding region of mouse or human LMO4 were cloned into the Flag-pEF1α-puro expression vector, and a 0.7 kb mouse LMO4 cDNA fragment was cloned into pEF1α-puro vector. The expression plasmids encoding residues 45 - 897 of human CtIP (pCMV-HA-ns311), human BRCA1 (pcDNA3-HA-BRCA1) and mouse LMO2 (pEF1α-Flag-

LMO2) have previously been described (Visvader, J. E., Mao, X., Fujiwara, Y., Hahm, K., and Orkin, S. H. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25), 13707-12; 19;Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T., and Livingston, D. M. (1997) *Cell* **88**(2), 265-75). HA-tagged CtIP deletion mutants were generated either by PCR amplification or subcloning from plasmids (Yu, X., Wu, L. C., Bowcock, A. M., Aronheim, A., and Baer, R. (1998) *J Biol Chem* **273**(39), 25388-92), into the expression vectors HA-pcDNA3.1 or HA-EF1α-puro. The SZ fragment of BRCA1 (residues 1528 - 1863) was recloned from pCMV-Gal4b-BR-SZ (Yu, X., Wu, L. C., Bowcock, A. M., Aronheim, A., and Baer, R. (1998) *J Biol Chem* **273**(39), 25388-92) into HA-pcDNA3.1. Myc-tagged derivatives of wild-type and mutant BRCA1 were cloned into pcDNA3.0 (J. C., unpub.).

The yeast expression construct encoding the activation domain (AD) of BRCA1 fused to the Gal4 DNA-binding domain (DBD) was generated by PCR amplification of the region spanning amino acids 1293 - 1863 of BRCA1 and subsequent cloning into pGBT9 (Clontech). The mammalian Gal4DBD-AD fusion construct was generated by cloning a cDNA fragment encoding the BRCA1-AD region into pCMV-Gal4b (Yu, X., Wu, L. C., Bowcock, A. M., Aronheim, A., and Baer, R. (1998) *J Biol Chem* **273**(39), 25388-92). Full-length cDNA encoding mouse LMO4 was inserted into the yeast expression plasmid pYX212 (Ingenious). The reporter plasmid, pG5CAT, was from Clontech. Details of plasmid constructions are available on request.

Yeast two-hybrid screen

The pGBT9-LMO4 bait plasmid (residues 15 - 165) was used to screen 8.4 x 10^6 transformants from a primary breast adenocarcinoma cDNA library (Byrne, J. A., Nourse, C. R., Basset, P., and Gunning, P. (1998) *Oncogene* **16**(7), 873-81), following standard protocols (Clontech Matchmaker Two-Hybrid System).

Antibody production

Full-length mouse LMO4 cDNA was amplified by PCR and subcloned into pGEX-2T (Amersham Pharmacia Biotech.). The GST-LMO4 fusion protein was expressed in the bacterial strain UT5600, purified according to standard protocols (Smith, D. B., and Johnson, K. S. (1988) *Gene* **67**(1), 31-40) and used to inject rabbits to produce polyclonal antisera. The generation of rat LMO4-specific monoclonal antibodies will be described elsewhere.

Immunoprecipitation and western blot analysis

Human embryonal kidney 293T cells (10 cm plates) were transiently transfected with 4 μg of each expression construct and/or empty vector using the calcium phosphate precipitation method. Cell extracts (0.5 ml) were prepared in whole cell lysis buffer (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris pH7.5, 1% Nonidet P-40, 1 mM DTT) containing protease inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μg/ml leupeptin, 1 μg/ml pepstatin, 1 μg/ml aprotinin) and normalised for protein concentration, as determined by Bradford analysis (BioRad). Proteins were immunoprecipitated with either anti-Flag M2 (Sigma) or anti-myc 9E10 and protein G sepharose (Amersham Pharmacia Biotech.), and separated by SDS-PAGE (Novex). After transfer to PVDF membranes (Millipore), filters were blocked and incubated with rabbit antisera against CtIP or Ldb1 (Visvader, J. E., Mao, X., Fujiwara, Y., Hahm, K., and Orkin, S. H. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25), 13707-12) or mouse anti-BRCA1 monoclonal antibody MS110 (Oncogene Research Products). Filters were then incubated with HRP-coupled secondary antibodies, and developed by ECL (Amersham Pharmacia Biotech.).

For detection of endogenous proteins, nuclear extracts from human HBL100 cells were prepared (Watters, D., Khanna, K. K., Beamish, H., Birrell, G., Spring, K., Kedar, P., Gatei, M., Stenzel, D., Hobson, K., Kozlov, S., Zhang, N., Farrell, A., Ramsay, J., Gatti, R., and Lavin, M. (1997) *Oncogene* **14**(16), 1911-21). Proteins were immunoprecipitated with either anti-LMO4 rabbit antisera or a rat anti-LMO4 monoclonal antibody and protein

G sepharose, and fractionated by SDS-PAGE. After transfer, filters were blocked and incubated with mouse monoclonal antibodies to either CtIP (14.1) (Yu, X., and Baer, R. (2000) *J Biol Chem* **275**(24), 18541-9) or BRCA1 (MS110, Oncogene Research Products), followed by incubation with HRP-coupled secondary antibodies, and developed by ECL (Amersham Pharmacia Biotech.).

***In vitro* binding assay**

In vitro synthesis of ^{35}S-labelled BRCA1 (C-terminal residues 1528 - 1863) was performed by *in vitro* transcription/translation of HA-pCDNA3.1-BRCA1-SZ using the TNT T7 coupled reticulocyte lysate system (Promega). Binding assays were carried out with a 10 µl aliquot of ^{35}S-labeled BRCA1-SZ primed lysate and 100 µl (50% slurry of GST-sepharose beads; Amersham Pharmacia) of GST-LMO4 or GST-only protein in GST interaction buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 0.3% NP-40, 1mM DTT, 0.25% BSA and 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) for 2 hours at 4°C. The beads were subsequently washed twice in GST interaction buffer containing BSA, followed by two more washes in GST interaction buffer without BSA. Finally, the bound BRCA1 C-terminal polypeptide was eluted by boiling the beads for 5 min in 30 µl loading buffer and analysed by SDS-PAGE.

Northern blot analysis

Poly(A)$^+$ RNA was isolated from human and mouse breast epithelial cell lines cited in previous studies (Douglas, A. M., Grant, S. L., Goss, G. A., Clouston, D. R., Sutherland, R. L., and Begley, C. G. (1998) *Int J Cancer* **75**(1), 64-73) and Northern analysis was performed (Visvader, J. E., Elefanty, A. G., Strasser, A., and Adams, J. M. (1992) *Embo J* **11**(12), 4557-64).

Transactivation assays in yeast and mammalian cells

The yeast transcription assay was performed in the yeast strain BJ5462; this was cotransformed with the LacZ reporter plasmid, YepΔ62 (generously provided by P.Vaughan), and pGBT9-BRCA1(AD), and colonies selected on media deficient in leu and trp. These transformants were then additionally transformed with either the pYX212-LMO4 expression plasmid or empty vector, and were selected on media lacking ura, trp and leu. β-galactosidase activities were determined using the o-nitrophenyl-β-D-galactoside (ONPG) liquid culture assay following standard protocol (CLONTECH Yeast Protocols Handbook).

Kidney embryonal 293T cells were transiently transfected (6-well plates) with the indicated plasmids: 0.5 μg pG5CAT (CLONTECH), 1 μg pCMV-Gal4b-BRCA1-AD or 1 μg Gal4b parental vector, and either 2 μg Flag-EF1α-LMO4 or 2 μg empty control vector using the calcium phosphate precipitation method. CAT activity was determined using the CAT Elisa system (Roche) and was normalised against protein concentration, as determined by the Bradford assay (BioRad).

EXAMPLE 6

IDENTIFICATION OF CTIP AS A LMO4-INTERACTING PROTEIN

We used the yeast two-hybrid system to identify LMO4-interacting proteins in breast epithelium. A screen of 8.4×10^6 transformants of a primary breast adenocarcinoma cDNA library yielded more than 800 His^+ colonies. Six hundred and fifty-nine β-galactosidase positive clones were isolated and sequentially screened by yeast colony hybridisation using cDNA probes representing the known LMO4-associated proteins, Ldb1 and Deformed Epidermal Autoregulatory Factor (DEAF1) (Kenny, D. A., Jurata, L. W., Saga, Y., and Gill, G. N. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(19), 11257-62;Sugihara, T. M., Bach, I., Kioussi, C., Rosenfeld, M. G., and Andersen, B. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26), 15418-23;Grutz, G., Forster, A., and Rabbitts, T. H. (1998) *Oncogene* 17(21), 2799-803), and known false positives. Approximately 60% of these clones corresponded to

Ldb1/Ldb2 (30%) or DEAF1 (30%). Of 150 cDNA clones sequenced, 22 were found to correspond to either Ldb1 or Ldb2, 20 encoded DEAF1, at least 70 corresponded to false positives (e.g. ribosomal, mitochondrial and extracellular matrix proteins), while the remaining 38 cDNAs represented 9 distinct genes or ESTs. One of these clones corresponded to the complete coding sequence of CtIP (CtBP interacting protein), which encodes a cofactor originally identified on the basis of its interaction with the transcriptional corepressor CtBP (Adenovirus E1A C-terminal binding protein) (Schaeper, U., Subramanian, T., Lim, L., Boyd, J. M., and Chinnadurai, G. (1998) *J Biol Chem* 273(15), 8549-52).

EXAMPLE 7

***IN VIVO* ASSOCIATION BETWEEN LMO4 AND CTIP**

A specific interaction between CtIP and LMO4 was confirmed in mammalian cells. Expression vectors encoding LMO4, LMO2 or heterologous LIM domain proteins, each carrying a Flag- or myc-epitope at the N-terminus, together with an expression vector harboring CtIP (residues 45 - 897), were transiently transfected into 293T cells. Whole cell extracts were analysed using a coupled coimmunoprecipitation/western blot assay. As shown in Fig. 6*A*, Flag-LMO4 and CtIP were found to specifically associate *in vivo*, in reciprocal co-immunoprecipitation experiments (lanes 1 and 4). CtIP was not detected in immunoprecipitates from cells expressing Flag-LMO4 alone (lane 3) or in those using an isotype-matched control antibody. A single LIM domain of LMO4 (amino acids 1 - 82) was found to be sufficient to mediate interaction with CtIP in mammalian cells (Fig. 6*B*, lane 1). Only the first LIM domain of LMO4 but not the second LIM domain (amino acids 79 - 165) could associate with CtIP (lane 2). CtIP also coprecipitated with the related LIM domain protein, LMO2 (5) (Fig. 6*A*, lane 2), but not with the nuclear LIM homeodomain proteins Lhx1 and Lhx3 (Fig. 6*C*, lanes 2 and 3), nor with LIM-kinase (LMK1) (Fig. 6*C*, lane 4).

To test the interaction between endogenous proteins in breast epithelial cells, we generated a rabbit polyclonal antiserum against full-length mouse LMO4. This antiserum recognises

a protein of about 17 kD in breast epithelial cells and in cells transfected with an LMO4 expression vector. Nuclear extracts from HBL100 cells were immunoprecipitated with anti-LMO4 antiserum (Fig. 6*D*, lane 2) or pre-immune serum (lane 1). Immunoblotting with a mouse anti-CtIP monoclonal antibody revealed a specific band of 125 kD (Fig. 6*D*), thus confirming the *in vivo* association between native CtIP and LMO4 proteins.

EXAMPLE 8

COEXPRESSION OF LMO4 AND CTIP IN BREAST EPITHELIAL CELL LINES AND SUBCELLULAR LOCALISATION OF LMO4

Both the LMO4 and CtIP genes have been reported to be expressed in a number of different tissues and cell types (Kenny, D. A., Jurata, L. W., Saga, Y., and Gill, G. N. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(19), 11257-62;Sugihara, T. M., Bach, I., Kioussi, C., Rosenfeld, M. G., and Andersen, B. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26), 15418-23;Wong, A. K., Ormonde, P. A., Pero, R., Chen, Y., Lian, L., Salada, G., Berry, S., Lawrence, Q., Dayananth, P., Ha, P., Tavtigian, S. V., Teng, D. H., and Bartel, P. L. (1998) *Oncogene* **17**(18), 2279-85). We surveyed their expression in a panel of breast epithelial cell lines, the majority of which were derived from human breast cancers but also included immortalised human cells (184). Northern analysis revealed CtIP RNA (3.6 kb) levels were relatively uniform while expression of the LMO4 transcripts (1.8 and 2.3 kb) varied dramatically (Fig. 8). High levels of LMO4 were apparent in a number of human breast cancer cell lines, including BT-549, BT-474, HS-578T, MDA-MB361, T-47D and ZR-75B (Fig. 8), relative to the low levels evident in the immortalised 184 cells, as we recently reported (Visvader, J. E., Venter, D., Hahm, K., Santamaria, M., Sum, E. Y. M., O'Reilly, L., White, D., Williams, R., Armes, J., and Lindeman, G. J. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(25), 14452–14457). In human breast cancers, overexpression of the LMO4 gene has been observed at both the RNA and protein levels (Visvader, J. E., Venter, D., Hahm, K., Santamaria, M., Sum, E. Y. M., O'Reilly, L., White, D., Williams, R., Armes, J., and Lindeman, G. J. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(25), 14452–14457).

EXAMPLE 9

LMO4 INTERACTS WITH TWO DISTINCT DOMAINS IN CTIP

The function of CtIP is not known but it appears to serve as a cofactor for several nuclear regulatory proteins, including BRCA1, Adenovirus E1A C-terminal binding protein (CtBP), Retinoblastoma (Rb) and p130 pocket proteins (Yu, X., Wu, L. C., Bowcock, A. M., Aronheim, A., and Baer, R. (1998) *J Biol Chem* **273**(39), 25388-92;Wong, A. K., Ormonde, P. A., Pero, R., Chen, Y., Lian, L., Salada, G., Berry, S., Lawrence, Q., Dayananth, P., Ha, P., Tavtigian, S. V., Teng, D. H., and Bartel, P. L. (1998) *Oncogene* **17**(18), 2279-85;Li, S., Chen, P. L., Subramanian, T., Chinnadurai, G., Tomlinson, G., Osborne, C. K., Sharp, Z. D., and Lee, W. H. (1999) *J Biol Chem* **274**(16), 11334-8,30-32). In addition to the defined regions that interact with these proteins, CtIP contains two potential leucine zipper domains (120 - 141 and 740 - 761) (Fusco, C., Reymond, A., and Zervos, A. S. (1998) *Genomics* **51**(3), 351-8), depicted in Fig. 7*A*. To delineate the domains within CtIP that mediate interaction with LMO4, a series of CtIP deletion mutants (Fig. 7*A*), each linked to an N-terminal HA-epitope tag, were co-transfected with Flag-LMO4 into 293T epithelial cells. As shown in Fig. 8*B*, HA-CtIP (45 - 371), HA-CtIP (371 - 897), HA-CtIP (45 - 897) and HA-CtIP (620 - 897) proteins could associate with Flag-LMO4 (lanes 2, 4, 5, and 6). In contrast, neither the HA-CtIP (59 - 320) nor HA-CtIP (281 - 620) mutants were immunoprecipitable by an anti-Flag antibody (lanes 1 and 3, respectively). Thus, there are apparently two regions within CtIP that can mediate interaction with LMO4: a small domain at the N-terminus (residues 45 - 59) and a C-terminal region (residues 620 - 897), which encompasses a putative leucine zipper motif (Fig. 8*A*). These regions are distinct from those that associate with CtBP (amino acids 392 - 396), Rb (153 - 157) and BRCA1 (133 - 369) (Yu, X., Wu, L. C., Bowcock, A. M., Aronheim, A., and Baer, R. (1998) *J Biol Chem* **273**(39), 25388-92;Yu, X., and Baer, R. (2000) *J Biol Chem* **275**(24), 18541-9Schaeper, U., Subramanian, T., Lim, L., Boyd, J. M., and Chinnadurai, G. (1998) *J Biol Chem* **273**(15), 8549-52;Fusco, C., Reymond, A., and Zervos, A. S. (1998) *Genomics* **51**(3), 351-8;Meloni, A. R., Smith, E. J., and Nevins, J. R. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(17), 9574-9).

EXAMPLE 10

LMO4 ALSO INTERACTS WITH THE BREAST AND OVARIAN TUMOR SUPPRESSOR BRCA1

Since CtIP was recently demonstrated to interact with the breast tumor suppressor BRCA1 (Yu, X., Wu, L. C., Bowcock, A. M., Aronheim, A., and Baer, R. (1998) *J Biol Chem* **273**(39), 25388-92;Wong, A. K., Ormonde, P. A., Pero, R., Chen, Y., Lian, L., Salada, G., Berry, S., Lawrence, Q., Dayananth, P., Ha, P., Tavtigian, S. V., Teng, D. H., and Bartel, P. L. (1998) *Oncogene* **17**(18), 2279-85;Li, S., Chen, P. L., Subramanian, T., Chinnadurai, G., Tomlinson, G., Osborne, C. K., Sharp, Z. D., and Lee, W. H. (1999) *J Biol Chem* **274**(16), 11334-8), we investigated whether LMO4, CtIP and BRCA1 could participate in a multiprotein complex. Both CtIP and LMO4 were co-immunoprecipitated with an anti-myc antibody from 293T cells expressing myc-tagged BRCA1, Flag-tagged LMO4 and CtIP (Fig. 9*A*, lane 2). This finding revealed that all three proteins can form a stable multiprotein complex *in vivo*. The presence of exogenous CtIP was not necessary for immunoprecipitation of LMO4 by the anti-myc antibody, as shown in Fig. 9*A* (lane 1). These results raised the possibility that LMO4 might directly associate with BRCA1 (see below).

To further examine this interaction in epithelial cells, a rat anti-LMO4 monoclonal antibody was used to immunoprecipitate proteins from HBL100–derived nuclear extracts. This antibody specifically recognises a 17 kD protein in cells transfected with a LMO4 expression vector but not in those lacking LMO4. Endogenous BRCA1 was immunoprecipitated by the anti-LMO4 monoclonal antibody (Fig 9*B*, lane 2), but not with a control antibody (Fig 9*B*, lane 3). This result confirms an *in vivo* association between LMO4 and BRCA1 and, moreover, demonstrates that this interaction occurs between native proteins in epithelial cells. Immunoblotting of the anti-LMO4 immunoprecipitated protein with anti-CtIP monoclonal antibody yielded a faint band of 125 kD, corresponding to CtIP (Fig 9*B*, middle panel), while blotting with anti-LMO4 antibody gave rise to the expected 17 kD LMO4 protein (Fig 9*B*, lower panel). Thus LMO4, BRCA1 and CtIP have the potential to form a native complex *in vivo*.

We investigated whether the nuclear adaptor protein Ldb1, which binds LMO4 and other LIM proteins with high affinity (Kenny, D. A., Jurata, L. W., Saga, Y., and Gill, G. N. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(19), 11257-62;Sugihara, T. M., Bach, I., Kioussi, C., Rosenfeld, M. G., and Andersen, B. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26), 15418-23;Grutz, G., Forster, A., and Rabbitts, T. H. (1998) *Oncogene* **17**(21), 2799-803), could also participate in the multiprotein complex. Ldb1 could be immunoprecipitated from cells transfected with plasmids encoding CtIP, BRCA1, LMO4 and LDB1 using an anti-CtIP antibody (Fig. 9*C*). Therefore, all four proteins have the potential to form a stable complex *in vivo*.

EXAMPLE 11

THE BRCT DOMAIN OF BRCA1 DIRECTLY INTERACTS WITH LMO4

The C-terminal 335 amino acids of BRCA1 (SZ fragment, residues 1528 - 1863) were sufficient to mediate interaction with LMO4 (Fig. 10*A*) in transfected cells. This region encompasses two tandem BRCT motifs that are required for BRCA1 function in the suppression of tumorigenesis (Yu, X., Wu, L. C., Bowcock, A. M., Aronheim, A., and Baer, R. (1998) *J Biol Chem* **273**(39), 25388-92;Wong, A. K., Ormonde, P. A., Pero, R., Chen, Y., Lian, L., Salada, G., Berry, S., Lawrence, Q., Dayananth, P., Ha, P., Tavtigian, S. V., Teng, D. H., and Bartel, P. L. (1998) *Oncogene* **17**(18), 2279-85;Li, S., Chen, P. L., Subramanian, T., Chinnadurai, G., Tomlinson, G., Osborne, C. K., Sharp, Z. D., and Lee, W. H. (1999) *J Biol Chem* **274**(16), 11334-8). We confirmed the association between LMO4 and BRCA1 using an *in vitro* binding assay. Full-length LMO4 expressed as a glutathione-S-transferase (GST) fusion protein, immobilised on glutathione sepharose beads, was incubated with *in vitro* translated, ^{35}S-methionine-labeled BRCA1-SZ polypeptide (1528 - 1863). As shown in Fig. 10*B*, BRCA1 specifically associated with GST-LMO4, but failed to interact with GST alone.

To exclude the possibility that CtIP was acting as a bridging molecule between LMO4 and BRCA1, we tested the interaction between BRCA1 and LMO4 in yeast. It is notable that

CtIP appears to be absent from the S. cerevisiae genome (Saccharomyces Genome Database, NCBI). Cotransformation of Hf7c cells with the SZ portion of BRCA1 linked to the Gal4-activation domain and GBT9-LMO4, revealed a direct association between these proteins (Fig. 10*C*). His^+ β–Gal^+ colonies were obtained for these transformants, as was observed for yeast cells cotransformed with LMO4 and CtIP. Thus, the BRCT domains of BRCA1 mediate direct binding to both LMO4 and CtIP.

EXAMPLE 12

TUMOR-DERIVED MUTATIONS IN BRCA1 DO NOT AFFECT LM04 BINDING

Tumor-associated mutations have been identified in a significant proportion of hereditary breast cancer patients. The lesions include missense mutations (P1749R, M1775R) and a nonsense mutation (Y1853Δ) that deletes the C-terminal 11 amino acids of BRCA1 (Yu, X., Wu, L. C., Bowcock, A. M., Aronheim, A., and Baer, R. (1998) *J Biol Chem* **273**(39), 25388-92;Li, S., Chen, P. L., Subramanian, T., Chinnadurai, G., Tomlinson, G., Osborne, C. K., Sharp, Z. D., and Lee, W. H. (1999) *J Biol Chem* **274**(16), 11334-8). These tumor-associated mutations have been demonstrated to abolish binding of BRCA1 to CtIP (Yu, X., Wu, L. C., Bowcock, A. M., Aronheim, A., and Baer, R. (1998) *J Biol Chem* **273**(39), 25388-92;Li, S., Chen, P. L., Subramanian, T., Chinnadurai, G., Tomlinson, G., Osborne, C. K., Sharp, Z. D., and Lee, W. H. (1999) *J Biol Chem* **274**(16), 11334-8). To assess their effect on BRCA1-LMO4 interaction, myc-tagged BRCA1 expression constructs containing these mutations were tested for their ability to bind Flag-tagged LMO4 in 293T cells. All mutants were found to interact with LMO4, as observed for the wild-type BRCA1 polypeptide (Fig. 11). Thus, mutations occurring within BRCA1 in hereditary breast cancer patients can abolish CtIP binding without affecting interaction between BRCA1 and LMO4.

EXAMPLE 13

LM04 REPRESSES THE TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF BRCA1

The BRCA1 C-terminal (BRCT) domain has previously been shown to activate transcription when recruited to a promoter via a heterologous DNA-binding domain (Chapman, M. S., and Verma, I. M. (1996) *Nature* **382**(6593), 678-9;34). Further characterisation of the C-terminus has revealed that there are two adjacent activation domains, AD1 (residues 1293 - 1558) and AD2 (residues 1560 - 1863), which together constitute the AD domain of 571 amino acids (Hu, Y. F., Miyake, T., Ye, Q., and Li, R. (2000) *J Biol Chem* **275**(52), 40910-5). Functional synergy occurs between AD1 and AD2 in both yeast and mammalian cells, such that the AD region is a stronger transcriptional activator than either domain alone (Hu, Y. F., Miyake, T., Ye, Q., and Li, R. (2000) *J Biol Chem* **275**(52), 40910-5). To explore the effect of LMO4 on activation of transcription by BRCA1, we initially used a yeast-based transcription assay with the C-terminal AD region of BRCA1 fused to the Gal4 DNA-binding domain. This plasmid was introduced with either a LMO4 yeast expression vector or an empty vector into the BJ5462 yeast strain, harboring a LacZ reporter plasmid. BRCA1-AD was a potent transactivator, inducing transcription 400- to 600-fold over basal Gal4 DNA-binding activity (Fig. 12*A*). This activation was markedly repressed by LMO4, which resulted in an 80% reduction in the level of activation by BRCA1-AD (Fig. 12*A*). The expression of BRCA1-AD was equivalent in the presence or absence of the LMO4-encoding plasmid (Fig. 12*A*, lower panel).

To confirm the findings of the yeast transcription assay, we performed a similar study in mammalian 293T cells. BRCA1-AD tethered to the Gal4 DNA-binding domain induced transcription of the Gal4-CAT reporter gene by 3- to 4-fold over the basal activity of the Gal4-DNA-binding domain alone (Fig. 12*B*). Consistent with the findings above, LMO4 exerted a negative effect on transactivation by BRCA1 (approximately 3-fold), returning transcriptional activity to the basal level observed with the Gal4 DNA-binding domain (DBD) alone. LMO4 does not act as a general repressor since the activity of the VP16 transactivation domain was not altered by forced LMO4 expression (data not shown).

Moreover, the basal activity of the Gal4 DBD was not reduced by the presence of LMO4 (Fig. 12*B*). The expression of BRCA1-AD was unaffected by the presence of LMO4 (Fig. 12*B*, lower panel).

Those skilled in the art will appreciate that the invention described herein is susceptible to variations and modifications other than those specifically described. It is to be understood that the invention includes all such variations and modifications. The invention also includes all of the steps, features, compositions and compounds referred to or indicated in this specification, individually or collectively, and any and all combinations of any two or more of said steps or features.

BIBLIOGRAPHY:

Agulnick, A. D., Taira, M., Breen, J. J., Tanaka, T., Dawid, I. B. & Westphal, H. (1996) Nature 384, 270-2.

Armes, J. E., Trute, L., White, D., Southey, M. C., Hammet, F., Tesoriero, A., Hutchins, A. M., Dite, G. S., McCredie, M. R., Giles, G. G., Hopper, J. L. & Venter, D. J. (1999) Cancer Res 59, 2011-7.

Bach, I. (2000) *Mech Dev* **91**(1-2), 5-17

Bach, I., Carriere, C., Ostendorff, H. P., Andersen, B. & Rosenfeld, M. G. (1997) Genes Dev 11, 1370-80.

Bach, I., Rhodes, S. J., Pearse, R. V., 2nd, Heinzel, T., Gloss, B., Scully, K. M., Sawchenko, P. E., and Rosenfeld, M. G. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(7), 2720-4

Bärlund, M., Tirkkonen, M., Forozan, F., Tanner, M. M., Kallioniemi, O. & Kallioniemi, A. (1997) Genes Chromosomes Cancer 20, 372-6.

Boehm, T., Baer, R., Lavenir, I., Forster, A., Waters, J. J., Nacheva, E. & Rabbitts, T. H. (1988) Embo J 7, 385-94.

Boehm, T., Foroni, L., Kaneko, Y., Perutz, M. F. & Rabbitts, T. H. (1991) Proc Natl Acad Sci U S A 88, 4367-71.

Byrne, J. A., Nourse, C. R., Basset, P., and Gunning, P. (1998) *Oncogene* **16**(7), 873-81

Catteau, A., Harris, W. H., Xu, C. F., and Solomon, E. (1999) *Oncogene* **18**(11), 1957-65

Chapman, M. S., and Verma, I. M. (1996) *Nature* **382**(6593), 678-9

Couch, F. J., and Weber, B. L. (1996) *Hum Mutat* **8**(1), 8-18

Cuny, M., Kramar, A., Courjal, F., Johannsdottir, V., Iacopetta, B., Fontaine, H., Grenier, J., Culine, S. & Theillet, C. (2000) Cancer Res 60, 1077-83.

Dawid, I. B., Breen, J. J., and Toyama, R. (1998) *Trends Genet* **14**(4), 156-62

Deng, C. X., and Brodie, S. G. (2000) *Bioessays* **22**(8), 728-37

Desprez, P.-Y., Roskelley, C., Campisi, J. & Bissell, M. J. (1993) Mol. Cell. Diff. 1, 99-110.

Dobrovic, A., and Simpfendorfer, D. (1997) *Cancer Res* **57**(16), 3347-50

Douglas, A. M., Grant, S. L., Goss, G. A., Clouston, D. R., Sutherland, R. L., and Begley, C. G. (1998) *Int J Cancer* **75**(1), 64-73

Emi, M., Matsumoto, S., Iida, A., Tsukamoto, K., Nakata, T., Yokota, T., Akiyama, F., Sakamoto, G., Yoshimoto, M., Kasumi, F. & Nakamura, Y. (1997) Breast Cancer 4, 243-246.

Fisch, P., Boehm, T., Lavenir, I., Larson, T., Arno, J., Forster, A. & Rabbitts, T. H. (1992) Oncogene 7, 2389-97.

Fusco, C., Reymond, A., and Zervos, A. S. (1998) *Genomics* **51**(3), 351-8

Futreal, P. A., Soderkvist, P., Marks, J. R., Iglehart, J. D., Cochran, C., Barrett, J. C., and Wiseman, R. W. (1992) *Cancer Res* **52**(9), 2624-7

German, M. S., Wang, J., Chadwick, R. B., and Rutter, W. J. (1992) *Genes Dev* **6**(11), 2165-76

Grutz, G., Forster, A. & Rabbitts, T. H. (1998) Oncogene 17, 2799-803.

Grutz, G., Forster, A., and Rabbitts, T. H. (1998) *Oncogene* **17**(21), 2799-803

Hoggard, N., Brintnell, B., Howell, A., Weissenbach, J. & Varley, J. (1995) Genes Chromosomes Cancer 12, 24-31.

Hu, Y. F., Hao, Z. L., and Li, R. (1999) *Genes Dev* **13**(6), 637-42

Hu, Y. F., Miyake, T., Ye, Q., and Li, R. (2000) *J Biol Chem* **275**(52), 40910-5

Huang, D. C., Cory, S., and Strasser, A. (1997) *Oncogene* **14**(4), 405-14

Jurata, L. W., and Gill, G. N. (2000), pp. 75-113

Jurata, L. W., Kenny, D. A., and Gill, G. N. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21), 11693-8

Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Piper, J., Tanner, M., Stokke, T., Chen, L., Smith, H. S., Pinkel, D., Gray, J. W. & Waldman, F. M. (1994) Proc Natl Acad Sci U S A 91, 2156-60.

Kenny, D. A., Jurata, L. W., Saga, Y., and Gill, G. N. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(19), 11257-62

Knuutila, S., Bjorkqvist, A. M., Autio, K., Tarkkanen, M., Wolf, M., Monni, O., Szymanska, J., Larramendy, M. L., Tapper, J., Pere, H., El-Rifai, W., Hemmer, S., Wasenius, V. M., Vidgren, V. & Zhu, Y. (1998) Am J Pathol 152, 1107-23.

Koonin, E. V., Altschul, S. F., and Bork, P. (1996) *Nat Genet* **13**(3), 266-8

Li, S., Chen, P. L., Subramanian, T., Chinnadurai, G., Tomlinson, G., Osborne, C. K., Sharp, Z. D., and Lee, W. H. (1999) *J Biol Chem* **274**(16), 11334-8

Mancini, D. N., Rodenhiser, D. I., Ainsworth, P. J., O'Malley, F. P., Singh, S. M., Xing, W., and Archer, T. K. (1998) *Oncogene* **16**(9), 1161-9

McGuire, E. A., Rintoul, C. E., Sclar, G. M. & Korsmeyer, S. J. (1992) Mol Cell Biol 12, 4186-96.

Meloni, A. R., Smith, E. J., and Nevins, J. R. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(17), 9574-9

Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L. M., Ding, W., and et al. (1994) *Science* **266**(5182), 66-71

Monteiro, A. N. (2000) *Trends Biochem Sci* **25**(10), 469-74

Neale, G. A., Rehg, J. E. & Goorha, R. M. (1997) Leukemia 11 Suppl 3, 289-90.

Nicholson, S. E., Willson, T. A., Farley, A., Starr, R., Zhang, J. G., Baca, M., Alexander, W. S., Metcalf, D., Hilton, D. J. & Nicola, N. A. (1999) EMBO J 18, 375-85.

Pinkel, D., Segraves, R., Sudar, D., Clark, S., Poole, I., Kowbel, D., Collins, C., Kuo, W. L., Chen, C., Zhai, Y., Dairkee, S. H., Ljung, B. M., Gray, J. W. & Albertson, D. G. (1998) Nat Genet 20, 207-11.

Rabbitts, T. H. (1998) *Genes Dev* **12**(17), 2651-7

Racevskis, J., Dill, A., Sparano, J. A., and Ruan, H. (1999) *Biochim Biophys Acta* **1445**(1), 148-53

Rice, J. C., Massey-Brown, K. S., and Futscher, B. W. (1998) *Oncogene* **17**(14), 1807-12

Royer-Pokora, B., Loos, U. & Ludwig, W. D. (1991) Oncogene 6, 1887-93.

Russell, A., Thompson, M. A., Hendley, J., Trute, L., Armes, J. & Germain, D. (1999) Oncogene 18, 1983-91.

Sanchez-Garcia, I., and Rabbitts, T. H. (1994) *Trends Genet* **10**(9), 315-20

Sanchez-Garcia, I., Osada, H., Forster, A., and Rabbitts, T. H. (1993) *Embo J* **12**(11), 4243-50

Schaeper, U., Subramanian, T., Lim, L., Boyd, J. M., and Chinnadurai, G. (1998) *J Biol Chem* **273**(15), 8549-52

Schmutzler, R. K., Bierhoff, E., Werkhausen, T., Fimmers, R., Speiser, P., Kubista, E., Krebs, D., Zeillinger, R., Wiestler, O. D., and Von Deimling, A. (1997) *Int J Cancer* **74**(3), 322-5

Scully, R., and Livingston, D. M. (2000) *Nature* **408**(6811), 429-32

Scully, R., Anderson, S. F., Chao, D. M., Wei, W., Ye, L., Young, R. A., Livingston, D. M., and Parvin, J. D. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(11), 5605-10

Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T., and Livingston, D. M. (1997) *Cell* **88**(2), 265-75

Shattuck-Eidens, D., McClure, M., Simard, J., Labrie, F., Narod, S., Couch, F., Hoskins, K., Weber, B., Castilla, L., Erdos, M., and et al. (1995) *Jama* **273**(7), 535-41

Smith, D. B., and Johnson, K. S. (1988) *Gene* **67**(1), 31-40

Sugihara, T. M., Bach, I., Kioussi, C., Rosenfeld, M. G., and Andersen, B. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26), 15418-23

Taira, M., Otani, H., Saint-Jeannet, J. P., and Dawid, I. B. (1994) *Nature* **372**(6507), 677-9
Thompson, M. E., Jensen, R. A., Obermiller, P. S., Page, D. L., and Holt, J. T. (1995) *Nat Genet* **9**(4), 444-50

Tse, E., Grutz, G., Garner, A. A., Ramsey, Y., Carter, N. P., Copeland, N., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Agulnick, A., Forster, A. & Rabbitts, T. H. (1999) Mamm Genome 10, 1089-94.

Tsukamoto, K., Ito, N., Yoshimoto, M., Kasumi, F., Akiyama, F., Sakamoto, G., Nakamura, Y. & Emi, M. (1998) Cancer 82, 317-22.

Valge-Archer, V. E., Osada, H., Warren, A. J., Forster, A., Li, J., Baer, R., and Rabbitts, T. H. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(18), 8617-21

Visvader, J. E., Elefanty, A. G., Strasser, A., and Adams, J. M. (1992) *Embo J* **11**(12), 4557-64

Visvader, J. E., Mao, X., Fujiwara, Y., Hahm, K., and Orkin, S. H. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25), 13707-12

Visvader, J. E., Venter, D., Hahm, K., Santamaria, M., Sum, E. Y. M., O'Reilly, L., White, D., Williams, R., Armes, J., and Lindeman, G. J. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(25), 14452–14457

Visvader, J., Begley, C. G. & Adams, J. M. (1991) Oncogene 6, 187-94.

Wadman, I. A., Osada, H., Grutz, G. G., Agulnick, A. D., Westphal, H., Forster, A., and Rabbitts, T. H. (1997) *Embo J* **16**(11), 3145-57

Wadman, I., Li, J., Bash, R. O., Forster, A., Osada, H., Rabbitts, T. H., and Baer, R. (1994) *Embo J* **13**(20), 4831-9

Warren, A. J., Colledge, W. H., Carlton, M. B., Evans, M. J., Smith, A. J. & Rabbitts, T. H. (1994) Cell 78, 45-57.

Watters, D., Khanna, K. K., Beamish, H., Birrell, G., Spring, K., Kedar, P., Gatei, M., Stenzel, D., Hobson, K., Kozlov, S., Zhang, N., Farrell, A., Ramsay, J., Gatti, R., and Lavin, M. (1997) *Oncogene* **14**(16), 1911-21

Weiss, M. J., Keller, G. & Orkin, S. H. (1994) Genes Dev 8, 1184-97.

Wilkinson, D. (1992) In Situ Hybridisation (IRL, New York).

Wilson, C. A., Ramos, L., Villasenor, M. R., Anders, K. H., Press, M. F., Clarke, K., Karlan, B., Chen, J. J., Scully, R., Livingston, D., Zuch, R. H., Kanter, M. H., Cohen, S., Calzone, F. J., and Slamon, D. J. (1999) *Nat Genet* **21**(2), 236-40

Wong, A. K., Ormonde, P. A., Pero, R., Chen, Y., Lian, L., Salada, G., Berry, S., Lawrence, Q., Dayananth, P., Ha, P., Tavtigian, S. V., Teng, D. H., and Bartel, P. L. (1998) *Oncogene* **17**(18), 2279-85

Yamada, Y., Warren, A. J., Dobson, C., Forster, A., Pannell, R., and Rabbitts, T. H. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(7), 3890-5

Yu, X. (2000), PhD thesis

Yu, X., and Baer, R. (2000) *J Biol Chem* **275**(24), 18541-9

Yu, X., Wu, L. C., Bowcock, A. M., Aronheim, A., and Baer, R. (1998) *J Biol Chem* **273**(39), 25388-92

Zhang, H., Somasundaram, K., Peng, Y., Tian, H., Bi, D., Weber, B. L., and El-Deiry, W. S. (1998) *Oncogene* **16**(13), 1713-21

CLAIMS:

1. A method for detecting an aberrant cell or a predisposition to the development of an aberrant cell in a subject or in a biological sample from said subject, said method comprising contacting cells or cell extracts from said subject or said biological sample with an immunointeractive molecule specific for LM04 or antigenic portion thereof and screening for the level of immunointeractive molecule-LM04 complex formation wherein an elevated presence of said complex relative to a normal cell is indicative of an aberrant cell.

2. A method for detecting an aberrant cell or the predisposition to the development of an aberrant cell in a subject or in a biological sample from said subject, said method comprising screening the level of a transcription product of a gene encoding LM04 wherein an elevated level of said expression product compared to the level of a normal cell is indicative of an aberrant cell.

3. A method for diagnosing the presence of an aberrant cell growth or the predisposition to the development of an aberrant cell growth in a subject, said method comprising contacting cells or cell extracts from said subject or a biological sample from said subject with a LM04-binding effective amount of an antibody having specificity for said LM04 or an antigenic determinant or epitope thereon and then quantitatively or qualitatively determining the level of a LM04-antibody complex wherein the presence of elevated levels of said complex compared to a normal cell is indicative of the presence of an aberrant growth.

4. A method for diagnosing the presence of an aberrant cell growth or the predisposition to the development of an aberrant cell growth in a subject, said method comprising obtaining mRNA from cells of said subject or from a biological sample from said subject and optionally generating cDNA and contacting said mRNA or cDNA with a genetic probe capable of hybridizing to and/or amplifying all or part of a nucleotide sequence encoding LM04 or its complementary

nucleotide sequence and then detecting the level of said mRNA or cDNA wherein the presence of elevated levels of said mRNA or cDNA compared to normal cells is indicative of the presence of an aberrant growth.

5. The method according to any one of claims 1-4 wherein said aberrant cell is a neoplastic cell.

6. The method according to claim 5 wherein said neoplastic cell is one which characterizes central nervous system tumors, retinoblastoma, head and neck cancers, lung cancer, kidney cancers, pancreatic neoplasias, colorectal cancer, cervical cancer, testicular cancer, ovarian cancer, lymphoma, leukemia, malignant melanoma, neuroendocrine tumors and carcinoid tumors.

7. The method according to claim 5 wherein said neoplastic cell is a squamous cell, renal cell, islet cell, germ cell, mammary cell or epithelial cell

8. The method according to claim 7 wherein said neoplastic cell is a mammary cell.

9. The method according to claim 7 wherein said neoplastic cell is an epithelial cell.

10. An isolated immunointeractive molecule or derivative, analogue or mutant thereof wherein the imunointeractive molecule interacts with LM04 or *LM04*.

11. The immunointeractive molecule of claim 10 wherein said immunointeractive molecule is an antibody.

12. A deimmunized antibody molecule having specificity for an epitope recognized by a monoclonal antibody to LM04 wherein at least one of the CDRs of the variable domain of said deimmunized antibody is derived from the said monoclonal antibody to LM04 and the remaining immunoglobulin-derived parts of the deimmunized antibody molecule are derived from an immunoglobulin or an

analogue thereof from the host for which the antibody is to be deimmunized.

13. The antibody of claim 11 wherein said antibody is a monoclonal antibody.

14. The monoclonal antibody of claim 13 wherein said monoclonal antibody is secreted by hybridoma 16H2 or mutant or variant thereof .

15. The monoclonal antibody of claim 13 wherein said monoclonal antibody is secreted by hybridoma 20F8 or mutant or variant thereof.

16. The hybridoma cell line 16H2 or mutant or variant thereof.

17. The hybridoma cell line 20F8 or mutant or variant thereof.

18. The method according to claim 1 or 3 wherein said immunointeractive molecule is the immunointeractive molecule of any one of claims 10-15.

19. An assay to detect LM04 including the steps of:-

(i) contacting a monoclonal antibody specific to LM04 or an antigenic determinant thereon with a biological sample suspected of containing a cell containing said LM04; and

(ii) subjecting the complex formed in step (1) to a signal detection step.

20. The method according to claim 17 wherein said antibody is an antibody according to any one of claims 13-15.

21. A method for detecting neoplastic cells in a human patient, said method comprising introducing into said patient a deimmunized form of a non-human derived monoclonal antibody according to claim 12 labelled with a reporter molecule,

allowing dissemination of the labelled antibody throughout the circulatory system, or to selected parts of the circulatory system and then subjecting said patient to reporter molecule-detection means to identify the location of the antibody.

22. A method of detecting, in a sample, LM04 or fragment, variant or derivative thereof comprising contacting the sample with an antibody or fragment or derivative thereof and detecting the level of a complex comprising said antibody and LM04 or fragment, variant or derivative thereof compared to normal controls wherein elevated levels of LM04 is indicative of cancer growth.

23. The method according to claim 22 wherein said antibody is an antibody according to any one of claims 11-15.

24. A method of monitoring for the onset or progression of an aberrant cell growth in a subject, said method comprising screening for the level of LM04 or a transcription product of a gene encoding LM04 in a biological sample from said subject wherein an elevated level of said LM04 or transcription product compared to the levels of a normal cell is indicative of aberrant cell growth.

25. The method according to claim 24 wherein said aberrant cell is a neoplastic cell.

26. The method according to claim 25 wherein said neoplastic cell is one which characterizes central nervous system tumors, retinoblastoma, head and neck cancers, lung cancer, kidney cancers, pancreatic neoplasias, colorectal cancer, cervical cancer, testicular cancer, ovarian cancer, lymphoma, leukemia, malignant melanoma, neuroendocrine tumors and carcinoid tumors.

27. The method according to claim 25 wherein said neoplastic cell is a squamous cell, renal cell, islet cell, germ cell, mammary cell or epithelial cell

28. The method according to claim 27 wherein said neoplastic cell is a mammary cell.

29. The method according to claim 27 wherein said neoplastic cell is an epithelial cell.

30. Use of a monoclonal antibody to LM04 in the manufacture of a quantitative or semi-quantitative diagnostic kit to determine relative levels of LM04 in suspected neoplastic cells from a patient.

31. Use according to claim 30 wherein said antibody is an antibody according to any one of claims 13-15.

32. A method of modulating LM04 regulated cellular proliferation, said method comprising contacting said cell with an effective amount of an agent for a time and under conditions sufficient to modulate *LM04* expression or LM04 functional activity wherein inhibiting or otherwise antagonising said expression or activity down-regulates said cellular proliferation.

33 A method for the treatment and/or prophylaxis of a conditions characterised by aberrant, unwanted or otherwise inappropriate LM04-regulated proliferative cellular activity in a mammal, said method comprising administering to said mammal an effective amount of an agent for a time and under conditions sufficient to modulate *LM04* expression or LM04 functional activity wherein inhibiting or otherwise antagonising said expression or activity down-regulates said cellular proliferation.

34. The method according to any one of claims 32 or 33 wherein said cell is a neoplastic cell.

35. The method according to claim 34 wherein said neoplastic cell is one which characterizes central nervous system tumors, retinoblastoma, head and neck cancers, lung cancer, kidney cancers, pancreatic neoplasias, colorectal cancer, cervical cancer, testicular cancer, ovarian cancer, lymphoma, leukemia, malignant

melanoma, neuroendocrine tumors and carcinoid tumors.

36. The method according to claim 34 wherein said neoplastic cell is a squamous cell, renal cell, islet cell, germ cell, mammary cell or epithelial cell

37. The method according to claim 36 wherein said neoplastic cell is a mammary cell.

38. The method according to claim 36 wherein said neoplastic cell is an epithelial cell.

39. A method for detecting an agent capable of modulating *LM04* expression or LM04 functional activity said method comprising contacting a cell or extract thereof containing said *LM04* or LM04 with a putative agent and detecting an altered expression phenotype associated with said interaction.

40. Use of an agent in the manufacture of medicament for the treatment of a condition in a mammal, which condition is characterised by aberrant, unwanted or otherwise inappropriate LM04-regulated cellular proliferation, wherein said agent modulates *LM04* expression or LM04 activity and wherein inhibiting or otherwise antagonising said expression or activity down-regulates said cellular proliferation.

41. Use according to claim 40 wherein said cell is a neoplastic cell.

42. Use according to claim 41 wherein said neoplastic cell is one which characterizes central nervous system tumors, retinoblastoma, head and neck cancers, lung cancer, kidney cancers, pancreatic neoplasias, colorectal cancer, cervical cancer, testicular cancer, ovarian cancer, lymphoma, leukemia, malignant melanoma, neuroendocrine tumors and carcinoid tumors.

43. Use according to claim 41 wherein said neoplastic cell is a squamous cell, renal cell, islet cell, germ cell, mammary cell or epithelial cell

44. The method according to claim 43 wherein said neoplastic cell is a mammary cell.

45. The method according to claim 43 wherein said neoplastic cell is an epithelial cell.

46. An agent identified in accordance with claim 40.

47. A pharmaceutical composition comprising a modulatory agent identified in accordance with claim 39 together with one or more pharmaceutically acceptable carriers and/or diluents

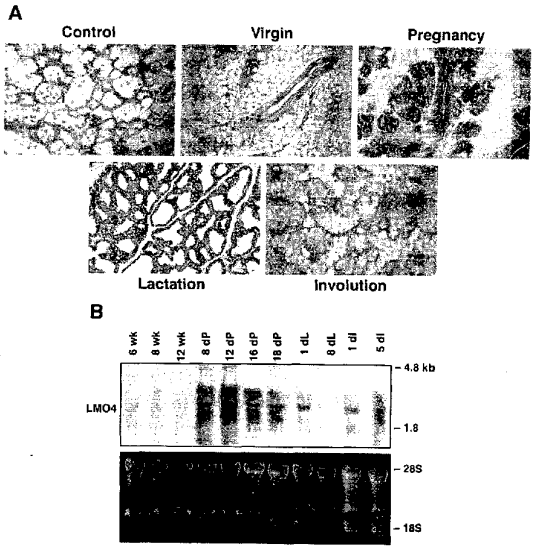

A
Control
Virgin
Pregnancy
Lactation
Involution
B
6 wk
8 wk
12 wk
8 dP
12 dP
16 dP
18 dP
1 dL
8 dL
1 dI
5 dI
4.8 kb
LMO4
1.8
28S
18S

Figure 1

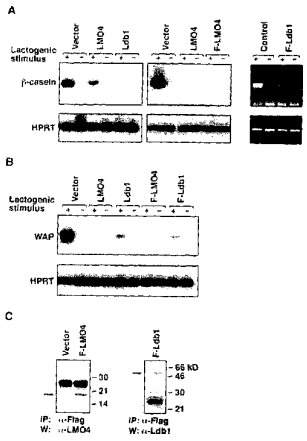

A
Lactogenic stimulus
Vector
LMO4
Ldb1
Vector
LMO4
F-LMO4
Control
F-Ldb1
β-casein
HPRT
B
Lactogenic stimulus
Vector
LMO4
Ldb1
F-LMO4
F-Ldb1
WAP
HPRT
C
Vector
F-LMO4
30
21
14
IP: α-Flag
W: α-LMO4
F-Ldb1
66 kD
46
30
21
IP: α-Flag
W: α-Ldb1

Figure 2

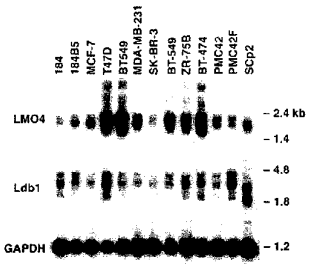

184
184B5
MCF-7
T47D
BT549
MDA-MB-231
SK-BR-3
BT-549
ZR-75B
BT-474
PMC42
PMC42F
SCp2
LMO4
Ldb1
GAPDH
– 2.4 kb
– 1.4
– 4.8
– 1.8
– 1.2

Figure 3

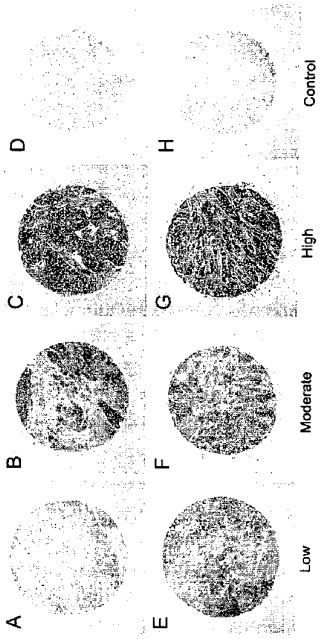


Figure 4

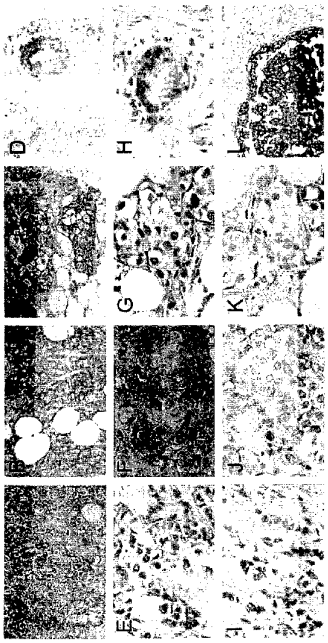


Figure 5

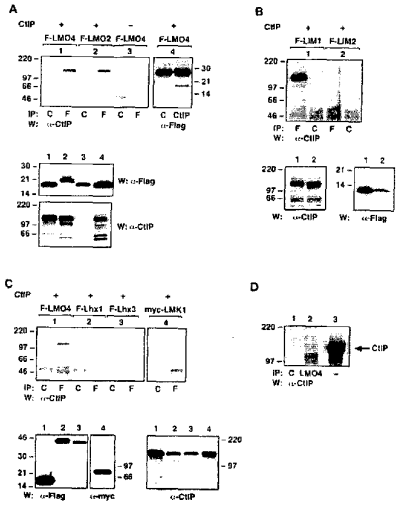
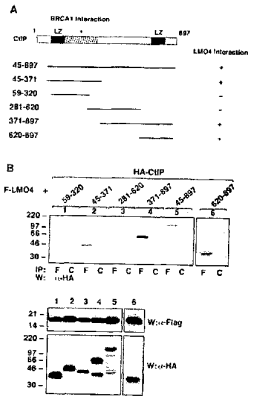

A
CtIP
F-LMO4 F-LMO2 F-LMO4 F-LMO4
IP: C F C F C F C CtIP
W: α-CtIP
α-Flag
W: α-Flag
W: α-CtIP
B
CtIP
F-LIM1 F-LIM2
IP: F C F C
W: α-CtIP
W: α-CtIP
W: α-Flag
C
CtIP
F-LMO4 F-Lhx1 F-Lhx3 myc-LMK1
IP: C F C F C F C F
W: α-CtIP
W: α-Flag
α-myc
α-CtIP
D
CtIP
IP: C LMO4 -
W: α-CtIP

Figure 6

Figure 7



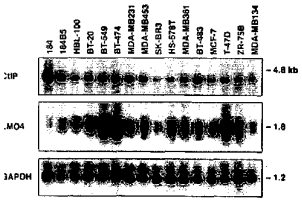
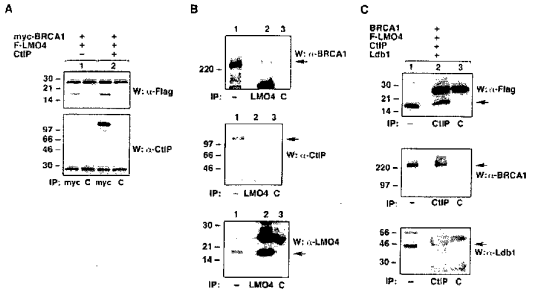


Figure 8

Figure 9



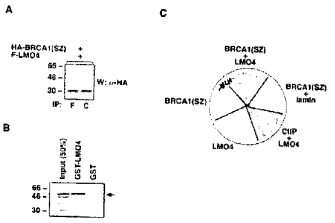


Figure 10

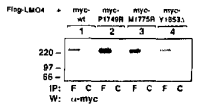


Figure 11

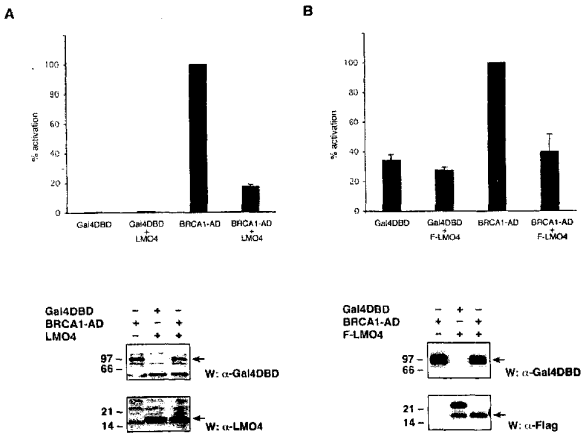


Figure 12

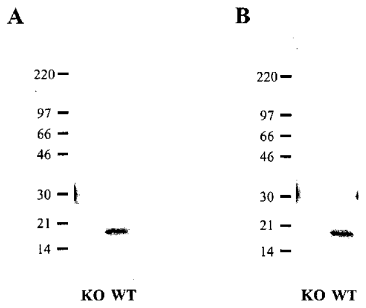
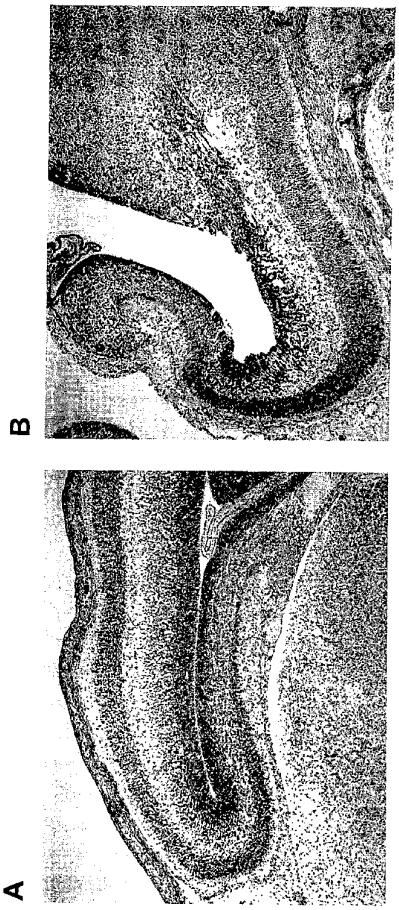


Figure 13

Figure 14

Figure 16



SEQUENCE LISTING

<110> THE WALTER AND ELIZA HALL INSTITUTE OF MEDICAL RESEARCH
VISVADER, JANE ELLEN
LINDEMAN, GEOFFREY JOHN
SUM, ELEANOR Y M
O'REILLY, LORRAINE ANN

<120> A METHOD OF DIAGNOSIS AND TREATMENT AND AGENTS USEFUL FOR SAME

<130> 2571611/TDO

<150> PR7618

<151> 2001-09-12

<160> 10

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1
<211> 25
<212> DNA
<213> synthetic

<400> 1
atgaaggtct tcatcctcgc ctgcc 25

<210> 2
<211> 26
<212> DNA
<213> synthetic

<400> 2
gctggaccag agactgagga aggtgc 26

<210> 3
<211> 24
<212> DNA
<213> synthetic

<400> 3
tagcagcaga ttgaaagcat tatg 24

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> synthetic

<400> 4
gacaccggta ccatgcgttg 20

<210> 5
<211> 35
<212> DNA
<213> synthetic

<400> 5
cgcggatccc cggctccctc tcctggaagc gctgc 35

<210> 6
<211> 33
<212> DNA
<213> synthetic

<400> 6
cgcggatcct cagcagacct tctggtctgc cag 33

<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> synthetic

<400> 7
cgcggatcct gaatccgggc agcagctcgc 30

<210> 8
<211> 36
<212> DNA
<213> synthetic

<400> 8
cgcggatcct cacccaaata acctaatgta gtcatt 36

<210> 9
<211> 34
<212> DNA
<213> synthetic

<400> 9
cgcggatccg gttatttggg aatagcggtg cttg 34

<210> 10
<211> 33
<212> DNA
<213> synthetic

<400> 10
cgcggatcct cagcagacct tctggtctgc cag 33

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

REVISED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
20 March 2003 (20.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/023404 A1

(51) International Patent Classification[7]: G01N 33/577, 33/574, C12Q 1/68, C07K 16/18, 16/46, C12N 05/12, A61K 39/395, 49/16, A61P 35/00

(21) International Application Number: PCT/AU02/01246

(22) International Filing Date:
12 September 2002 (12.09.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
PR 7618 12 September 2001 (12.09.2001) AU

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **THE WALTER AND ELIZA HALL INSTITUTE OF MEDICAL RESEARCH** [AU/AU]; Royal Parade, Parkville, Victoria 3052 (AU).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **VISVADER, Jane, Ellen** [AU/AU]; 12 Holroyd Street, Kew, Victoria 3101 (AU). **LINDEMAN, Geoffrey, John** [AU/AU]; 12 Holroyd Street, Kew, Victoria 3101 (AU). **SUM, Eleanor, Y., M.** [AU/AU]; 52A Carlisle Street, Preston, Victoria 3072 (AU). **O'REILLY, Lorraine, Ann** [GB/AU]; 20 Moonda Grove, Cheltenham, Victoria 3192 (AU).

(74) Agents: **OBRANOVICH, Tania, Daniela** et al.; Davies Collison Cave, 1 Little Collins Street, Melbourne, Victoria 3000 (AU).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, 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, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report*

(88) Date of publication of the revised international search report: 8 May 2003

(15) Information about Correction:
see PCT Gazette No. 19/2003 of 8 May 2003, Section II

[Continued on next page]

(54) Title: A METHOD OF DIAGNOSIS AND TREATMENT AND AGENTS USEFUL FOR SAME

(57) Abstract: The present invention relates generally to a method for detecting an aberrant cell, and more particularly an aberrant epithelial cell, in a subject or in a biological sample from said subject and agents useful for same. More particularly, the present invention relates to a method of deleting an aberrant mammary epithelial cell. The presence of the aberrant cell or group of aberrant cells provides an indication of a particular disease or condition or a propensity for development of a disease or condition. More particularly, the present invention contemplates a method for detecting a cell associated with breast cancer or having a propensity to develop into a breast cancer in a subject or in a biological sample from said subject by determining the relative increase in the presence of the LM04 protein or a related protein or a relative increase in LM04 activity or a relative increase in the presence of expression products from a gene encoding the LM04 protein or a related protein. The present invention further provides a method for diagnosing the presence of a cancer or cancerous-like growth, in particular breast cancer in a subject or in a biological sample from said subject by screening for up-regulation of LM04 or a related protein in a cell or group of cells or an up-regulation in the presence of expression products of genetic sequences encoding LM04 or a related protein. The present invention provides diagnostic agents useful for detecting LM04 or expression products of genetic material encoding LM04. Such diagnostic agents include immunointeractive molecules, such as antibodies, and genetic probes for detecting expression products of LM04 genes. The present invention further provides genetically modified animals exhibiting altered levels of LM04. Such animals are useful models for screening for anti-cancer agents. The present invention still further relates generally to a method of modulating LM04 related cellular proliferation and to agents useful for same. More particularly, the present invention contemplates a method of modulating breast cell proliferation by modulating LM04 nucleic acid expression and/or LM04 functioning. The method of the present invention is useful, *inter alia*, in the treatment and/or prophylaxis of conditions characterised by aberrant, unwanted or otherwise inappropriate LM04 regulated cellular proliferation. The present invention is further directed to methods for identifying and/or designing agents capable of modulating LM04 regulated cellular proliferation.

WO 03/023404 A1

WO 03/023404 A1

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU02/01246

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. [7]: G01N 33/577, 33/574; C12Q 12/168; C07K 16/18, 16/46; C12N 05/12; A61K 39/395, 49/16; A61P 35/00

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)
G01N 33/577, 33/574; C12Q 12/168; C07K 16/18, 16/46; C12N 05/12; A61K 39/395, 49/16; A61P 35/00

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)
WPAT; JAPIO; CAPlus; Medline (LMO4; LIM domain only; LIM only protein; neoplas+; cancer (melanoma; lymphoma; leukemia); antibod+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 2002/40716 A2 (CEMINES, LLC) 23 May 2002 Whole document, particularly pages 6, 11, 16, 21, 22 and 25.	1-9, 19, 22, 24-29, 33-38
P, X	Visvader, J. E. et al., (Dec 2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, vol. 98, pp. 14452-14457. "The LIM domain gene *LOM4* inhibits differentiation of mammary epithelial cells in vitro and is overexpressed in breast cancer". Whole document.	1-11, 18, 19, 22-30
X	Kenny, D. A. et al., (Sept 1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, vol. 95, pp. 11257-11262. "Identification and characterisation of LMO4, an LMO gene with a novel pattern of expression during embryogenesis". Whole document.	39, 46
A	Whole document.	1-38, 40-45, 47

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C [X] 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	Date of mailing of the international search report
14 November 2002	20 NOV 2002
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929	Authorized officer **JULIE GALE** Telephone No : (02) 6283 2272

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU02/01246

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Sugihara, T. M. et al., (Dec 1998) *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*, vol. 95, pp. 15418-15423. "Mouse deformed epidermal autoregulatory factor 1 recruits a LIM domain factor, LMO-4, and CLIM coregulators".	
X	Whole document.	39, 46
A	Whole document.	1-38, 40-45, 47
	Grutz, G. et al., (1998) *Oncogene*, vol. 17, pp. 2799-2803. "Identification of the *LMO4* gene encoding an interaction partner of the LIM-binding protein LDB1/NLI1: a candidate for displacement by LMO proteins in T cell acute leukemia".	
X	Whole document.	39, 46
A	Whole document.	1-38, 40-45, 47
	Tse, E. et al., (1999) *Mammalian Genome*, vol. 10, pp. 1089-1094. "Characterization of the *Lmo4* gene encoding a LIM-only protein: genomic organization and comparative chromosomal mapping".	
X	Whole document.	39, 46
A	Whole document.	1-38, 40-45, 47

Form PCT/ISA/210 (continuation of Box C) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/AU02/01246

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report	Patent Family Member
WO 02/40716	AU 26912/02

END OF ANNEX

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ　11/00	Ａ６１Ｐ　11/00		４Ｃ０８４
Ａ６１Ｐ　13/12	Ａ６１Ｐ　13/12		４Ｃ０８５
Ａ６１Ｐ　15/00	Ａ６１Ｐ　15/00		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｐ　17/00	Ａ６１Ｐ　17/00		
Ａ６１Ｐ　25/00	Ａ６１Ｐ　25/00		
Ａ６１Ｐ　27/02	Ａ６１Ｐ　27/02		
Ａ６１Ｐ　35/00	Ａ６１Ｐ　35/00		
Ａ６１Ｐ　35/02	Ａ６１Ｐ　35/02		
Ｃ０７Ｋ　16/18	Ｃ０７Ｋ　16/18		
Ｃ０７Ｋ　16/46	Ｃ０７Ｋ　16/46		
Ｃ１２Ｎ　5/10	Ｃ１２Ｑ　1/02		
Ｃ１２Ｎ　15/02	Ｃ１２Ｑ　1/68	Ａ	
Ｃ１２Ｎ　15/09	Ｇ０１Ｎ　33/15	Ｚ	
Ｃ１２Ｑ　1/02	Ｇ０１Ｎ　33/50	Ｚ	
Ｃ１２Ｑ　1/68	Ｃ１２Ｎ　15/00	Ａ	
Ｇ０１Ｎ　33/15	Ｃ１２Ｎ　15/00	Ｃ	
Ｇ０１Ｎ　33/50	Ｃ１２Ｎ　5/00	Ｂ	
// Ｃ１２Ｐ　21/08	Ｃ１２Ｐ　21/08		

(81)指定国　AP(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,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,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,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者　リンデマン　ジェフリー　ジョン
オーストラリア国　ビクトリア　キュー　ホルロイド　ストリート　１２
(72)発明者　サム　エリノア　ワイ.　エム.
オーストリア国　ビクトリア　プレストン　カーライル　ストリート　５２エー
(72)発明者　オーライリ　ロレイン　アン
オーストラリア国　ビクトリア　チェルトナム　ムーンダ　グローブ　２０

Ｆターム(参考) 2G045 AA26 AA40 BB20 CB01 DA12 DA13 DA14 DA36 DA37 DA78 FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 DA02 DA12 EA04 GA11 HA15
4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ79 QR36 QR40 QR48 QR51 QR77 QS33 QS34 QX02
4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA72X AA91Y AA93X AA93Y AB01 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA17 NA14 ZA021 ZA022 ZA331 ZA332 ZA511 ZA512 ZA591 ZA592 ZA661 ZA662 ZA811 ZA812 ZA891 ZA892 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZC611 ZC612
4C085 HH20 KA04 KA26 LL05 LL09 LL12 LL13 LL18
4H045 AA11 AA30 BA41 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74

【要約の続き】
よび／またはLM04の機能を調節することによって乳房細胞の増殖を調節する方法を考えている。本発明の方法は特に、異常な、不要なまたは別の様式で不適切なLM04調節性細胞増殖を特徴とする状態の治療および／または予防に有用

である。本発明はさらに、LMO4調節性細胞増殖を調節しうる作用物質を同定および／または設計するための方法を対象とする。

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2005502066A5	公开(公告)日	2006-04-27
申请号	JP2003527424	申请日	2002-09-12
申请(专利权)人(译)	沃尔特伊丽莎堂研究院医学研究		
[标]发明人	ビスベイダージェーンエレン リンデマンジェフリージョン サムエリノアワイエム オーライリロレインアン		
发明人	ビスベイダー ジェーン エレン リンデマン ジェフリー ジョン サム エリノア ワイ. エム. オーライリ ロレイン アン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K45/00 A61K49/00 A61P1/00 A61P7/00 A61P11/00 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P25/00 A61P27/02 A61P35/00 A61P35/02 C07K16/18 C07K16/46 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 C12N15/09 C12N15/02 C12N5/10 C12P21/08		
CPC分类号	A61P1/00 A61P11/00 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P25/00 A61P27/02 C07K16/30 C07K16/3015 G01N33/57415		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.Y A61K45/00 A61K49/00.A A61P1/00 A61P7/00 A61P11/00 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P25/00 A61P27/02 A61P35/00 A61P35/02 C07K16/18 C07K16/46 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z C12N15/00.A C12N15/00.C C12N5/00.B C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DA78 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR36 4B063/QR40 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA72X 4B065/AA91Y 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA021 4C084/ZA022 4C084/ZA331 4C084/ZA332 4C084/ZA511 4C084/ZA512 4C084/ZA591 4C084/ZA592 4C084/ZA661 4C084/ZA662 4C084/ZA811 4C084/ZA812 4C084/ZA891 4C084/ZA892 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZB271 4C084/ZB272 4C084/ZC611 4C084/ZC612 4C085/HH20 4C085/KA04 4C085/KA26 4C085/LL05 4C085/LL09 4C085/LL12 4C085/LL13 4C085/LL18 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	2001PR7618 2001-09-12 AU		
其他公开文献	JP4628674B2 JP2005502066A		

摘要(译)

本发明一般涉及用于检测异常细胞，更特别是异常上皮细胞的方法，并涉及用于受试者或来自所述受试者的生物样品中的试剂。更具体地说，本发明涉及检测异常乳房上皮细胞的方法。一组异常细胞或异常细胞的存在表明存在特定的疾病或病症或倾向于发展疾病或病症。更具体地说，本发明确定LM04蛋白或相关蛋白存在的相对增加，或LM04活性的相对增加，或编码LM04蛋白或相关蛋白的基因表达产物相对增加来自受试者的乳腺癌相关细胞或乳腺癌或来自所述受试者的生物样品我们正在考虑一种检测时髦细胞的方法。本发明进一步涉及筛选在单细胞或细胞组中LM04或相关蛋白质的上调或筛选编码LM04或相关蛋白质的基因序列的表达产物的存在上调的方法，提供了用于诊断生物样品中癌症或癌症样生长特别是乳腺癌的存在的方法。本发明提供了用于检测编码LM04或LM04的遗传物质的表达产物的诊断剂。这些诊断剂包括免疫相互作用分子，如抗体和用于检测LM04基因表达产物的基因探针。

本发明还提供了一种表现出LM 04水平变化的基因改造动物。这些动物是筛选抗癌剂的有用模型。本发明一般还涉及调节与LM04有关的细胞增殖的方法和对其有用的药剂。更具体地，本发明涉及通过调节LM04核酸表达和/或LM04功能来调节乳腺细胞增殖的方法。