

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4628674号
(P4628674)

(45) 発行日 平成23年2月9日(2011.2.9)

(24) 登録日 平成22年11月19日(2010.11.19)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	Z N A Y
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 49/00	(2006.01)	A 6 1 K 49/00	A
A 6 1 P 1/00	(2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 7/00	(2006.01)	A 6 1 P 7/00	

請求項の数 38 (全 64 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)
 (65) 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)
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2002/001246
 (87) 国際公開番号 W02003/023404
 (87) 国際公開日 平成15年3月20日(2003.3.20)
 審査請求日 平成17年9月12日(2005.9.12)
 (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)

(73) 特許権者 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
 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 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) 【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、該対象または生物試料からの乳房細胞または乳房細胞抽出物における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インビトロで決定するための方法であって、該対象または該対象からの生物試料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、正常乳房細胞と比較した複合体のレベルの高

10

20

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インビトロで決定するための方法であって、該対象または該対象からの生物試料からの乳房細胞または乳房細胞抽出物からmRNAを入手すること、ならびにmRNAを、LMO4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、ならびに続いて該mRNAのレベルを検出することを含み、正常乳房細胞と比較した該mRNA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】

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インビトロで決定するための方法であって、該対象または該対象からの生物試料からの乳房細胞または乳房細胞抽出物からmRNAを入手すること、cDNAを作製すること、ならびにcDNAを、LMO4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、ならびに続いて該cDNAのレベルを検出することを含み、正常乳房細胞と比較した該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 6】

異常細胞が新形成細胞である、請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7】

新形成細胞が乳癌を特徴づけるものである、請求項6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6記載の方法。

【請求項 9】

新形成細胞が乳房上皮細胞である、請求項6記載の方法。

【請求項 10】

ECACC受託番号03052001によって特定されるハイブリドーマ16H2またはその変異体もしくはバリエーションによって分泌されるモノクローナル抗体。

【請求項 11】

ECACC受託番号03052002によって特定されるハイブリドーマ20F8またはその変異体もしくはバリエーションによって分泌されるモノクローナル抗体。

【請求項 12】

ECACC受託番号03052001によって特定される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エーション。

【請求項 13】

ECACC受託番号03052002によって特定される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エーション。

【請求項 14】

免疫相互作用性分子が以下から選択されるものである、請求項1記載の方法：

(a) LMO4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；

(b) LMO4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モノクローナル抗体；

(c) ECACC受託番号03052001によって特定されるハイブリドーマ16H2またはその変異体もしくはバリエーションによって分泌されるモノクローナル抗体；および

(d) ECACC受託番号03052002によって特定されるハイブリドーマ20F8またはその変異体もしくはバリエーションによって分泌されるモノクローナル抗体。

【請求項 15】

LMO4を検出するためのアッセイ法であって、

(i) 請求項10または11記載のモノクローナル抗体を、LMO4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

10

20

30

40

50

(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16】

抗体が請求項10または11記載の抗体である、請求項3記載の方法。

【請求項17】

試料におけるLM04またはその断片、バリエーションもしくは誘導体を検出する方法であって、対象からの生物試料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、ならびに該抗体およびLM04またはその断片、バリエーションもしくは誘導体を含む複合体のレベルを正常乳房細胞と比較して検出することを含み、LM04のレベルが高いこと

10

【請求項18】

抗体が請求項10または11記載の抗体である、請求項17記載の方法。

【請求項19】

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、該対象または該対象からの生物試料からの乳房細胞または乳房細胞抽出物における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、正常乳房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20】

異常細胞が新形成細胞である、請求項19記載の方法。

20

【請求項21】

新形成細胞が乳癌を特徴づけるものである、請求項20記載の方法。

【請求項22】

新形成細胞が乳房細胞である、請求項20記載の方法。

【請求項23】

新形成細胞が乳房上皮細胞である、請求項20記載の方法。

【請求項24】

患者の乳房からの新形成細胞と疑われる細胞におけるLM04の相対レベルを、インビトロで定量的または半定量的に決定するための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。

30

【請求項25】

抗体が請求項10または11記載の抗体である、請求項24記載の使用。

【請求項26】

異常な、不要なまたは不適切なLM04調節性細胞増殖を調節する方法であって、乳房細胞を、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、該LM04の発現もしくは活性の、阻害または拮抗によって該細胞増殖が下方制御されるものであり、かつ該作用物質は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である、方法。

【請求項27】

免疫相互作用性分子が以下から選択されるものである、請求項26記載の方法：

(a) 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；

(b) 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モノクローナル抗体；

(c) ECACC受託番号03052001によって特定されるハイブリドーマ16H2またはその変異体もしくはバリエーションによって分泌されるモノクローナル抗体；および

(d) ECACC受託番号03052002によって特定されるハイブリドーマ20F8またはその変異体もしくはバリエーションによって分泌されるモノクローナル抗体。

40

【請求項28】

細胞が新形成細胞である、請求項26記載の方法。

50

【請求項 29】

新形成細胞が乳癌を特徴づけるものである、請求項 28 記載の方法。

【請求項 30】

新形成細胞が乳房細胞である、請求項 28 記載の方法。

【請求項 31】

新形成細胞が乳房上皮細胞である、請求項 28 記載の方法。

【請求項 32】

哺乳動物の乳房における、異常な、不要なまたは不適切な LMO4 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医薬品の製造における、LMO4 の発現または LMO4 の機能活性を調節することができる作用物質の使用であって、該医薬品は、LMO4 の発現または LMO4 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、該作用物質の有効量を哺乳動物に投与することを含む方法において用いられるものであり、ここで該 LMO4 の発現もしくは活性の、阻害または拮抗によって該細胞増殖が下方制御されるものであり、かつ該作用物質は 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である、使用。

10

【請求項 33】

哺乳動物の乳房における、異常な、不要なまたは不適切な LMO4 調節性細胞増殖を特徴とす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、該作用物質は LMO4 の発現または LMO4 の活性を調節するものであり、該 LMO4 の発現もしくは活性の、阻害または拮抗によって該細胞増殖が下方制御されるものであり、かつ該作用物質は 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である、使用。

20

【請求項 34】

免疫相互作用性分子が以下から選択されるものである、請求項 32 または 33 記載の使用：

(a) LMO4 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；

(b) LMO4 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モノクローナル抗体；

(c) ECACC 受託番号 03052001 によって特定されるハイブリドーマ 16H2 またはその変異体もしくはバリエーションによって分泌されるモノクローナル抗体；および

(d) ECACC 受託番号 03052002 によって特定されるハイブリドーマ 20F8 またはその変異体もしくはバリエーションによって分泌されるモノクローナル抗体。

30

【請求項 35】

細胞が新形成細胞である、請求項 32 または 33 記載の使用。

【請求項 36】

新形成細胞が乳癌を特徴づけるものである、請求項 35 記載の使用。

【請求項 37】

新形成細胞が乳房細胞である、請求項 35 記載の使用。

【請求項 38】

新形成細胞が乳房上皮細胞である、請求項 35 記載の使用。

【発明の詳細な説明】

40

【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、LMO4 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 LMO4 活性の相対的増加、または LMO4 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

50

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。

10

【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 proliferation)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】

20

【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)。

30

【0006】

LM0ファミリーは4つのメンバー(LM01~4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。LM02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)。LM03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LM04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LM0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)。LM04遺伝子は胚組織および成体組織と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、LM04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。LM04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。

40

【0007】

本発明に至る研究において、本発明者らはLM04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。LM04遺伝子は乳房上皮において発生段階に伴う調節を受

50

けており、LM04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、LM04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。

10

【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。

20

【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、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。

30

【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。

40

【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】

50

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

10

20

30

40

50

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、バリエーション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、バリエーション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。

10

【0025】

本発明のさらにもう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。

20

【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。

30

【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。

40

【0031】

本発明のさらにもう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。

50

【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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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見られる。

【0040】

50

「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エーションに対する言及と解釈される必要がある。「バリエーション」には、発生のいずれかの分化段階で上皮細胞の形態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持し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、

10

20

30

40

50

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。

10

【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。

20

【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一文脈で、前記乳房細胞のバリエーション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。

30

【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。

40

【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】

50

「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。

10

【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。

20

【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。

30

【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エーション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。イタリアック体の「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、イタリアック体でない「LM04」はLM04タンパク質に対する言及である。

40

【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

50

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）、脾臓性新形成（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）、脾臓性新形成（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

10

20

30

40

50

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同様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である。「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

10

20

30

40

50

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.XX0.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.XX0.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 (Kohler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

10

20

30

40

50

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、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、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エーションである。

【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

10

20

30

40

50

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変換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もよいが、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ころと考えられる。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変動ドメインの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由来する、抗体分子を考

10

【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鎖を架橋する、抗体フレームワーク領域の変動部分における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)。

20

【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。

30

【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、NH₂末端の変動領域遺伝子(約110アミノ酸)およびCOOH末端のまたは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(約330アミノ酸をコードする)によってコードされる。

40

【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、 γ 、 δ 、 ϵ 、 μ (IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄)、 κ 、 λ 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

50

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。

10

【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inker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inker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(Pluckthunら、1996)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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

。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。

10

【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NaBH₄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。

20

【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。

30

【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-ニトロベンジルプ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。

40

【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	Mgabv	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	10
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	20
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	30
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	40
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	Mgabv	
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	10
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	20
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	30
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	40
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	10
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 α -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-(<i>p</i> -ヒドロキシフェニル)グリシン	Nhtyr	
L- <i>t</i> -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	20
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- <i>t</i> -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	30
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	Nmhpe	40
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る。さらに、ペプチドを、例えばCおよびN-メチルアミノ酸の組み入れ、アミノ酸のC原子とC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。

10

【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

20

(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。

30

【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、これを通じ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、本発明のもう一つの局面は、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。

40

【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】

50

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。

10

【0127】

したがって、本発明は、試料におけるLM04またはその断片、バリエーション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、バリエーション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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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図相複合体に添加し、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。

10

【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：

20

- (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^{3+}) 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る。

30

【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、 α -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用いてもよい。

40

【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。

50

【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。

10

【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、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。

20

【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抽出物のノーザンプ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。

30

【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なオリゴヌクレオチドを用いて増幅し、増幅産物を得る。

40

【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

50

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

10

【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

20

【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

30

【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ェアと適合する形態にあってもよい。

40

【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

50

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。

10

【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】

20

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：

30

(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またはその誘導體、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。

40

【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、以上の箇所です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

50

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。

10

【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る、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。

20

【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りガンドは、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。

30

40

【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

50

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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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。

50

【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。

10

【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キスピボまたはインピ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。「エキスピボ」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ピボ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、細胞はインピボ（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ピボで適用することによって実現されることが考えられる。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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。

10

【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。

20

【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依りて決まる。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。

30

【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。

40

【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

50

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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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、パッカル錠剤、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

50

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0.1 μg ~ 2000mgの間の活性化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され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。

10

【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。

20

【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

30

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。

40

【0198】

50

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5 μ g/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 (10 μ g) 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 (5 μ g/ml)、ヒドロコルチゾン (1 μ g/ml) およびプロラクチン (5 μ g/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、 α -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)。 α -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、プロット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プロットし、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

10

20

30

40

50

免疫染色のために、組織アレイ (Clinomics) を、ラット抗LM04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)。LM04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ER (1D5)、抗PgR (636) および抗ErbB2 (いずれもDako)。

【 0 2 0 2 】

実施例2

LM04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。

【 0 2 0 3 】

実施例3

LM04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 κ -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 κ -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ECM上にプレーティングした。

【 0 2 0 4 】

Lmo4またはLdb1の過剰発現により、泌乳刺激処理時の κ -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、エンブ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 κ -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。

【 0 2 0 5 】

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エーションである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。

10

【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ル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(D CIS)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ル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)。

20

30

40

【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(ER)、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

50

32%、40%および30%であった。LM04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LM04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-LM04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LM04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。LM04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-pEF1 -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。LM04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-pEF1 -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O. Bernard氏に寄贈いただいた。マウスまたはヒトのLM04のコード領域に対応する完全長cDNAをFlag-pEF1 -puro発現ベクター中にクローニングし、0.7kbのマウスLM04 cDNA断片をpEF1 -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LM02 (pEF1 -Flag-LM02) 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-EF1 -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128~1863)はpCMV-Gal4b-BR-SZ (Yu, X., Wu, L.C., Bowcock, A.M., Aronheim, A.お

10

20

30

40

50

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Gal4DBD-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LM04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。

10

【0210】

酵母ツーハイブリッドスクリーニング

pGBT9-LM04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LM04 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-LM04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LM04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。

20

【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、4 μ gの各発現構築物および/またはエンブ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、1 μ g/mlロイペプチン、1 μ g/mlペプスタチン、1 μ g/mlアプロチニン) を含む全細胞可溶性バッファー (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、フィルターのプロットティングを行い、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。

30

40

【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LM04ウサギ抗血清またはラット抗LM04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

50

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

³⁵S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、³⁵S標識BRCA1-SZで感作させた可溶化物の10 μlアリコートおよび100 μl (GST-セファロースビーズの50%スラリー; Amersham Pharmacia) のGST-LM04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30 μl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。

10

【0215】

ノーザンプロット分析

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)。

20

【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、Yep 62 (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-LM04発現プラスミドまたはエンブ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。

30

【0217】

胚腎臓293T細胞に対して、指定されたプラスミド: 0.5 μgのpG5CAT (CLONTECH)、1 μgのpCMV-Gal4b-BRCA1-ADまたは1 μgのGal4b親ベクター、および2 μgのFlag-EF1α-LM04または2 μgのエンブ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LM04相互作用性タンパク質としての同定

40

本発明者らは、乳房上皮におけるLM04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LM04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

50

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クローンのシーケ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】

10

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)。

20

【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。

30

【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.

40

(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

50

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、LMO4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LMO4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、LMO4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)。

10

【 0 2 2 2 】

実施例9

LMO4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.,

20

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., Raymond, A. および Zervos, A. S. (1998) *Genomics* 51 (3), 351-8)。LMO4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-LMO4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-LMO4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LMO4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 (

30

40

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), 18541-9; Schaeper, 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

10

)。

【 0 2 2 3 】

実施例10

LMO4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

20

）、本発明者らはLMO4、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LMO4はいずれも、myc標識BRCA1、Flag標識LMO4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という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LMO4の免疫
 沈降に必要なではなかった。これらの結果から、LMO4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）。

30

【 0 2 2 4 】

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LMO4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LMO4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、LMO4を含
 まないものでは認識しなかった。内因性BRCA1は抗LMO4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、LMO4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LMO4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プロット法により、
 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LMO4抗体とのブ
 ロッティングでは予想された17kD LMO4タンパク質がみられた（図9B、下のパネル）。し
 たがって、LMO4、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

40

。

【 0 2 2 5 】

本発明者らは、LMO4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), 1541
 8-23; Grutz, G., Forster, A. および Rabbitts, T.H. (1998) *Oncogene* **17** (21), 2799-

50

803) 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、LMO4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LMO4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LMO4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(

10

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

20

)。本発明者らは、LMO4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LMO4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³⁵S-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-LMO4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LMO4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LMO4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-LMO4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)。LMO4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⁺-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LMO4およびCtIPとの直接的な結合を媒介する。

30

【0228】

実施例12

BRCA1における腫瘍由来の変異はLMO4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(Y1853)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-LMO4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LMO4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

40

50

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)と一緒にな 10
 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ブ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 20
 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 30
 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

10

20

30

40

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.

10

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, Heinzl, 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

20

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.

30

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

40

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

10

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

20

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.

30

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

40

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

10

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

20

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

30

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

40

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 10
- 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 20
- 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. 30
- 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., Segreaves, 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. 40
- 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.

10

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

20

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

30

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

40

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

10

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.

20

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

30

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

40

- 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 10
- 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 20
- 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 30
- 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 40

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

10

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】

【 0 2 3 3 】

【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ウ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。20 μg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エーション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。

20

【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α-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。α-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、プロット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)に示したものと同一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pty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抗体によるプロットングを行った。矢印は関連タンパク質を示している。

30

40

【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(3 μg)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を用いたインサイチュウ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

50

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。インサイチュール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プロット法を行った。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プロット分析により、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プロット法を行った。可溶化物のウエスタンプロット分析により、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抗体によるイムノプロット法を行った。可溶化物のウエスタンプロット分析により、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プロット法を行った。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-HA抗体を用いてウエスタンプロット法を行った。ウエスタンプロット分析により、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

10

20

30

40

50

ものおよびヒト乳癌細胞株から単離したポリ(A)⁺ RNA (3 μg) 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、その後抗Flagまたは抗CtIP抗体によるプロットティングを行った。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プロットティングを行った。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抗体によるイムノプロットティングを行った。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プロットティングも行った(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プロットティングを行った。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)。

10

20

【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³⁵S-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。-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-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。

30

【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抗体によるイムノプロットティングにより、LMO4とすべてのBRCA1誘導體との相互作用が明らかになった。

40

【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-G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5'上流に5つのGal結合部位を含むpG5CATレ

50

ポータープラスミドと、LM04発現構築物またはエンブ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LM04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LM04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。50 µgの各可溶化物をSDS-PAGEにかけ、抗LM04 mAB 20F8 (A) または16H2 (B) によるイムノブロットを行った。

10

【図14】e16.5齢の発生中のマウス脳におけるLM04の発現。ホルマリン固定した野生型 (A) およびLM04ノックアウト (B) 胚の切片に対する免疫染色を抗LM04 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LM04の発現。ホルマリン固定した野生型 (A) およびLM04ノックアウト (B) 胚の切片に対する免疫染色を抗LM04 mAB 16H2によって行った。

【配列表】

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

10

<130> 2571611/TDO

<150> PR7618

<151> 2001-09-12

<160> 10

<170> PatentIn version 3.0

20

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> synthetic

<400> 1

atgaaggtct tcatacctcgc ctgcc

25

<210> 2

30

<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 10
<211> 20
<212> DNA
<213> synthetic

<400> 4
gacaccggta ccatgcggtg 20

<210> 5
<211> 35 20
<212> DNA
<213> synthetic

<400> 5
cgcggatecc cggtccctc tctggaagc getgc 35

<210> 6
<211> 33
<212> DNA
<213> synthetic 30

<400> 6
cgcggatect 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 acctaata 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

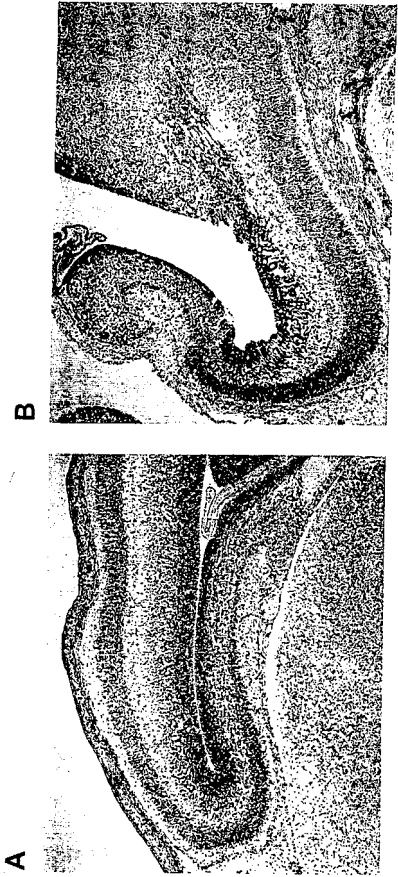
<400> 10
cgcggatcct cagcagacct tctggtctgc cag 33

10

20

30

【 図 15 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P	15/00	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	C 0 7 K	16/18	
C 0 7 K	16/46	(2006.01)	C 0 7 K	16/46	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 N	15/02	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	C
C 1 2 N	5/00	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	

- (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.
オーストラリア国 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

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 国際公開第01/038878(WO, A1)
国際公開第98/001460(WO, A1)
国際公開第99/049316(WO, A1)
J. Racevskis et al., Molecular cloning of LMO4, a new human LIM domain gene, *Biochimica et Biophysica Acta*, Elsevier Science B.V., 1999年 4月14日, Vol.1445, 148-153
T. M. Sugihara et al., Mouse Deformed epidermal autoregulatory factor 1 recruits a LIM domain factor, LMO-4, and CLIM coregulators, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 米国, The National Academy of Sciences, 1998年12月22日, Vol.95 No.26, 15418-15423

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/98
A61K 45/00
A61K 49/00
A61P 1/00
A61P 7/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	诊断和治疗方法以及对其有用的活性剂		
公开(公告)号	JP4628674B2	公开(公告)日	2011-02-09
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		
当前申请(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 C12N15/09 C12N15/02 C12N5 /00 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 C12P21/08 C07K16/30 C12N5/10 G01N33/574		
CPC分类号	A61P1/00 A61P7/00 A61P11/00 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P25/00 A61P27/02 A61P35/00 A61P35/02 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 C12N15/00.A C12N15/00.C C12N5/00 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z C12P21/08		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	2001PR7618 2001-09-12 AU		
其他公开文献	JP2005502066A5 JP2005502066A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明一般涉及检测异常细胞的方法，更具体地涉及受试者或来自所述受试者的生物样品中的异常上皮细胞，以及涉及其的有用药剂。更具体地，本发明涉及用于检测异常乳腺上皮细胞的方法。一组异常细胞或异常细胞的存在是存在特定疾病或病症或发展疾病或病症的倾向的指示。更具体地，本发明确定LM 04蛋白或相关蛋白的存在的相对增加，或LM 04活性的相对增加，或编码LM 04蛋白或相关蛋白的基因表达产物的相对增加。因此，考虑用于检测来自受试者或受试者的生物样品中与乳腺癌相关或倾向于发展成乳腺癌的细胞的方法。本发明进一步涉及筛选单细胞或细胞群中LM04或相关蛋白的上调，或上调编码LM04或相关蛋白的基因序列的表达产物的方法，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，以及对其有用的药剂。更具体地，本发明涉及通过调节LM04核

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

酸的表达和/或LM04的功能来调节乳腺细胞增殖的方法。本发明的方法特别适用于治疗和/或预防以异常，不需要或不合适的LM 04调节细胞增殖为特征的病症。本发明还涉及鉴定和/或设计能够调节LM04调节细胞增殖的试剂的方法。