

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780018381.4

[51] Int. Cl.

C07H 21/02 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/38 (2006.01)

C07K 1/00 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 6 月 3 日

[11] 公开号 CN 101448848A

[51] Int. Cl. (续)

C07K 17/00 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

[22] 申请日 2007.3.9

[21] 申请号 200780018381.4

[30] 优先权

[32] 2006.3.27 [33] US [31] 60/786,568

[86] 国际申请 PCT/US2007/063711 2007.3.9

[87] 国际公布 WO2007/133835 英 2007.11.22

[85] 进入国家阶段日期 2008.11.20

[71] 申请人 全球免疫股份有限公司

地址 美国科罗拉多州

[72] 发明人 郭志敏 鲁迎年 唐纳德·贝尔格劳
亚力克斯·弗兰泽索夫

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
代理人 封新琴

权利要求书 7 页 说明书 74 页 序列表 21 页
附图 5 页

[54] 发明名称

Ras 突变及其相关组合物和方法

[57] 摘要

所公开的是最近发现的 Ras 突变和突变组合，包含这些突变的蛋白质、肽和融合蛋白，编码这些蛋白质、肽和融合蛋白的核酸分子，以及与这些突变的用途有关的各种工具及诊断、治疗和筛选方法。

1. 一种分离的核酸分子，其包含编码如下氨基酸序列的核酸序列，所述氨基酸序列包含突变型Ras蛋白的至少5个连续氨基酸，其中所述氨基酸序列包含相对于野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的氨基酸第76位，且其中所述第76位氨基酸与野生型蛋白质相比是突变的。
2. 权利要求1的分离的核酸分子，其中所述第76位氨基酸从谷氨酸突变为非谷氨酸氨基酸残基，其选自甘氨酸、赖氨酸和谷氨酰胺。
3. 权利要求2的分离的核酸分子，其中所述非谷氨酸氨基酸残基是甘氨酸。
4. 权利要求1的分离的核酸分子，其中所述氨基酸序列通过非谷氨酸氨基酸替代SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13的第76位谷氨酸而不同于所述SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13之任一。
5. 权利要求1的分离的核酸分子，其中所述氨基酸序列进一步包含突变型Ras蛋白的至少5个连续氨基酸残基，其中所述氨基酸序列包含选自相对于野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的第12位、第13位、第59位和第61位的氨基酸位置，且其中所述位置的氨基酸与野生型蛋白质相比是突变的。
6. 权利要求1的分离的核酸分子，其中所述氨基酸序列进一步包含突变型Ras蛋白的至少5个连续氨基酸，其中所述氨基酸序列包含相对于野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的第12位氨基酸，且其中所述第12位氨基酸与野生型蛋白质相比是突变的。
7. 权利要求6的分离的核酸分子，其中所述第12位或第13位氨基酸从甘氨酸突变为非甘氨酸氨基酸残基。
8. 权利要求6的分离的核酸分子，其中所述第12位氨基酸从甘氨酸突变为非甘氨酸氨基酸残基。
9. 权利要求7或权利要求8的分离的核酸分子，其中所述非甘氨酸氨基酸残基选自缬氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸、精氨酸、丝氨酸和丙氨酸。
10. 权利要求1的分离的核酸分子，其中所述核酸分子编码包含两个或更多个结构域的融合蛋白，其中所述结构域之一包含突变型Ras蛋白的至少5

- 个氨基酸，其包含第76位突变，且其中每个别的结构域由免疫原组成。
11. 权利要求10的分离的核酸分子，其中所述免疫原是肿瘤抗原。
 12. 权利要求11的分离的核酸分子，其中所述肿瘤抗原是Ras蛋白或其免疫原性片段，其包含至少一处相对于野生型Ras氨基酸序列的突变。
 13. 权利要求12的分离的核酸分子，其中所述肿瘤抗原是Ras蛋白或其免疫原性片段，其包含相对于野生型Ras氨基酸序列的第12位或第13位，其中所述第12位或第13位氨基酸从甘氨酸残基突变为非甘氨酸残基。
 14. 权利要求10的分离的核酸分子，其中所述肿瘤抗原选自：
 - (a) 至少包含Ras蛋白从第8位至第16位的肽，其中相对于野生型Ras蛋白的第12位氨基酸残基是突变的；
 - (b) 至少包含Ras蛋白从第9位至第17位的肽，其中相对于野生型Ras蛋白的第13位氨基酸残基是突变的；
 - (c) 至少包含Ras蛋白从第55位至第63位的肽，其中相对于野生型Ras蛋白的第59位氨基酸残基是突变的；
 - (d) 至少包含Ras蛋白从第57位至第65位的肽，其中相对于野生型Ras蛋白第61位的氨基酸残基是突变的；
 - (e) 至少包含Ras蛋白从第69位至第77位的肽，其中相对于野生型Ras蛋白的第73位氨基酸残基是突变的；
 - (f) 至少包含Ras蛋白从第70位至第78位的肽，其中相对于野生型Ras蛋白的第74位氨基酸残基是突变的；
 - (g) 至少包含Ras蛋白从第71位至第79位的肽，其中相对于野生型Ras蛋白的第75位氨基酸残基是突变的；
 - (h) 至少包含Ras蛋白从第73位至第81位的肽，其中相对于野生型Ras蛋白的第77位氨基酸残基是突变的；和
 - (i) 至少包含Ras蛋白从第74位至第82位的肽，其中相对于野生型Ras蛋白的第78位氨基酸残基是突变的。
 15. 权利要求1的分离的核酸分子，其中所述核酸序列编码融合蛋白，其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。
 16. 权利要求1的分离的核酸分子，其中所述核酸序列编码融合蛋白，其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。
 17. 一种分离的核酸分子，其与权利要求1至16中任一项的核酸序列完全互

补。

18. 权利要求1至17中任一项的分离的核酸分子，其中所述核酸分子是寡核苷酸探针或引物。
19. 一种重组核酸分子，其包含权利要求1至16中任一项的分离的核酸分子，其可操作连接至至少一种表达控制序列。
20. 一种重组细胞，其已经用权利要求19的重组核酸分子转染。
21. 权利要求20的重组细胞，其中所述细胞是酵母。
22. 一种分离的蛋白质或肽，其由权利要求1至16中任一项的分离的核酸分子所编码。
23. 权利要求22的分离的蛋白质或肽，其中所述分离的蛋白质或肽是融合蛋白的一部分。
24. 一种疫苗，其包含权利要求1至16中任一项的核酸分子。
25. 一种疫苗，其包含权利要求22的蛋白质或肽。
26. 权利要求25的疫苗，其中所述疫苗进一步包含酵母媒介。
27. 权利要求26的疫苗，其中所述酵母媒介重组表达所述蛋白质或肽。
28. 权利要求26的疫苗，其中所述疫苗进一步包含树突细胞，其中所述树突细胞已经胞内加载了所述酵母媒介和所述蛋白质或肽。
29. 一种疫苗，其包含：
 - a) 酵母媒介；和
 - b) 融合蛋白，其包含突变型Ras蛋白或其片段，其中所述蛋白质或其片段包含相对于野生型K-ras、N-ras或H-Ras蛋白的氨基酸第76位，且其中所述第76位氨基酸与野生型蛋白质相比是突变的，其中所述融合蛋白的表达在*Cup1*启动子的控制下；
其中所述融合蛋白由所述酵母媒介所表达。
30. 权利要求29的疫苗，其中所述融合蛋白进一步包含第二突变型Ras蛋白或其片段，其中所述第二蛋白质或其片段包含相对于野生型K-ras、N-ras或H-Ras蛋白的氨基酸第12位，且其中所述第12位氨基酸与野生型蛋白质相比是突变的。
31. 权利要求29的疫苗，其中所述融合蛋白包含以符合读码框方式融合的下列蛋白质或片段：
 - i) 突变型Ras蛋白或其片段，其中所述蛋白质或片段包含相对于野生型

- K-ras、N-ras或H-ras蛋白的氨基酸第12位，且其中用半胱氨酸替代第12位甘氨酸；
- ii) 突变型Ras蛋白或其片段，其中所述蛋白质或片段包含相对于野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的氨基酸第61位，且其中用精氨酸替代第61位谷氨酰胺；
- iii) 突变型Ras蛋白或其片段，其中所述蛋白质或片段包含相对于野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的氨基酸第12位，且其中用天冬氨酸替代第12位甘氨酸；
- iv) 突变型Ras蛋白或其片段，其中所述蛋白质或片段包含相对于野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的氨基酸第12位，且其中用缬氨酸替代第12位甘氨酸；
- v) 突变型Ras蛋白或其片段，其中所述蛋白质或片段包含相对于野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的氨基酸第12位，且其中用精氨酸替代第12位甘氨酸；和
- vi) 突变型Ras蛋白或其片段，其中所述蛋白质或片段包含相对于野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的氨基酸第76位，且其中用甘氨酸替代第76位谷氨酸。
32. 权利要求29的疫苗，其中所述融合蛋白包含以符合读码框方式融合的下述蛋白质或片段：
- i) 突变型Ras蛋白或其片段，其中所述蛋白质或片段包含相对于野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的氨基酸第12位，且其中用精氨酸替代第12位甘氨酸；
- ii) 突变型Ras蛋白或其片段，其中所述蛋白质或片段包含相对于野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的氨基酸第76位，且其中用甘氨酸替代第76位谷氨酸。
33. 权利要求29的疫苗，其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。
34. 权利要求29的疫苗，其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。
35. 一种抗体或其抗原结合片段，其选择性结合权利要求22的分离的蛋白质或肽。

36. 一种适体，其选择性结合权利要求22的分离的蛋白质或肽。
37. 一种siRNA分子，其催化由权利要求1-16中任一项的所述核酸分子所转录的RNA或由编码突变型Ras蛋白的*ras*基因所转录的RNA的选择性切割，其中所述突变型Ras蛋白包含如下氨基酸序列，其至少通过相对于野生型氨基酸序列的第76位突变而不同于野生型K-ras、N-ras或H-ras氨基酸序列。
38. 一种核酶，其选择性催化权利要求1-16中任一项的核酸分子或编码突变型Ras蛋白的*ras*基因的失活，其中所述突变型Ras蛋白包含如下氨基酸序列，其至少通过相对于野生型氨基酸序列的第76位突变而不同于野生型K-ras、N-ras或H-ras氨基酸序列。
39. 一种反义核酸分子，其在很高的严格条件下与权利要求1-16中任一项的核酸分子或编码突变型Ras蛋白的*ras*基因杂交并抑制权利要求1-16中任一项的核酸分子或编码突变型Ras蛋白的*ras*基因的表达，其中所述突变型Ras蛋白包含如下氨基酸序列，其至少通过相对于野生型氨基酸序列的第76位突变而不同于野生型K-ras、N-ras或H-ras氨基酸序列。
40. 权利要求1-16中任一项的核酸分子或权利要求22或23的蛋白质或肽在制备用于预防或治疗癌症的组合物中的用途。
41. 权利要求24-34中任一项的疫苗在制备用于预防或治疗癌症的药物中的用途。
42. 权利要求36的适体、权利要求27的siRNA、权利要求38的核酶或权利要求39的反义核酸分子在制备用于预防或治疗癌症的药物中的用途。
43. 一种预防或治疗癌症的方法，其包括给具有癌症或有风险形成癌症的动物施用依照权利要求24至34中任一项的疫苗。
44. 一种预防或治疗癌症的方法，其包括给具有癌症或有风险形成癌症的动物施用权利要求36的适体、权利要求27的siRNA、权利要求38的核酶或权利要求39的反义核酸分子。
45. 一种预防或治疗癌症的方法，其包括给具有癌症或有风险形成癌症的动物施用抑制突变型Ras蛋白表达的化合物，其中所述突变型Ras蛋白包含如下氨基酸序列，其至少通过相对于野生型氨基酸序列的第76位突变而不同于野生型K-ras、N-ras或H-ras氨基酸序列。
46. 一种预防或治疗癌症的方法，其包括给具有癌症或有风险形成癌症的动

- 物施用启动或触发突变型Ras蛋白的GTP水解的化合物，其中所述突变型Ras蛋白包含如下氨基酸序列，其至少通过相对于野生型氨基酸序列的第76位突变而不同于野生型K-ras、N-ras或H-ras氨基酸序列。
47. 一种用于诊断肿瘤的方法，其包括在来自待诊断患者的测试样品中检测突变型Ras蛋白或编码所述Ras蛋白的核酸序列的表达或活性，其中所述Ras蛋白包含相对于野生型Ras氨基酸序列的第76位突变；其中在所述测试样品中检测出所述突变型Ras蛋白或编码所述Ras蛋白的核酸序列表明在所述测试样品中存在肿瘤细胞或其可能性。
48. 权利要求47的方法，其中所述Ras蛋白包含甘氨酸对野生型蛋白质第76位谷氨酸的替代。
49. 权利要求47的方法，其中所述方法进一步包括检测所述Ras蛋白是否还包含相对于野生型Ras氨基酸序列的第12位突变，其中检测出第76位和第12位突变表明在所述测试样品中存在肿瘤细胞或其可能性，并进一步表明与携带在这些位置上仅具有一处突变或没有突变的Ras蛋白的肿瘤细胞相比该患者的肿瘤更具攻击性。
50. 权利要求47的方法，其中所述检测步骤包括在所述测试样品中检测编码所述Ras突变的核酸序列。
51. 权利要求50的方法，其中所述检测步骤包括PCR扩增编码所述突变的基因组DNA模板或者原位PCR扩增编码所述突变的DNA序列。
52. 权利要求50的方法，其中所述检测步骤是通过选自下组的方法进行的：聚合酶链式反应（PCR）、逆转录酶-PCR（RT-PCR）、原位杂交、Northern印迹、序列分析、基因微阵列分析和报告基因检测。
53. 权利要求47的方法，其中如下测定编码所述突变型Ras蛋白的核酸序列的水平：使分离自所述测试样品的核酸与选择性结合编码所述突变型Ras蛋白的核酸序列的引物或探针接触，并检测编码所述突变型Ras蛋白的核酸序列是否受到所述引物或探针的结合。
54. 权利要求47的方法，其中如下测定突变型Ras蛋白的水平：使所述测试样品与选择性且特异性结合所述突变型Ras蛋白的抗体或其片段或适体接触，并检测所述抗体或其片段或适体是否已结合至所述突变型Ras蛋白。
55. 权利要求47的方法，其中所述测试样品来自正在诊断癌症的患者，且其

- 中将所述测试样品与阴性对照样品进行比较。
56. 权利要求47的方法，其中将所述测试样品固定化在片基上。
57. 权利要求47的方法，其中所述方法用于诊断患者的癌症。
58. 权利要求47的方法，其中所述方法用于确定患者的癌症的预后。
59. 权利要求47的方法，其中所述方法用于确定患者对治疗性处理的易感性。
60. 一种鉴定用于预防或治疗癌症的化合物的方法，其包括鉴定靶物Ras蛋白或编码所述靶物Ras蛋白的核酸分子的抑制剂，其中所述靶物Ras蛋白包含相对于野生型Ras蛋白的第76位突变。
61. 权利要求60的方法，其中所述突变是选自甘氨酸、赖氨酸和谷氨酰胺的非谷氨酸氨基酸对野生型蛋白质第76位谷氨酸的替代。
62. 权利要求60的方法，其中所述鉴定步骤包括鉴定所述靶物Ras蛋白的表达或活性的抑制剂。
63. 权利要求62的方法，其中所述检测步骤选自：在假定的调节性化合物存在时检测所述靶物Ras蛋白的翻译或活性；和在假定的调节性化合物存在时检测编码所述靶物Ras蛋白的基因的表达。
64. 权利要求62的方法，其包括下列步骤：
- a) 使宿主细胞与假定的调节性化合物接触，其中所述宿主细胞表达所述靶物Ras蛋白或其生物学活性片段，并
 - b) 检测所述假定的调节性化合物是否触发所述靶物Ras蛋白或其生物学活性片段的GTP水解，其中假定的调节性化合物与不存在所述化合物时相比触发所述靶物Ras蛋白的GTP水解表明它是用于预防或治疗癌症的候选化合物。
65. 权利要求64的方法，其中所述宿主细胞是肿瘤细胞系。
66. 一种鉴定用于预防或治疗癌症的化合物的方法，其包括鉴定在表达靶物突变型Ras蛋白的细胞中但不在表达野生型Ras蛋白的细胞中触发GTP水解的化合物，其中所述靶物突变型Ras蛋白包含相对于野生型Ras蛋白的第76位突变。
67. 权利要求60至66中任一项的方法，其中所述假定的调节性化合物选自：适体、siRNA分子、反义核酸分子、核酶、抗体或其抗原结合片段、构象拮抗剂和小分子抑制剂。

Ras突变及其相关组合物和方法

发明背景

瘤形成，或者说导致新的异常生长的快速细胞增殖过程，是许多疾病的特征，这些疾病可以是严重的，有时是危及生命的。典型地，细胞和组织的肿瘤学生长的特征在于比细胞正常增殖快，其中细胞即使在不再存在激引性因子（例如肿瘤促进剂、致癌原、病毒）后仍继续生长。细胞生长趋于显示缺乏结构性组织(organization)和/或与正常组织的协调，并且通常产生可以是良性或恶性的组织块（例如肿瘤）。

Ras突变在人、小鼠、大鼠和仓鼠的肺腺癌中是常见的。事实上，*ras*原癌基因家族中的突变是人癌症中和实验动物肿瘤中最常见的癌基因相关突变。已知在*ras*基因家族的癌基因中有数种不同突变与肿瘤细胞表型本质上可能有关联。在78%的胰腺癌、34%的结肠直肠癌、40%的非小细胞肺腺癌、和24%的卵巢癌中发现编码Ras蛋白质第12位氨基酸的密码子的突变。还在多种癌症中发现第13位、第59位和第61位氨基酸的Ras突变（例如参见Lu等, *Cancer Res* 2004 Aug 1, 64(15):5084-8; Abrams等, *Sem Oncol* 1996, 23:118-134; Friday和Adjei, *Biochim Biophys Acta* 2005, 1756:127-144）。经由Ras癌基因产物途径的异常信号传导在不受控制的细胞增殖和肿瘤发生中发挥重要作用。这些充分表征的第12位、第13位和第61位密码子突变引起组成性Ras活化。

恶性细胞生长或者说是恶性肿瘤是全世界死亡的最主要原因，而针对肿瘤性疾病开发有效疗法是大量研究的主题。虽然已提议多种创新性方法来治疗和预防癌症，但是许多癌症继续引起高死亡率，而且可能难以治疗或者对常规疗法相对无响应。因此，本领域不断需要鉴定用于癌症早期诊断和治疗的别的癌症风险因子和方法。

附图简述

图1是显示Ras突变种类的柱状图，所述Ras突变是通过对来自患有结肠直肠癌、胰腺癌或非小细胞肺癌的患者的肿瘤测定基因型而找到的。

图2A和2B是细胞生长的软琼脂测定法的数字图像，显示了软琼脂中的

例示性的阴性(图2A, 未转染的BALB/3T3小鼠细胞)和阳性(图2B, 经G12V + E76G Ras转染的BALB/3T3小鼠细胞克隆)集落形成。癌症(“经转化的”)上皮细胞能够在软琼脂中生长, 而未转化的细胞在软琼脂中不生长。

图3A和3B是显示两个独立实验的曲线图, 证明了在第12位和第76位密码子都携带Ras突变的肿瘤在Balb/c裸鼠中生长的致癌协同作用。

图3C是图3A的研究的延伸详情, 显示了各个经E76突变体转染的细胞相对于未转染的(野生型)BALB/3T3细胞的生长。

图4是说明晶体结构的示意图, 所述晶体结构来自相比较的H-Ras第12位密码子突变形式(G12D)(左侧)和H-Ras第61位密码子突变形式(Q61L)(右侧)。箭头指向所示三级结构中第12位、第61位和第76位氨基酸的估计位置。

发明概述

本发明的一个实施方案涉及一种分离的核酸分子, 其包含编码如下氨基酸序列的核酸序列, 所述氨基酸序列包含突变型Ras蛋白的至少5个连续氨基酸。所述氨基酸序列包含相对于野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的氨基酸第76位, 且其中所述第76位氨基酸与野生型蛋白质相比是突变的。在一方面中, 将第76位氨基酸从谷氨酸突变成选自甘氨酸、赖氨酸和谷氨酰胺的非谷氨酸氨基酸残基。在一方面中, 所述非谷氨酸氨基酸残基是甘氨酸。在一方面中, 所述氨基酸序列通过非谷氨酸氨基酸替代SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11或 SEQ ID NO:13的第76位谷氨酸而不同于所述SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11或 SEQ ID NO:13之任一。在一方面中, 所述氨基酸序列进一步包含突变型Ras蛋白的至少5个连续氨基酸残基, 其中所述氨基酸序列包含选自相对于野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的第12位、第13位、第59位和第61位的氨基酸位置, 且其中所述位置的氨基酸与野生型蛋白质相比是突变的。

在这种实施方案的一方面中, 所述氨基酸序列进一步包含突变型Ras蛋白的至少5个连续氨基酸, 其中所述氨基酸序列包含相对于野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的第12位氨基酸, 且其中所述第12位氨基酸与野生型蛋白质相比是突变的。在一方面中, 所述第12位或第13位氨基酸从甘氨酸突变成非甘氨酸氨基酸残基。在一方面中, 所述非甘氨酸氨基酸残基选自缬氨酸、

半胱氨酸、天冬氨酸、精氨酸、丝氨酸和丙氨酸。

在这种实施方案的另一方面中，所述核酸序列编码包含两个或更多个结构域的融合蛋白，其中所述结构域之一包含突变型Ras蛋白的至少5个氨基酸，其包含第76位突变，且其中每个别的结构域由免疫原组成。在一方面中，所述免疫原是肿瘤抗原。在一方面中，所述肿瘤抗原是Ras蛋白或其免疫原性片段，其包含至少一处相对于野生型Ras氨基酸序列的突变。在一方面中，所述肿瘤抗原是Ras蛋白或其免疫原性片段，其包含相对于野生型Ras氨基酸序列的第12位或第13位，其中所述第12位或第13位氨基酸从甘氨酸残基突变成非甘氨酸残基。在另一方面中，所述肿瘤抗原选自：(a)至少包含Ras蛋白从第8位至第16位的肽，其中相对于野生型Ras蛋白的第12位氨基酸残基是突变的；(b)至少包含Ras蛋白从第9位至第17位的肽，其中相对于野生型Ras蛋白的第13位氨基酸残基是突变的；(c)至少包含Ras蛋白从第55位至第63位的肽，其中相对于野生型Ras蛋白的第59位氨基酸残基是突变的；(d)至少包含Ras蛋白从第57位至第65位的肽，其中相对于野生型Ras蛋白第61位的氨基酸残基是突变的；(e)至少包含Ras蛋白从第69位至第77位的肽，其中相对于野生型Ras蛋白的第73位氨基酸残基是突变的；(f)至少包含Ras蛋白从第70位至第78位的肽，其中相对于野生型Ras蛋白的第74位氨基酸残基是突变的；(g)至少包含Ras蛋白从第71位至第79位的肽，其中相对于野生型Ras蛋白的第75位氨基酸残基是突变的；(h)至少包含Ras蛋白从第73位至第81位的肽，其中相对于野生型Ras蛋白的第77位氨基酸残基是突变的；和(i)至少包含Ras蛋白从第74位至第82位的肽，其中相对于野生型Ras蛋白的第78位氨基酸残基是突变的。

在这种实施方案的一方面中，所述核酸序列编码包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的融合蛋白。在另一方面中，所述核酸序列编码包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的融合蛋白。

本发明的另一个实施方案涉及一种分离的核酸分子，其包含编码Ras (H-Ras、N-Ras或K-Ras)的至少5个连续氨基酸的核酸序列，其中Ras氨基酸序列的第73位脯氨酸(P73)、第74位苏氨酸(T74)、第75位甘氨酸(G75)、第77位甘氨酸(G77)和/或第78位苯丙氨酸(F78)是突变的。本发明还涵盖编码任何如下Ras片段的核酸分子，所述Ras片段包含这些突变中的任何一个或多个，这种核酸分子在任何筛选、诊断或治疗应用中是有用的。优选地，

这些位置的任何一个或多个的氨基酸用与Ras野生型序列此位置存在的氨基酸不同的氨基酸来替代。

在另一个实施方案中,本发明提供了包含编码如下Ras蛋白(或其部分)的核酸序列(H-ras、N-ras或K-ras)的分离的核酸分子,所述Ras蛋白包含第59位、第61位、第73位、第74位、第75位、第76位、第77位或第78位突变的任何一个或多个,以及Ras的不同位置的一个或多个别的突变。优选的突变组合是G12突变和/或G13突变与第59位、第61位、第73位、第74位、第75位、第76位、第77位或第78位突变中的任何一个或多个。在另一个实施方案中,本发明提供了不同核酸分子的组合,其中至少一种核酸分子编码如下Ras(或其部分),其包含在选自第59位、第61位、第73位、第74位、第75位、第76位、第77位或第78位的位置(优先选自第73-78位的任何一个)的一个或多个突变,而一种或多种别的核酸分子包含一个或多个别的突变,包括但不限于G12突变和G13突变。

在本发明的一个实施方案中,任何上述核酸分子可以是寡核苷酸探针或引物。

本发明的另一个实施方案涉及重组核酸分子,其包含可操作连接指至少一种表达控制序列的任何上述核酸分子。

本发明的又一个实施方案涉及重组细胞,其已经用任何上述重组核酸分子转染。在一方面中,权利要求20的重组细胞,其中所述细胞是酵母。

本发明的另一个实施方案涉及分离的蛋白质或肽,其由任何上述核酸分子的分离的核酸分子所编码。在一个实施方案中,所述分离的蛋白质或肽是融合蛋白的一部分。

本发明的另一个实施方案涉及分离的核酸分子,其与任何上述核酸序列完全互补。

本发明的又一个实施方案涉及疫苗,其包含任何上述核酸分子。

本发明的另一个实施方案涉及疫苗,其包含任何上述蛋白质或肽。在一方面中,所述疫苗进一步包含酵母媒介。在另一方面中,所述酵母媒介重组表达所述蛋白质或肽。在一方面中,所述疫苗进一步包含树突细胞,其中所述树突细胞已经胞内加载了所述酵母媒介和所述蛋白质或肽。

本发明的又一个实施方案涉及疫苗,其包含:(a)酵母媒介;和(b)融合蛋白,其包含突变型Ras蛋白或其片段,其中所述蛋白质或其片段包含

相对于野生型K-ras、N-ras或H-Ras蛋白的氨基酸第76位，且其中所述第76位氨基酸与野生型蛋白质相比是突变的，其中所述融合蛋白的表达在*Cup1*启动子的控制下。所述融合蛋白由所述酵母媒介所表达。在一方面中，所述融合蛋白进一步包含第二突变型Ras蛋白或其片段，其中所述第二蛋白质或其片段包含相对于野生型K-ras、N-ras或H-Ras蛋白的氨基酸第12位，且其中所述第12位氨基酸与野生型蛋白质相比是突变的。

在一方面中，所述融合蛋白包含以符合读码框方式融合的下列蛋白质或片段：(i) 突变型Ras蛋白或其片段，其中所述蛋白质或片段包含相对于野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的氨基酸第12位，且其中用半胱氨酸替代第12位甘氨酸；(ii) 突变型Ras蛋白或其片段，其中所述蛋白质或片段包含相对于野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的氨基酸第61位，且其中用精氨酸替代第61位谷氨酰胺；(iii) 突变型Ras蛋白或其片段，其中所述蛋白质或片段包含相对于野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的氨基酸第12位，且其中用天冬氨酸替代第12位甘氨酸；(iv) 突变型Ras蛋白或其片段，其中所述蛋白质或片段包含相对于野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的氨基酸第12位，且其中用缬氨酸替代第12位甘氨酸；(v) 突变型Ras蛋白或其片段，其中所述蛋白质或片段包含相对于野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的氨基酸第12位，且其中用精氨酸替代第12位甘氨酸；和(vi) 突变型Ras蛋白或其片段，其中所述蛋白质或片段包含相对于野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的氨基酸第76位，且其中用甘氨酸替代第76位谷氨酸。

在一方面中，所述融合蛋白包含以符合读码框方式融合的下列蛋白质或片段：(i) 突变型Ras蛋白或其片段，其中所述蛋白质或片段包含相对于野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的氨基酸第12位，且其中用精氨酸替代第12位甘氨酸；和(ii) 突变型Ras蛋白或其片段，其中所述蛋白质或片段包含相对于野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的氨基酸第76位，且其中用甘氨酸替代第76位谷氨酸。

在一方面中，所述融合蛋白包含氨基酸序列SEQ ID NO:14。在另一方面中，所述融合蛋白包含氨基酸序列SEQ ID NO:15。

本发明的又一个实施方案涉及抗体或其抗原结合片段，其选择性结合任何一种上述突变型Ras蛋白或肽。

本发明的另一个实施方案涉及适体，其选择性结合任何一种上述突变型

Ras蛋白或肽。

本发明的又一个实施方案涉及siRNA分子，其催化选择性切割由任何上述核酸分子转录的RNA或由编码任何上述突变型Ras蛋白的*ras*基因转录的RNA，特别是包含如下氨基酸序列的突变型Ras蛋白，所述氨基酸序列至少通过相对于野生型氨基酸序列的第76位突变而不同于野生型K-ras、N-ras或H-ras氨基酸序列。

本发明的另一个实施方案涉及核酶，其选择性催化任何上述核酸分子或编码任何上述突变型Ras蛋白的*ras*基因的失活，特别是包含如下氨基酸序列的突变型Ras蛋白，所述氨基酸序列至少通过相对于野生型氨基酸序列的第76位突变而不同于野生型K-ras、N-ras或H-ras氨基酸序列。

本发明的又一个实施方案涉及反义核酸分子，其在非常高的严格条件下与任何上述核酸分子或编码任何上述突变型Ras蛋白的*ras*基因杂交并抑制任何上述核酸分子或编码任何上述突变型Ras蛋白的*ras*基因的表达，特别是包含如下氨基酸序列的突变型Ras蛋白，所述氨基酸序列至少通过相对于野生型氨基酸序列的第76位突变而不同于野生型K-ras、N-ras或H-ras氨基酸序列。

本发明的另一个实施方案涉及任何上述核酸分子或任何上述蛋白质或肽在制备用于预防或治疗癌症的组合物中的用途。

本发明的另一个实施方案涉及任何上述疫苗在制备用于预防或治疗癌症的药物中的用途。

本发明的另一个实施方案涉及任何上述适体、任何上述siRNA、任何上述核酶或任何上述反义核酸分子在制备用于预防或治疗癌症的药物中的用途。

本发明的又一个实施方案涉及预防或治疗癌症的方法，其包括给具有癌症或有风险形成癌症的动物施用任何上述疫苗。

本发明的另一个实施方案涉及预防或治疗癌症的方法，其包括给具有癌症或有风险形成癌症的动物施用任何上述适体、任何上述siRNA、任何上述核酶或任何上述反义核酸分子。

本发明的另一个实施方案涉及预防或治疗癌症的方法，其包括给具有癌症或有风险形成癌症的动物施用抑制突变型Ras蛋白表达的化合物，其中所述突变型Ras蛋白包含如下氨基酸序列，其至少通过相对于野生型氨基酸序列的第76位突变而不同于野生型K-ras、N-ras或H-ras氨基酸序列。

本发明的又一个实施方案涉及预防或治疗癌症的方法，其包括给具有癌症或有风险形成癌症的动物施用启动或触发突变型Ras蛋白的GTP水解的化合物，其中所述突变型Ras蛋白包含如下氨基酸序列，其至少通过相对于野生型氨基酸序列的第76位突变而不同于野生型K-ras、N-ras或H-ras氨基酸序列。

本发明的另一个实施方案涉及诊断肿瘤的方法，其包括在来自待诊断患者的测试样品中检测突变型Ras蛋白或编码所述Ras蛋白的核酸序列的表达或活性，其中所述Ras蛋白包含相对于野生型Ras氨基酸序列的第76位突变。在测试样品中检测出所述突变型Ras蛋白或编码所述Ras蛋白的核酸序列表明所述测试样品中存在肿瘤细胞或其可能性。在一方面中，所述Ras蛋白包含甘氨酸对野生型蛋白质第76位谷氨酸的替代。在一方面中，所述方法进一步包括检测所述Ras蛋白是否还包含相对于野生型Ras氨基酸序列的第12位突变，其中检测出第76位和第12位突变表明所述测试样品中存在肿瘤细胞或其可能性，并进一步表明与携带在这些位置上仅具有一个突变或没有突变的Ras蛋白的肿瘤细胞相比该患者的肿瘤更具攻击性。在一方面中，所述检测步骤包括在测试样品中检测编码所述Ras突变的核酸序列。在一方面中，所述检测步骤包括PCR扩增编码所述突变的基因组DNA模板或者原位PCR扩增编码所述突变的DNA序列。在一方面中，通过选自下组的方法进行所述检测步骤：聚合酶链式反应（PCR）、逆转录酶-PCR（RT-PCR）、原位杂交、Northern印迹、序列分析、基因微阵列分析和报告基因检测。在一方面中，如下测定编码突变型Ras蛋白的核酸序列的水平：使分离自测试样品的核酸与选择性结合编码所述突变型Ras蛋白的核酸序列的引物或探针接触，并检测编码所述突变型Ras蛋白的核酸序列是否受到所述引物或探针的结合。在一方面中，如下测定突变型Ras蛋白的水平：使测试样品与选择性且特异性结合所述突变型Ras蛋白的抗体或其片段或适体接触，并检测所述抗体或其片段或适体是否已结合至所述突变型Ras蛋白。在一方面中，所述测试样品是来自正在诊断癌症的患者且其中所述测试样品与阴性对照样品进行比较。在一方面中，将所述测试样品固定化在片基上。在一方面中，所述方法用于诊断患者的癌症。在一方面中，所述方法用于确定患者的癌症的预后。在另一方面中，所述方法用于确定患者对治疗性处理的易感性(susceptibility)。

本发明的另一个实施方案涉及在本发明的诊断方法中使用的试剂盒。所

述试剂盒优选包括可用于在测试样品中检测依照本发明的Ras（蛋白质）或*ras*（核酸）突变的存在与否的任何试剂，且优选包括能结合生物标志物（即所述突变的*ras*基因、RNA、cDNA或由其编码的蛋白质）的寡核苷酸探针、PCR引物、抗体、抗原结合肽、或适体。所述试剂盒可以包括实施本文涵盖的诊断方法所需要的任何试剂。所述试剂盒还可以包括用于检测其它癌症生物标志物的试剂，所述其它癌症生物标志物诸如先前描述的Ras突变，或用于癌症诊断的任何其它合适靶物，甚至针对具有与本文所述Ras突变无关的起因或后果(contribution)的癌症。

本发明的又一个实施方案涉及鉴定用于预防或治疗癌症的化合物的方法，其包括鉴定靶物Ras蛋白或编码所述靶物Ras蛋白的核酸分子的抑制剂，其中所述靶物Ras蛋白包含相对于野生型Ras蛋白的第76位突变。在一方面中，所述突变是选自甘氨酸、赖氨酸和谷氨酰胺的非谷氨酸氨基酸对野生型蛋白质第76位谷氨酸的替代。在一方面中，所述鉴定步骤包括鉴定靶物Ras蛋白的表达或活性的抑制剂。在一方面中，所述检测步骤选自：在假定的调节性化合物存在时检测靶物Ras蛋白的翻译或活性；和在假定的调节性化合物存在时检测编码所述靶物Ras蛋白的基因的表达。在一方面中，所述方法包括下列步骤：（a）使宿主细胞与假定的调节性化合物接触，其中所述宿主细胞表达所述靶物Ras蛋白或其生物学活性片段，并（b）检测所述假定的调节性化合物是否触发所述靶物Ras蛋白或其生物学活性片段的GTP水解，其中假定的调节性化合物与不存在所述化合物时相比触发所述靶物Ras蛋白的GTP水解表明它是用于预防或治疗癌症的候选化合物。在一方面中，所述宿主细胞是肿瘤细胞系。

本发明的另一个实施方案涉及鉴定用于预防或治疗癌症的化合物的方法，其包括鉴定在表达靶物突变型Ras蛋白的细胞中但不在表达野生型Ras蛋白的细胞中触发GTP水解的化合物，其中所述靶物突变型Ras蛋白包含相对于野生型Ras蛋白的第76位突变。

在任何上述鉴定方法的一方面中，所述假定的调节性化合物可以选自：适体、siRNA分子、反义核酸分子、核酶、抗体或其抗原结合片段、构象拮抗剂、和小分子抑制剂。

发明详述

一般地,本发明涉及本发明人的发现,即新近发现的人Ras突变,据信该突变在具有该突变(其包括此特定突变的多种变体)的某些个体中促成或引起癌症。具体地,本发明人发现了人Ras序列(K-、N-或H-Ras)第76位氨基酸(即第76位密码子所编码的)的突变可以在显著百分比的患者肿瘤中鉴定到,且提高肿瘤的致癌性。就本发明人所知,此特定Ras突变先前没有鉴定到。本发明还涉及本发明人的如下发现,即在此新近发现的突变与第二个先前记载的Ras突变(特别是第12位密码子突变)同时存在于肿瘤细胞中时,该突变组合协同作用而提高携带此类突变的肿瘤的致癌性。特别地,该突变组合与任一单独突变相比在增强肿瘤生长方面有协同效应,这在体外和在体内都已经证实。因而,本发明提供了利用这些发现的核酸分子和蛋白质,以及基于这些发现的多种研究、诊断和治疗工具和使用方法,正如下文详细描述。

具体地,K-、N-和H-ras DNA序列表征了肿瘤相关突变的存在,其通过对来自表达突变型Ras蛋白的完整热灭活酵母(本文中也称为Tarmogen)的1期免疫疗法试验中149位患有胰腺癌(68%检测有第12位、第13位或第61位密码子*ras*突变)、结肠直肠癌(40%检测有第12位、第13位或第61位密码子*ras*突变)或非小细胞肺癌(NSCLC)(9%检测有第12位、第13位或第61位密码子*ras*突变)的受试者肿瘤的外显子2和3的嵌套式PCR扩增和直接测序来进行。在来自所有3种癌症类型的24位受试者中检测出第76位密码子的新*ras*突变,其中22位为E76G突变,而1个肿瘤携带E76K突变和1个肿瘤携带E76Q突变。在8个肿瘤中鉴定到E76加先前记载的第12位或第13位密码子突变的双重组合。

更具体地,如表1(见实施例1)所示,33个肺肿瘤中的5个(约15%)、85个结肠直肠肿瘤中的12个(约14%)、和31个胰肿瘤中的7个(约22.5%)(对于这些肿瘤,获得了所有三种Ras基因的完全测序信息(外显子2和3))展现出人Ras序列第76位氨基酸(即由第76位密码子所编码的)的突变(Ras E76突变)。肺结肠直肠肿瘤之一在K-和H-ras中都具有第76位氨基酸突变。在直肠结肠肿瘤的情况下,第76位氨基酸的12个突变中的10个是谷氨酸到甘氨酸的突变(E76G),1个突变是谷氨酸到赖氨酸的突变(E76K),和1个突变是谷氨酸到谷氨酰胺的突变(E76Q)。肺肿瘤和胰肿瘤的所有E76突变是E76G突变。总的来说,在该1期试验所研究的肿瘤中,Ras第76位氨基酸突变的发

生率仅次于Ras第12位氨基酸突变的发生率（见图1）。表2（见实施例1）显示了同一套肿瘤样品中第12位、第13位和第61位的先前已知Ras突变的频率。E76突变主要存在于K-ras或H-ras基因外显子3，尽管E76K还存在于N-ras基因外显子3。此外，如上所述，在8个肿瘤中鉴定到E76加先前记载的第12位或第13位密码子突变的双重组合。综上所述，这些数据表明Ras基因第76位密码子的突变在这些个体中促成或引起癌症。

本发明人别的研究证明，Balb3T3细胞中鼠K-ras第76位密码子Ras突变的表达确实提高了在体外的这些细胞在软琼脂中的集落形成。具体地，非临床研究中的转化证实了Ras E76G和E76K突变。特别感兴趣地，偶联第76位和第12位密码子突变导致肿瘤生长协同（即该突变组合协同作用而显著提高包含具有这些双重突变的Ras的肿瘤的致癌性）。此外，在将各种突变型K-ras基因注入BALB/c裸鼠后，与包含任何单个突变的肿瘤细胞相比，双重G12-E76 Ras突变（在本实验中具体是G12V-E76G突变）引起显著加速的肿瘤生长。根据这些发现，本发明人相信，不限于理论，E76突变可导致活化的Ras癌蛋白质。

先前记载的第12位或第61位密码子突变分别阻断从GTP释放 γ -磷酸或者阻止Ras-GAP蛋白结合Ras以触发GTP水解。在本发明人就第76位氨基酸的位置检查已知的Ras晶体结构时，看见该残基位于称为开关2（Switch 2）或环4（Loop 4）的环的末端（见图4）。提到图4，在该蛋白质三级结构中突出了第12位、第13位、第61位和第76位氨基酸的估计位置（例如关于Ras晶体结构内的氨基酸定位参见RSSB蛋白质数据库（PDB）中的多个结构或Franken, SM等, *Biochemistry* 1993, 32:8411-20）。该示意图突出了Ras蛋白质晶体结构由于与H-Ras野生型（G12）序列（右）相比的该结构域第12位密码子突变（G12D）（左）而引起的变化。另外，包含第61位密码子突变型H-Ras（Q61L）的结构域（右）的结构改变通过与该结构域的野生型序列（左）相比而明显。环4的近端包含第61位氨基酸，那里的突变先于本发明定义为活化动物和人癌症中的Ras癌蛋白质（例如参见Lu等, *Cancer Res.* 2004 Aug 1;64(15):5084-8; 还可参见众多临床研究 - 而且，实施例1中描述的当前试验中的两位结肠直肠癌患者具有Ras第61位密码子突变）。Ras蛋白的该环牵涉结合GTP酶活化蛋白（Ras-GAP），其触发结合至活化后的Ras蛋白的GTP水解以将Ras转变为无活性的GDP结合形式。没有触发GTP水解的能力使Ras蛋

白维持在活化状态（GTP结合的），因此组成性发送细胞增殖的信号。如此，第61位密码子突变阻止相互作用的蛋白质关闭活化状态。第12位密码子突变干扰末端磷酸的释放，使得该蛋白质保持在活化状态。如此，活化状态是能够与下游效应器蛋白质结合以从上游激活物发送增殖信号，或者在突变型Ras蛋白的情况中以递送组成性活化信号的Ras蛋白（结合有GTP的）的构象。

第76位氨基酸在关键的开关2/环4（GAP结合）结构域的另一个“铰链”处的定位与本发明人的信念一致，即该氨基酸的突变会类似地干扰Ras功能。例如，谷氨酸到甘氨酸的突变（Ras E76G突变）例如会使Ras序列从甘氨酸-谷氨酸-甘氨酸（GEG，即第74-76位密码子的单字母代码）改变为甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸（GGG，即“突变型”第74-76位密码子的单字母代码）。已知在 α -螺旋结构中导入甘氨酸在生化上干扰 α -螺旋环结构的维持。因此，预测从GEG到GGG的改变破坏环4/开关2的 α -螺旋，并会干扰促进GTP水解所需要的构象改变。类似地，第76位氨基酸从谷氨酸到赖氨酸或者从谷氨酸到谷氨酰胺的改变（分别为E76K或E76Q）会改变氨基酸的电荷，这也具有破坏蛋白质结构和功能的可能性，倘若谷氨酸的负电荷对分子内或分子间的蛋白质-蛋白质相互作用是重要的话。如此，本发明人的观察结果，即显著比例的人肿瘤拥有Ras E76突变可以通过Ras结构和功能研究来解释。因而，人肿瘤中的第76位密码子*ras*突变的鉴定代表了肿瘤疗法的新靶物。

这些观察结果引导本发明人在本文中另外提出，E76相关铰链区中的感兴趣突变还可以包括氨基酸P73、T74、G75、E76、G77和F78的突变，而且这些位置的突变会具有与本文所述E76突变类似的对Ras GTP水解和因此对细胞增殖（肿瘤生长）的效应。因而，第73位、第74位、第75位、第77位和第78位密码子的突变也代表了癌症疗法的新靶物。

本发明人的结果还表明携带双突变的肿瘤更可能展现攻击性生长特征。如此，据信患者肿瘤中第12位和第76位密码子双重*ras*突变的基因型预示加速的恶性表型，这已经由本文提供的数据所表明。因而，包含第76位密码子*ras*突变的组合突变的鉴定代表了癌症疗法的又一新靶物。此外，因为本发明人在实施例1中的数据还表明还可以找到Ras A59或Q61突变与G12或G13突变的联合，本发明人在本文提出G12或G13（干扰末端磷酸释放）与A59、Q61或E76中的任何一个或多个，或者甚至与E76位于同一铰链区中的其它氨基酸（即P73、T74、G75、E76、G77、F78）的任何一的突变的其它组合也通

过抑制Ras GTP水解而加剧细胞增殖的信号传导，并因而会导致更具攻击性的肿瘤表型，及增大的转移可能性。这是基于本发明人的如下信念，即降低释放所切割的GTP的能力（第12/13位突变的影响）与丧失发出GTP酶活性信号的能力（开关2/环4区任一侧的第59位、第61位或第73-78位突变的影响）的组合会加剧细胞增殖的信号传导达一个数量级，正如关于G12和E76的突变组合所提供的的数据所表明的。该表型可以通过同一DNA分子（相同基因）中的两个突变和/或分开存在于每个Ras等位基因上的突变而发生，尽管本发明人的数据表明存在于同一DNA分子上的突变组合导致更具攻击性的表型，而且可以加强恶性转移。因而，本发明包括如下核酸分子，其具有第12位或第13位突变与第59位、第61位、第73位、第74位、第75位、第76位、第77位或第78位突变的任何组合，其中第12位或第13位与第59位、第61位或第76位的组合是本发明的具体实施方案。包含这些组合的蛋白质或肽、及所述核酸分子和蛋白质的用途（及相关工具）都涵盖在本发明内，正如下文更详细描述。

因此，本发明的一个实施方案涉及包含编码Ras（H-Ras、N-Ras或K-Ras）的核酸序列的分离的核酸分子，其中所述Ras氨基酸序列的第76位谷氨酸（E76）是突变的。本发明还涵盖编码包含第76位突变的任何Ras片段的核酸分子，该核酸分子在任何筛选、诊断或治疗应用中是有用的。优先地，将第76位氨基酸用另一种氨基酸（不是谷氨酸的氨基酸或“非谷氨酸氨基酸”）替代，包括但不限于甘氨酸替代、赖氨酸替代或谷氨酰胺替代。在另一个实施方案中，本发明提供了包含编码如下Ras（H-Ras、N-Ras或K-Ras）（或其部分）的核酸序列的分离的核酸分子，所述Ras包含E76突变和Ras不同位置的一个或多个别的突变。一种优选的突变组合是E76突变和G12突变，尽管本发明的这方面不限于该组合，如上文所描述的。在另一个实施方案中，本发明提供了不同核酸分子的组合，所述核酸分子中至少一种编码包含E76突变的Ras（或其部分），而一种或多种别的核酸分子包含一种或多种别的突变，所述别的突变包括但不限于G12突变、G13突变、A59突变和/或Q61突变。单独的或与这些别的突变组合的编码包含第76位突变的Ras蛋白或肽的核酸分子是有用的，例如作为用于研究或诊断工具的探针或引物、用于制备作为诊断剂或治疗剂的反义或siRNA分子（下文所描述的）、和/或用于编码用作研究剂、诊断剂和/或治疗剂的Ras蛋白和肽，所有这些在下文中更有详细的描

述。

本发明的另一个实施方案涉及分离的核酸分子,其包含编码Ras(H-Ras、N-Ras或K-Ras)的核酸序列,其中所述Ras氨基酸序列的第73位脯氨酸(P73)、第74位苏氨酸(T74)、第75位甘氨酸(G75)、第77位甘氨酸(G77)和/或第78位苯丙氨酸(F78)是突变的。本发明还涵盖编码包含任何一个或多个这些突变的任何Ras片段的核酸分子,该核酸分子在任何筛选、诊断或治疗应用中是有用的。优选地,将这些位置任何一个或多个的氨基酸用与Ras野生型序列的该位置上存在的氨基酸不同的氨基酸替代。

在另一个实施方案中,本发明提供了分离的核酸分子,其包含编码如下Ras蛋白(H-ras、N-ras或K-ras)(或其部分)的核酸序列,所述Ras蛋白包含第59位、第61位、第73位、第74位、第75位、第76位、第77位或第78位突变的任何一个或多个,和Ras不同位置的一个或多个别的突变。一种优选的突变组合是G12突变和/或G13突变与在第59位、第61位、第73位、第74位、第75位、第76位、第77位或第78位突变的任何一个或多个。在另一个实施方案中,本发明提供了不同核酸分子的组合,所述核酸分子中至少一种编码包含选自第59位、第61位、第73位、第74位、第75位、第76位、第77位或第78位的一个或多个位置的突变的Ras(或其部分)(优先选自第73-78位中任一个),而一种或多种别的核酸分子包含一种或多种别的突变,包括但不限于G12突变和G13突变。

编码包含任何上述突变及其组合的Ras蛋白或肽的核酸分子是有用的,例如作为用于研究或诊断工具的探针或引物,用于制备作为诊断剂或治疗剂的反义或siRNA分子(下文所描述的),和/或用于编码用作研究剂、诊断剂和/或治疗剂的Ras蛋白和肽,所有这些在下文中更有详细的描述。

本发明还包括由任何上述核酸分子所编码的蛋白质,包括Ras蛋白的任何片段,其包含单独的或与其它突变组合的第76位突变(或者任何一个或多个在第73位、第74位、第75位、第77位或第78位上的突变),且在任何研究、诊断或治疗应用中是有用的。

可以进一步延伸Ras E76突变的用途,以及第73位、第74位、第75位、第77位或第78位突变的用途或本文所述任何Ras突变组合的用途以涵盖多种研究、诊断和治疗工具,包括开发抗体,其选择性结合具有该特定的一种突变或多种突变的Ras蛋白;开发适体,其选择性结合具有该特定的一种突

或多种突变的Ras蛋白；开发siRNA或反义核酸序列，其可用作诊断试剂或用作治疗工具，用于抑制携带该特定的一种突变或多种突变的Ras蛋白的表达；开发治疗性分子，包括构象拮抗剂，其触发GTP水解或以其它方式补偿这些突变型Ras蛋白在这点上的缺陷或活性过度(hyperactivity)；和/或开发动物模型，包括转基因动物和细胞系，其表达该特定的一种突变或多种突变。

本发明的另一个实施方案涉及Ras E76突变，或第73位、第74位、第75位、第77位或第78位突变，或本文所述任何Ras突变组合的用途，即用作癌症诊断或预后测定法中的标志物。例如，可以自待测试癌症或癌症形成风险的患者获得生物学样品，并可以在基因水平、RNA水平或蛋白质水平上分析携带E76突变（或第73位、第74位、第75位、第77位或第78位突变）的Ras的表达。表达具有该突变的Ras的患者会比不具有该突变的人预测为具有更高的风险患上癌症或诊断为更可能患有癌症。而且，表达具有第59位、第61位、第73位、第74位、第75位、第76位、第77位或第78位中任何一个的突变以及第二Ras突变，特别是G12或G13突变（特别感兴趣的是E76和G12突变组合）的Ras的患者会比不具有该Ras突变组合的人预测为具有甚至更高的风险患上癌症、诊断为患有更具攻击性的癌症、或诊断为更可能患有癌症。另外，任何Ras第73-78位突变（特别是E76突变）和这些突变或第59位或第61位突变与其它突变（例如G12突变或G13突变）的组合的存在与否可用于为患者确定癌症疗法或者用于预测患者的治疗结果。例如，可以基于Ras E76突变的存在而以特定方式或者用特定治疗组合物来治疗具有Ras E76G的患者（例如通过选择影响GTP水解的化合物）。确实，下文描述的本发明实施方案致力于免疫治疗方法，其基于这种特定突变或任何第73-78位突变或本文所述突变组合的鉴定。具有E76突变与另一突变诸如G12突变的组合的患者可预测为具有尤具攻击性的肿瘤和/或可促进原发肿瘤从起源位置转移，并且可以相应的治疗，包括用基于E76损伤或基于该突变组合的免疫治疗方法。上文所述G12或G13突变与开关2/环4区突变的其它组合也预测为表明尤具攻击性的肿瘤。

本发明的又一个实施方案涉及Ras E76突变（或者第73位、第74位、第75位、第77位或第78位突变或本文所述任何Ras突变组合）的用途，即作为治疗患者癌症的治疗方法的靶物。此类治疗方法可以包括但不限于化学治疗方法和免疫治疗方法。例如，基于上文所述提出的Ras E76突变的作用机制，

可以设计或提出如下化学治疗策略, 例如其能使GTP从Ras蛋白水解或以其它方式补偿Ras丧失触发GTP水解的能力。会优选设计如下化合物, 其能够调节突变型Ras蛋白的GTP水解, 但不影响野生型、非突变型Ras蛋白的GTP水解(下文有更详细的描述)。举例而言, 可以使用本文提供的信息来开发多种合成分子、适体或构象拮抗剂以触发活性Ras蛋白的GTP水解。在免疫治疗方法中, 使用Ras E76突变(或第73-78位其它突变)来生成或提供突变型Ras抗原以刺激针对表达该突变型Ras的肿瘤细胞的免疫应答。可以类似地使用Ras突变组合(例如E76和G12)。例如, 可以将突变型Ras蛋白或肽或编码它们的核酸在测定法中用作靶物以鉴定如下新的小分子或肽药物, 其预测为改变肿瘤细胞中Ras蛋白的表达或活性。下文描述了这个实施方案的优选方面。

本发明的另一个实施方案涉及预防性或治疗性疫苗或组合物和使用它们来保护动物免于癌症的方法。所述疫苗或组合物可以包括如下抗原, 该抗原包含Ras的一个或多个免疫原性部分, 其包含本文所述E76突变(或者Ras的一个或多个免疫原性部分, 其包含第73位、第74位、第75位、第77位或第78位突变), 其是单独的, 或者与包含其它突变的Ras的其它免疫原性部分组合, 或者与待治疗或预防的肿瘤有关的其它免疫原组合。所述疫苗或组合物还可以包括如下抗原, 该抗原包含Ras的一个或多个免疫原性部分, 其包含本文所述任何Ras突变组合, 其是单独的, 或者与待治疗或预防的肿瘤有关的其它免疫原组合。所述疫苗或组合物可以包括用于递送所述抗原的任何药学可接受的媒介, 包括任何佐剂、载体或其它递送媒介。在一个优选的实施方案中, 所述媒介是下文详细描述基于酵母的媒介。可以在用于治疗任何携带Ras E76突变(或第73位、第74位、第75位、第77位或第78位突变或本文所述任何Ras突变组合)的癌症的组合物中提供Ras抗原, 而且其还作为用于治疗多种如下癌症的基于多表位和/或多抗原的产物的一个元件, 所述癌症可以包括携带Ras E76突变(或第73位、第74位、第75位、第77位或第78位突变或本文所述任何Ras突变组合)的所有癌症。如上所述, 所述疫苗或组合物中可以包括其它Ras抗原和/或其它癌抗原或其免疫原性部分。

通用技术

除非另有说明, 本发明的实施将采用分子生物学(包括重组技术)、微

生物学、细胞生物学、生物化学、核酸化学、和免疫学的常规技术，它们是本领域技术人员所公知的。此类技术在文献中有详细阐述，诸如*Methods of Enzymology*, Vol. 194, Guthrie等编, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990); *Biology and activities of yeasts*, Skinner等编, Academic Press (1980); *Methods in yeast genetics: a laboratory course manual*, Rose等, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990); *The Yeast Saccharomyces: Cell Cycle and Cell Biology*, Pringle 等 编 , Cold Spring Harbor Laboratory Press (1997); *The Yeast Saccharomyces: Gene Expression*, Jones等编, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1993); *The Yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energetics*, Broach等编, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1992); *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版, Sambrook 等 (1989)及 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第3版, Sambrook和Russel (2001) (在本文中共同称为“Sambrook”); *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel等编, 1987, 包括到2001年的增刊; *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, Mullis等编 (1994); Harlow和Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York及Harlow和Lane (1999) *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (在本文中共同称为“Harlow和Lane”); Beaucage等编, *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New York, (2000); *Casarett and Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons*, C. Klaassen编, 第6版 (2001); 及 *Vaccines*, S. Plotkin和W. Orenstein编, 第3版 (1999)。

通用定义

除非另有说明，本文中一般性提到“Ras突变”可以指*ras*基因或由其获得的或衍生的核酸（例如RNA、DNA）的核酸序列中的突变，以及Ras蛋白或其肽的氨基酸序列中的突变。提到Ras的核酸序列或氨基酸序列的特定位置的突变可以通过提到存在该突变的密码子或氨基酸位置数值来描述，而且这些称谓可以互换使用（例如提到“第76位密码子”或“第76位”或“E76”均可用于指*ras*核酸序列中编码Ras第76位氨基酸的密码子或者位于第76位的实际氨基酸残基（谷氨酸），其中描述核酸或氨基酸序列中的突变）。

依照本发明，分离的核酸分子指已经离开其天然环境的（即已经进行人为操作的）核酸分子，其天然环境指在自然界中找到该核酸分子的基因组或染色体。因此，“分离的”不必然反映该核酸分子已经纯化的程度，但是指明该分子不包括在自然界中找到该核酸分子的整个基因组或整个染色体。另外，分离的核酸分子不是核酸分子的文库，诸如自肿瘤样品产生的核酸分子文库。分离的核酸分子可以包括基因。包括基因的分离的核酸分子不是包括所述基因的染色体片段，而是包括与该基因有关的编码区和调节区，但是没有在同一染色体上天然发现的别的基因。分离的核酸分子还可以包括侧翼（即在序列的5'和/或3'端）有别的核酸的指定核酸序列，所述别的核酸在自然界中通常不在所述指定核酸序列的侧翼（即异源序列）。分离的核酸分子可以包括DNA、RNA（例如mRNA）、或DNA或RNA任一的衍生物（例如cDNA、siRNA）。尽管短语“核酸分子”主要指物理上的核酸分子，而短语“核酸序列”主要指核酸分子上的核苷酸序列，但是这两个短语可以互换使用，尤其对于能够编码蛋白质或蛋白质之结构域或部分的核酸分子或核酸序列。

本发明的核酸分子的最低大小是足以形成探针或寡核苷酸引物的大小，所述探针或寡核苷酸引物能够与本发明的核酸分子的互补序列形成稳定杂合物（例如在中等、高度或非常高度的严格条件下），或者是足以编码充当免疫原性表位的氨基酸序列的大小，所述免疫原性表位足以用于产生抗体或抗原结合肽，或具有天然编码的蛋白质（例如Ras）或突变型蛋白质（例如Ras突变体）或其片段的生物学活性。因此，编码此类蛋白质的核酸分子的大小可依赖于核酸组成和所述核酸分子与互补序列之间的同源性百分率或同一性百分率，并且本质上依赖于杂交条件（例如温度、盐浓度和甲酰胺浓度）。典型地，用作寡核苷酸引物或探针的核酸分子的最低大小如下：如果所述核酸分子富含GC，则长度至少为约12至约15个核苷酸；如果它们富含AT，则它们的长度至少为约15至约18个碱基。除非实施限制，对本发明的核酸分子的最大大小没有限制，因为所述核酸分子可以包括足以在本文所述发明的任何实施方案中有用的序列。

可以使用重组DNA技术（例如聚合酶链式反应（PCR）扩增、克隆）或化学合成来产生本发明的分离的核酸分子。分离的核酸分子包括天然的核酸分子及其同源物，包括但不限于天然的等位变体和修饰的核酸分子，其中已

将核苷酸插入、删除、替代和/或倒置，其方式使得此类修饰提供期望的效果（例如本文所述将E76G突变导入Ras氨基酸序列）。

可以使用本领域技术人员已知的许多方法（参见例如Sambrook等，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Labs Press (1989)）来产生核酸分子同源物。例如，可以使用多种技术来修饰核酸分子，包括但不限于经典的诱变技术和重组DNA技术，诸如定点诱变、化学处理核酸分子以诱导突变、核酸片段的限制酶切割、核酸片段的连接、核酸序列选定区域的PCR扩增和/或诱变、寡核苷酸混合物的合成和连接混合物基团以“建造”核酸分子混合物及其组合。可以通过筛选由核酸所编码的蛋白质的功能和/或通过野生型基因的杂交来从修饰的核酸的混合物中选择出核酸分子同源物。

寡核苷酸探针或引物是通常大小范围从长度约8个核苷酸至几百个核苷酸的核酸分子。此类分子通常用于通过在严格杂交条件下与靶物核酸序列的杂交来鉴定样品中的所述靶物核酸序列。杂交条件已在上文详细描述。

PCR引物也是核酸序列，尽管在聚合酶链式反应中使用的PCR引物通常是相当短长度的寡核苷酸。通过使用来自靶物序列的序列信息，本领域技术人员可以轻易地开发和产生PCR引物和杂交探针(参见例如Sambrook等，见上文或Glick等，见上文)。

适体是合成的核酸的短链（通常是RNA，但也可以是DNA），依靠它们以高亲和力和特异性结合预定的特定靶物分子的能力而选自随机化组合核酸文库。适体采取确定的三维结构，而且能够辨别结构上有细微差异的化合物。

RNA干扰（RNAi）是用于通过称为“RNA干扰”（RNAi）的基因沉默来基因灭活的方法。参见例如Fire等，*Nature* 391: 806-811 (1998)和美国专利6,506,559。RNA干扰指在RNA多核苷酸通过内源细胞过程起作用以特异性抑制序列与该RNA的序列对应的基因表达时发生的事件。在宿主动物通过双链（ds）RNA降解mRNA（有时通过RNA酶III内切核酸酶消化）时发生靶物基因的沉默。所述消化导致长度（或大小）为约21至23个核苷酸（或碱基）的分子，尽管分子大小可能大至30个碱基。这些短RNA种类（短干扰RNA或siRNA）可能通过称为RNA诱导性沉默复合体（RISC）的RNAi核酸酶复合体来介导相应RNA信息和转录物的降解，所述RNAi核酸酶复合体帮助小

dsRNA通过碱基配对相互作用来识别互补mRNA。在siRNA与其底物相互作用后,可能通过RISC中存在的酶,将mRNA靶向降解。看来这种类型的机制对生物体抑制病毒感染、转座子跳跃和类似现象和对调节内源基因的表达是有用的。迄今,已经在植物、昆虫、线虫和脊椎动物等生物体中证明了RNAi活性。对于一般的背景信息,参见例如Schutz等, *Virology* 344(1):151-7 (2006); Leonard等, *Gene Ther.* 13(6):532-40 (2006); Colbere-Garapin等, *Microbes Infect.* 7(4):767-75 (2005); Wall, *Theriogenology* 57(1):189-201 (2002); El-Bashir等, *Nature* 411:494-498 (2001); Fire,A.等, *Science* 391:806-811 (1998); Gitlin等, *Nature* 418:430-434 (2002); Gitlin等, *J. Virol.* 79:1027-1035 (2005); Kahana等, *J. Gen. Virol.* 85:3213-3217 (2004); Kronke等, *J. Virol.* 78:3436-3446 (2004); Leonard等, *J. Virol.* 79:1645-1654 (2005); 及Yokota等, *EMBO Rep.* 4:602-608 (2003)。

核酶指能够进行生物催化作用(例如通过破坏或形成共价键)的RNA区段。更具体地,核酶指通过结合靶物RNA模块并通过在特定切割位点上切割磷酸二酯骨架来将其灭活而发挥作用的反义RNA分子。可以将此类基于核酸的药剂导入宿主细胞或组织并用于抑制突变型Ras蛋白的表达和/或功能。

依照本发明,重组核酸分子包含重组载体和感兴趣的核酸序列。重组载体指作为工具使用的经过改造的(即人工产生的)核酸分子,其用于对所选择的核酸序列进行操作和用于将所述核酸序列导入宿主细胞。因此,重组载体适于在对所选择的核酸序列进行克隆、测序和/或其它操作时使用,诸如通过表达和/或递送所选择的核酸序列入宿主细胞以形成重组细胞。此类载体典型地包含异源核酸序列,其是不会天然发现与待克隆或待递送的核酸序列毗邻的核酸序列,尽管载体还可包含调节性核酸序列(例如启动子、非翻译区),其是天然发现与本发明核酸分子毗邻的或者对表达本发明的核酸分子有用的(在下文中详细讨论)。载体可以或是RNA或是DNA,或是原核的或是真核的,并且典型地是质粒。可以将载体作为染色体外元件(例如质粒)维持或者可以将其整合入重组生物体(例如微生物或植物)的染色体。完整的载体可以保留在宿主细胞内的位置,或者在某些条件下可以删除质粒DNA,留下本发明的核酸分子。所整合的核酸分子可以处于染色体启动子控制下、处于天然或质粒启动子控制下、或处于几个启动子的组合控制下。可以将单拷贝或多拷贝的核酸分子整合入染色体。本发明的重组载体可以包含至少一种

可选择标志物。

在一个实施方案中，本发明的重组核酸分子中所使用的重组载体是表达载体。在用于本文时，短语“表达载体”用于指适于生产所编码产物（例如感兴趣蛋白质）的载体。在这个实施方案中，将编码待生产产物的核酸序列插入重组载体以产生重组核酸分子。将编码待生产蛋白质的核酸序列插入载体，其方式使得所述核酸序列与载体中的调节序列可操作连接，使得所述核酸序列在重组宿主细胞内转录和翻译。

在另一个实施方案中，本发明的重组核酸分子中所使用的重组载体是靶向载体。在用于本文时，短语“靶向载体”用于指用于将特定核酸分子递送入重组宿主细胞的载体，其中所述核酸分子可用于在宿主细胞内删除、灭活或替换内源基因或基因的一部分（即用于靶向基因破坏或敲除技术）。一方面，此类载体在本领域中还可称为“敲除”载体。在这个实施方案的一方面中，载体的一部分但更典型地是插入载体的核酸分子（即插入物）具有与宿主细胞中的靶物基因（即待靶向删除或灭活的基因）的核酸序列同源的核酸序列。将载体插入物的核酸序列设计成与靶物基因有关，使得靶物基因和插入物可经历同源重组，由此删除、灭活、削弱（即通过对内源靶物基因的至少一部分的突变或删除）或替换内源靶物基因。

典型地，重组核酸分子包括至少一个可操作连接至一个或多个表达控制序列的本发明核酸分子。依照本发明，短语“可操作连接”指将核酸分子连接至表达控制序列（例如转录控制序列和/或翻译控制序列），其方式使得该分子可以在转染（即转化、转导、转染、偶联或导入）入宿主细胞后表达。转录控制序列指控制转录起始、延长或终止的序列。特别重要的转录控制序列是控制转录起始的那些，诸如启动子、增强子、操纵基因和阻抑物序列。适当的转录控制序列包括可以在重组核酸分子将要导入的宿主细胞或生物体中发挥功能的任何转录控制序列。

本发明的重组核酸分子还可以包含别的调节序列，诸如翻译调节序列、复制起点、和与重组细胞相容的其它调节序列。在一个实施方案中，本发明的重组分子（包括整合入宿主细胞染色体的那些）还包含分泌信号（即信号区段核酸序列），以使得所表达的蛋白质能够自生成该蛋白质的细胞分泌。适合的信号区段包括天然地与待表达的蛋白质相关的信号区段或能够指导依照本发明的蛋白质分泌的任何异源信号区段。在另一个实施方案中，本发

明的重组分子包含前导序列,以使得所表达的蛋白质能够递送至并插入宿主细胞膜。适合的前导序列包括天然地与蛋白质相关的前导序列或能够指导蛋白质递送和插入至细胞膜的任何异源前导序列。

依照本发明,术语“转染”用于指可以将外源核酸分子(即重组核酸分子)插入细胞的任何方法。术语“转化”和术语“转染”在此类术语用于指将核酸分子导入微生物细胞(诸如细菌和酵母)或导入植物细胞时可以互换使用。在微生物和植物系统中,术语“转化”用于描述由于微生物或植物获得外源核酸而引起的遗传变化(inherited change),基本上与术语“转染”同义。然而,例如在动物细胞中,转化已获得第二种含意,它可以指培养的细胞在它们变为癌性后的生长特性的改变。因此,为了避免混淆,术语“转染”优选用于将外源核酸导入动物细胞方面,而且术语“转染”在本文中用于一般涵盖动物细胞的转染和微生物细胞或植物细胞的转化,从这个意义上说两个术语关于将外源核酸导入细胞。因此,转染技术包括但不限于转化、颗粒轰击、扩散、主动运输、超声浴(bath sonication)、电穿孔、显微注射、脂转染、吸附、感染和原生质体融合。

在用于本文时,杂交条件指标准杂交条件,在所述标准杂交条件下使用核酸分子来鉴定相似的核酸分子。此类标准条件披露于例如Sambrook等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989, 完整收入本文作为参考,具体参见第9.31-9.62页。另外,用于计算适于实现容许不同程度核苷酸错配的杂交的杂交和洗涤条件披露于例如Meinkoth等, 1984, *Anal. Biochem.* 138, 267-284, 完整收入本文作为参考。

在本文中提到时,低严格性杂交和洗涤条件指容许分离与杂交反应中用于探查的核酸分子具有至少约70%核酸序列同一性的核酸分子的条件(即容许约30%或更少寡核苷酸错配的条件)。在本文中提到时,中等严格性杂交和洗涤条件指容许分离与杂交反应中用于探查的核酸分子具有至少约80%核酸序列同一性的核酸分子的条件(即容许约20%或更少寡核苷酸错配的条件)。在本文中提到时,高严格性杂交和洗涤条件指容许分离与杂交反应中用于探查的核酸分子具有至少约90%核酸序列同一性的核酸分子的条件(即容许约10%或更少寡核苷酸错配的条件)。在本文中提到时,非常高的严格性杂交和洗涤条件指容许分离与杂交反应中用于探查的核酸分子具有至少约95%核酸序列同一性的核酸分子的条件(即容许约5%或更少寡核苷酸错配

的条件)。本领域技术人员可以使用Meinkoth等(见上文)的公式来计算适于实现这些特定核苷酸错配水平的杂交和洗涤条件。此类条件将根据形成的是DNA:RNA还是DNA:DNA杂合物而变化。为DNA:DNA杂合物计算的解链温度比DNA:RNA杂合物低10℃。在具体的实施方案中,DNA:DNA杂合物的严格杂交条件包括在6X SSC (0.9M Na⁺)的离子强度,在介于约20℃和约35℃之间(较低严格性)、更优选介于约28℃和约40℃之间(更严格的)、甚至更优选介于约35℃和约45℃之间(甚至更严格的)的温度的杂交,以及适当的洗涤条件。在具体的实施方案中,DNA:RNA杂合物的严格杂交条件包括在6X SSC (0.9M Na⁺)的离子强度,在介于约30℃和约45℃之间、更优选介于约38℃和约50℃之间、甚至更优选介于约45℃和约55℃之间的温度的杂交,以及类似严格的洗涤条件。这些数值是基于大于约100个核苷酸、0%的甲酰胺和约40%的G+C含量的分子的解链温度计算。或者,可以如Sambrook等,见上文,第9.31-9.62页列出的那样凭经验计算T_m。一般而言,洗涤条件应当尽可能的严格,而且应当适于所选择的杂交条件。例如,杂交条件可以包括盐和比特定杂合物的计算的T_m低大约20-25℃的温度条件的组合,而洗涤条件典型地包括盐和比特定杂合物的计算T_m低大约12-20℃的温度条件的组合。适于与DNA:DNA杂合物使用的杂交条件的一个例子包括在约42℃在6X SSC (50%甲酰胺)中杂交2-24小时,继而进行洗涤步骤,其包括在室温在约2X SSC中洗涤一次或多次,继而在更高温度和更低离子强度的额外洗涤(例如在约37℃在约0.1X-0.5X SSC中洗涤至少一次,继而在约68℃在约0.1X-0.5X SSC中洗涤至少一次)。

在本发明中提到分离的蛋白质或多肽包括全长蛋白质、融合蛋白、或此类蛋白质的任何片段、结构域、构象表位、或同源物。更具体的说,依照本发明的分离的蛋白质指已经离开其天然环境(即已经进行过人为操作)的蛋白质(包括多肽或肽),可以包括例如纯化的蛋白质、部分纯化的蛋白质、重组生成的蛋白质、和合成生成的蛋白质。因此,“分离的”并不反映蛋白质已经纯化的程度。

在用于本文时,术语“同源物”用于指因对天然存在蛋白质或肽的一个或多个微小修饰或突变而与天然存在蛋白质或肽(即“原型”或“野生型”蛋白质)不同但保留天然存在形式的总体基本蛋白质和侧链结构(即使得同源物可鉴定为与野生型蛋白质相关)的蛋白质或肽。此类变化包括但不限于:一个或

一些氨基酸侧链的变化；一个或一些氨基酸的变化，包括删除（例如截短型式的蛋白质或肽）、插入和/或替代；一个或一些原子的立体化学变化；和/或微小衍生化，包括但不限于：甲基化、法尼基化、牻牛儿基牻牛儿基化、糖基化、羧甲基化、磷酸化、乙酰化、肉豆蔻酰化、异戊二烯化(prenylation)、棕榈化(palmitation)和/或酰胺化。同源物可以包括蛋白质的激动剂或蛋白质的拮抗剂。同源物可以具有与天然存在蛋白质或肽相比增强的、减弱的、改变的或基本上相似的特性。应当注意，同源物可以包括合成生成的同源物、给定蛋白质或结构域的天然存在等位变体、或者来自衍生参照序列的生物体以外的生物体的同源序列。同源物可以是天然等位变异或天然突变的结果。可以使用本领域已知的用于蛋白质生产的技术来生产同源物，包括但不限于直接修饰分离的或合成的天然存在蛋白质、直接蛋白质合成、或修饰编码蛋白质的核酸序列（例如使用经典或重组DNA技术来实现随机或靶向诱变）。

给定蛋白质的同源物可以包含与参照蛋白质的氨基酸序列至少大约45%、或至少大约50%、或至少大约55%、或至少大约60%、或至少大约65%、或至少大约70%、或至少大约75%、或至少大约80%、或至少大约85%、或至少大约90%、或至少大约95%相同、或至少大约95%相同、或至少大约96%相同、或至少大约97%相同、或至少大约98%相同、或至少大约99%相同（或介于45%和99%之间的、整数增量的任何百分比同一性）的氨基酸序列，基本上由所述氨基酸序列组成，或由所述氨基酸序列组成。在一个实施方案中，同源物包含与参照蛋白质的天然存在氨基酸序列少于100%相同、少于大约99%相同、少于大约98%相同、少于大约97%相同、少于大约96%相同、少于大约95%相同、诸如此类、增量为1%、直至少于大约70%相同的氨基酸序列，基本上由所述氨基酸序列组成，或由所述氨基酸序列组成。

在用于本文时，除非另有说明，提到百分比(%)同一性指使用如下方法进行的同源性评估：(1) BLAST 2.0 Basic BLAST同源性搜索，使用blastp进行氨基酸搜索而使用blastn进行核酸搜索，其中使用标准缺省参数，其中以缺省方法(by default)对检索序列过滤低复杂性区域(见Altschul, S.F., Madden, T.L., Schääffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 完整收入本文作为参考)；(2) BLAST 2比对（使用下文所述参数）；和/或(3) PSI-BLAST（位置特异性的叠

加BLAST (Position-Specific Iterated BLAST)), 其中使用标准缺省参数。应当注意, 由于BLAST 2.0 Basic BLAST与BLAST 2之间标准参数的一些差异, 在使用BLAST 2程序时可能将两种特定序列认定为具有显著同源性, 而使用序列之一作为检索序列以BLAST 2.0 Basic BLAST进行的搜索可能没有在上等匹配中鉴定到第二序列。另外, PSI-BLAST提供了自动化的、易于使用的“序型”(profile)搜索型式, 这是一种寻找序列同源物的灵敏方法。该程序首先进行带缺口的BLAST数据库搜索。PSI-BLAST程序利用来自所返回的任何显著比对的信息来构建位置特异性得分矩阵, 它取代了检索序列用于下一轮数据库搜索。因此, 应当理解, 百分比同一性可以使用这些程序中的任一种来测定。

两种特定序列可以使用BLAST 2序列彼此比对, 见Tatusova和Madden, (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250, 完整收入本文作为参考。BLAST 2序列比对以blastp或blastn进行, 使用BLAST 2.0算法在两种序列之间进行带缺口的BLAST搜索(BLAST 2.0), 容许在所得比对中引入缺口(删除和插入)。为了表述清楚, 使用标准缺省参数如下进行BLAST 2序列比对。

对于blastn, 使用0 BLOSUM62矩阵:

匹配奖分 = 1

错配罚分 = -2

打开缺口(5)和延伸缺口(2)罚分

缺口x_落选(dropoff) (50) 期望(expect) (10) 词长(11) 滤器(开)

对于blastp, 使用0 BLOSUM62矩阵:

打开缺口(11)和延伸缺口(1)罚分

缺口x_落选(dropoff) (50) 期望(expect) (10) 词长(3) 滤器(开)

依照本发明, 术语“修饰”或“突变”可以互换使用, 特别是关于本文所述蛋白质或肽的一级氨基酸序列(或核酸序列)的修饰/突变。术语“修饰”还可以用于描述对蛋白质或肽的翻译后修饰, 或例如将蛋白质或肽与另一化合物复合或拴系(tether)蛋白质, 诸如通过甘油磷脂酰肌醇(glycerophosphatidyl

inositol, GPI)锚。可以将此类修饰认为是突变,例如如果所述修饰与天然的、野生型蛋白质或肽中发生的翻译后修饰不同的话。

保守替代典型地包括下列各组内的替代:甘氨酸和丙氨酸;缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸;天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺;丝氨酸和苏氨酸;赖氨酸和精氨酸;以及苯丙氨酸和酪氨酸。替代还可以基于保守的疏水性或亲水性(Kyte和Doolittle, J. Mol. Biol. 157:105 (1982)),或者基于采取相似多肽二级结构(Chou和Fasman, Adv. Enzymol. 47:45 (1978))或三级或四级结构的能力来进行。

术语“抗原”在本文中的一般使用指:蛋白质(肽、部分蛋白质、全长蛋白质)的任何部分,其中所述蛋白质是天然存在的或合成衍生的;融合蛋白或嵌合蛋白;细胞组合物(完整细胞、细胞溶解物或破碎的细胞);生物体(完整生物体、溶解物或破碎的细胞);或碳水化合物(诸如那些在癌细胞上表达的)、或其它分子、或其任何部分。抗原引发针对接受抗原施用的个体的细胞和组织内所遭遇的相同或相似抗原的抗原特异性免疫应答(例如体液和/或细胞介导的免疫应答)。或者,抗原可以充当耐受原。

在提到免疫应答的刺激时,术语“抗原”可以与术语“免疫原”互换使用。免疫原,在用于本文时,描述引发体液的和/或细胞介导的免疫应答(即是抗原性的),使得免疫原对动物的施用(例如经由本发明的疫苗)引起针对动物的组织内所遭遇的相同或相似抗原的抗原特异性免疫应答的抗原。

“耐受原”用于描述以使得对抗原的免疫应答减轻或改变的施用形式、量、或路径提供的抗原,优选免疫系统细胞在应答与耐受原或表达或呈递此类耐受原的细胞的接触时基本上无响应性的、无反应性(anergy)、其它灭活、或删除。

“疫苗接种用抗原”可以是免疫原或耐受原,但是是疫苗中所使用的抗原(预防性的或治疗性的),其中有待引发针对疫苗接种用抗原的生物学应答(引发免疫应答、耐受)。

给定抗原的“免疫原性结构域”可以是抗原中包含至少一种在施用于动物时充当免疫原的表位的任何部分、片段或表位(例如肽片段或亚基或抗体表位或其它构象表位)。例如,单一蛋白质可以包含多种不同免疫原性结构域。免疫原性结构域并不必然是蛋白质内的线性序列,诸如在体液免疫应答的情况下。

表位在本文中定义为给定抗原内足以引发免疫应答的单一免疫原性位点，或给定抗原内足以抑制、删除或灭活免疫应答的单一耐受原性位点。本领域技术人员会认可，T细胞表位在大小和组成上与B细胞表位不同，而且经I型MHC途径呈递的表位与经II型MHC途径呈递的表位不同。表位可以是线性序列或构象表位（保守结合区）。抗原可以小至单一表位，或较大，而且可以包括多个表位。因此，抗原的大小可以小至大约5-12个氨基酸（例如肽），大至：全长蛋白质，包括多聚体和融合蛋白、嵌合蛋白、完整细胞、完整微生物、或其部分（例如完整细胞的溶解物或微生物的提取物）。

“疫苗接种”或“免疫接种”指引发（诱发）针对抗原或其免疫原性或耐受原性部分的免疫应答，作为单独施用抗原或与佐剂一起施用抗原的结果。疫苗接种优选导致保护性或治疗性效应，其中对抗原（或抗原的来源）的后续暴露引发针对该抗原（或来源）的免疫应答，在动物中减轻或预防疾病或疾患。疫苗接种的概念在本领域是众所周知的。通过施用本发明的组合物（疫苗）引发的免疫应答可以是与没有施用该组合物相比免疫应答任何方面（例如细胞介导的应答、体液应答、细胞因子生成）的任何可检测变化。

Tarmogen（靶向分子免疫原）一般指在胞外（在其表面上或作为分泌型抗原）、在胞内（内部或胞质溶胶）、或在胞外和在胞内二者表达一种或多种异源抗原的酵母媒介。Tarmogen在本领域已有记载。参见例如美国专利No. 5,830,463。

依照本发明，“异源氨基酸”指如下一段氨基酸序列：在指定氨基酸序列侧翼没有天然找到的（即不是在体内，在自然界中找到的）；或与指定氨基酸序列的功能无关的；或不会由基因中所存在的编码指定氨基酸序列的天然存在核酸序列侧翼的核苷酸编码的，若天然存在序列中的此类核苷酸使用衍生给定氨基酸序列的生物体的标准密码子用法进行翻译的话。因此，对抗原而言异源的至少两个氨基酸残基指在所述抗原侧翼没有天然找到的任何两个氨基酸残基。

依照本发明，与本发明的酵母媒介一起提到“异源”蛋白质或“异源”抗原，包括异源融合蛋白，意味着该蛋白质或抗原不是由该酵母天然表达的蛋白质或抗原，尽管融合蛋白可以包括由酵母天然表达的酵母序列或蛋白质或其部分（例如本文所述Aga蛋白）。例如，为本发明目的，认为肿瘤细胞Ras蛋白与酵母Aga蛋白的融合蛋白对于酵母媒介是异源蛋白，因为这样的融合蛋白

不是由酵母天然表达的。

本文所述任何氨基酸序列可以制备成在指定氨基酸序列的C端和/或N端侧翼各有至少一个、多至大约20个额外异源氨基酸。所得蛋白质或多肽可以称为“基本上由指定氨基酸序列组成”。异源氨基酸指如下一段氨基酸序列：在指定氨基酸序列侧翼没有天然找到的（即不是在体内，在自然界中找到的）；或与指定氨基酸序列的功能无关的；或不会由基因中所存在的编码指定氨基酸序列的天然存在核酸序列侧翼的核苷酸编码的，若天然存在序列中的此类核苷酸使用衍生给定氨基酸序列的生物体的标准密码子用法进行翻译的话。类似的，短语“基本上由...组成”在本文中提到核酸序列使用时指编码指定氨基酸序列的核酸序列可以具有如下侧翼，即编码指定氨基酸序列的核酸序列的5'和/或3'末端各有至少一个、多至大约60个额外异源核苷酸。异源核苷酸指在天然基因中所存在的编码指定氨基酸序列的核酸序列侧翼没有天然找到的（即不是在体内，在自然界中找到的），或不编码赋予蛋白质以任何额外功能或改变具有指定氨基酸序列的蛋白质的功能的蛋白质。

依照本发明，短语“选择性结合”指本发明的抗体、抗原结合片段或结合配偶体优先结合指定蛋白质的能力。更具体地，短语“选择性结合”指一种蛋白质与另一种蛋白质（例如抗体、其片段、或结合配偶体针与抗原）的特异性结合，其中通过任何标准测定法（例如免疫测定法）测得的结合水平在统计学上显著高于该测定法的背景对照。例如，在实施免疫测定法时，对照通常包括只包含抗体或抗原结合片段（即没有抗原）的反应孔/管，其中抗体或其抗原结合片段在没有抗原时的反应性（例如对孔的非特异性结合）的量视为背景。结合可以使用多种本领域标准方法来测量，包括酶免疫测定法（例如ELISA）、免疫印迹测定法等。

术语“疾病”指相对于动物的正常健康状况的任何偏离，包括存在疾病症状时的状态，以及已经发生偏离（例如感染、基因突变、基因缺陷）但症状尚未表现出来的状况。

“个体”指脊椎动物，优选哺乳动物，更优选人。哺乳动物包括但不限于家畜、运动用动物、宠物、灵长类动物、小鼠和大鼠。术语“个体”可以与术语“动物”、“受试者”或“患者”互换使用。

虽然关于本发明各方面的下列描述特别描述了关于在第76位密码子处鉴定的Ras突变的方面和/或关于包括第76位密码子突变的Ras突变组合的方

面,但是本发明下列所有方面也可应用于具有第73位、第74位、第75位、第77位或第78位中任何一个或多个的突变的Ras,或包括上文所述任何Ras突变组合的Ras,特别是第12位和/或第13位突变与第59位、第61位、第73位、第74位、第75位、第76位、第77位和/或第78位突变的任何组合。

本发明的核酸分子和蛋白质

依照本发明,可用于本发明不同方面的Ras蛋白或Ras编码核酸分子可以包括野生型或突变型Ras蛋白、或它们的一个或多个部分(例如它们可用于任何研究、诊断、筛选或治疗方法的结构域或部分),以及编码此类蛋白质或其部分(例如它们可用于任何研究、诊断、筛选或治疗方法的结构域或部分)的核酸(“有义”)分子或所述结构域或蛋白质的核酸的杂交(“反义”)链。本发明特别致力于突变型Ras蛋白和编码此类蛋白质或其片段的核酸分子,其中所述突变型Ras蛋白或其片段的核酸序列包含包括第76位的序列,其中第76位有突变,特别地,其中有非谷氨酸氨基酸对天然存在于这个位置的谷氨酸的替代。依照本发明,提到“非谷氨酸”氨基酸可以指本领域技术人员公知的常在蛋白质中发现的其它20种氨基酸中任一种的替代。在具体的优选实施方案中,非谷氨酸氨基酸指甘氨酸(E76G)、赖氨酸(E76K)或谷氨酰胺(E76Q),尽管本发明明确涵盖此位置的其它替代,包括任何其它非谷氨酸氨基酸。

Ras编码核酸分子可以包括或衍生自完整的或部分的*ras*基因,其选自K-*ras*、N-*ras*或H-*ras*基因。在一方面中,Ras编码核酸分子编码具有第76位单个突变的Ras蛋白。在另一方面中,Ras编码核酸分子编码在第76位突变以外还包含一个或多个进一步突变的Ras蛋白,包括但不限于第12位、第13位、第59位和/或第61位突变,这些位置是相对于野生型K-、H-或N-Ras氨基酸序列而言的。在其它实施方案中,各种其它Ras突变体和编码此类突变体的核酸分子可用于本发明(包括包含相对于野生型Ras氨基酸序列的第12位、第13位、第59位和/或第61位突变的突变型Ras),并且可以与Ras的其它E76蛋白或肽突变体或编码此类突变体的其它核酸分子组合。在一些实施方案中,Ras编码核酸分子编码具有第73位、第74位、第75位、第77位或第78位单个突变的Ras蛋白。在一些实施方案中,Ras编码核酸分子编码包含第12位、第13位、第59位、第61位、第73位、第74位、第75位、第76位、第77位或第78

位的两个或多个突变的任何组合的Ras蛋白，其中优选第12位或第13位的至少一个突变与第59位、第61位、第73位、第74位、第75位、第76位、第77位或78位的至少一个突变的组合。同样，所有位置是相对于野生型K-、H-或N-Ras的氨基酸序列而言的。

在另一方面中，可用于本发明的Ras蛋白（其可以由可用于本发明的编码Ras蛋白的核酸分子所编码）包括但不限于Ras蛋白的至少介于5和17之间或5和50之间或更多个（5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50...等）连续氨基酸残基的片段，其包含相对于野生型Ras氨基酸序列的氨基酸第12位、第13位、第59位、第61位、第73位、第74位、第75位、第76位、第77位和/或第78位，其中所述第12位、第13位、第59位、第61位、第73位、第74位、第75位、第76位、第77位和/或第78位氨基酸残基是突变的，优选通过用野生型或非致瘤性形式的Ras的该位置上存在的氨基酸以外的氨基酸来替代。典型地，Ras蛋白具有全长野生型或突变型ras蛋白的最大长度，其在本文所述SEQ ID NO:2-13的情况中，范围为188至189至193，尽管Ras蛋白的最大大小不限于这些长度。

在一个实施方案中，Ras蛋白的优选片段在第12位、第13位、第59位、第61位、第73位、第74位、第75位、第76位、第77位和/或第78位突变任一侧侧翼上包括天然Ras氨基酸序列（野生型序列或与细胞的非致瘤Ras相关的序列）的介于约5个和9个之间的氨基酸（例如Ras的11个氨基酸的片段，其包含第76位氨基酸且第76位任一侧翼有5个氨基酸，其中所述第76位氨基酸相对于野生型、非致瘤性Ras是突变的；或者Ras的17个氨基酸的片段，其包含第76位氨基酸且第76位任一侧翼有8个氨基酸，其中所述第76位氨基酸相对于野生型Ras是突变的）。在一个实施方案中，可用于本发明的Ras蛋白包括Ras蛋白的至少5个连续氨基酸、或至少10个氨基酸、或至少15个、或至少20个、或至少25个、或至少30个、或至少35个、或至少40个、或至少50个、或至少60个、或至少75个、或至少100个、或至少125个、或至少150个、或至少175个连续氨基酸、直至全长大小的片段，包括以整数增量的至少5个氨基酸的任何间插大小的Ras片段（5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、...39、40、41、...46、47、48...等）。在一个实施方

案中，可以将具有相同或不同突变的、相同或不同长度的几个此类片段组合在单个嵌合蛋白中。此类蛋白质的例子在实施例中描述。

优选地，编码突变型Ras蛋白或肽的核酸分子的片段的大小足以充当鉴定或扩增具有相同的一个或多个突变的Ras核酸分子（例如Ras基因或Ras RNA分子）的引物或探针。优选地，Ras蛋白或肽的片段的大小足以至少充当T细胞表位（在I类或II类MHC的背景中）或者充当抗体表位，尽管在一些实施方案中，具有其它功能品质的Ras蛋白可能是有用的，诸如举例而言的，与GTP相关的Ras蛋白，可以诱导与基因表达、细胞增殖和/或运动性相关的细胞信号传导的Ras蛋白，或可以在测定法中充当靶物的Ras蛋白。因而，所述片段（核酸或蛋白质）分别在特定突变位点侧翼包含足够的天然存在Ras核苷酸或氨基酸序列，从而可用于这些目的或本文所述任何研究、诊断、筛选或治疗组合物或方法或用途。

本文中提到的相对于野生型Ras蛋白的位置一般是指提到哺乳动物野生型Ras蛋白的位置，或至少相对于人或鼠K-Ras、H-Ras或N-Ras的位置。应当注意，上文提到的位置还对应于人或鼠K-Ras、H-Ras或N-Ras的序列中的任何一个，因为人和鼠氨基酸序列在所述蛋白质的这个区域是相同的，并因为K-Ras、H-Ras和N-Ras在这个区域是相同的。对于可能与其它动物物种不同的氨基酸序列，本领域技术人员能容易地确定相应序列位置，诸如通过与人或鼠序列的简单比对。此类片段可以是任何长度，以整数增量的，从Ras蛋白的至少约5个连续氨基酸残基直至Ras蛋白的全长（例如5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、...45、46、47等）。

本领域公知多种Ras家族成员的核苷酸和氨基酸序列。SEQ ID NO:2是编码人K-ras的核酸序列（还以GenBank编号NM_033360为人们所知）。SEQ ID NO:2编码本文以SEQ ID NO:3所示的人K-ras。SEQ ID NO:4是编码鼠K-ras的核酸序列（还以GenBank编号NM_021284为人们所知）。SEQ ID NO:4编码本文以SEQ ID NO:5所示的鼠K-ras。SEQ ID NO:6是编码人H-ras的核酸序列（还以GenBank编号NM_005343为人们所知）。SEQ ID NO:6编码本文以SEQ ID NO:7所示的人H-ras。SEQ ID NO:8是编码鼠H-ras的核酸序列（还以GenBank编号NM_008284为人们所知）。SEQ ID NO:8编码本文以SEQ ID NO:9所示的鼠H-ras。SEQ ID NO:10是编码人N-ras的核酸序列（还以GenBank编号NM_002524为人们所知）。SEQ ID NO:10编码本文以SEQ ID NO:11所示

的人N-ras。SEQ ID NO:12是编码鼠N-ras的核酸序列（还以GenBank编号NM_010937为人们所知）。SEQ ID NO:12编码本文以SEQ ID NO:13所示的鼠N-ras。SEQ ID NO:2-13是“野生型”Ras序列的代表。

如上文所讨论的，Ras是已知在特定位置上存在几个突变而且它们与形成一种或多种类型的癌症相关联的癌基因的一个例子。本发明报道了先前未知晓或未记载的Ras新突变的发现以及此突变与已知突变的组合，所述组合协同作用而显著增大携带此类突变组合的肿瘤的致癌性。因此，可以构建可用于本发明的融合蛋白（在下文更详细地描述），其包含如下肽、基本上由其组成、或由其组成，所述肽包含此突变残基以及已知在某些癌症中突变的其它特定残基，其中每个结构域在该位点包含不同突变和/或在不同位点包含突变以覆盖该位点或该蛋白质的几个或所有已知突变。例如，对于Ras，可以提供一种或多种包括第76位且在第76位任一侧包含至少4个氨基酸的免疫原性结构域（但不限于4个氨基酸，可以包括更短或更长的侧翼氨基酸区段），其中每种结构域在第76位上具有对非突变型Ras蛋白中通常存在的谷氨酸的不同替代。该位置的替代之一优选甘氨酸替代、赖氨酸替代或谷氨酸替代。在一个实例中，蛋白质或肽包含野生型Ras蛋白的至少5-9个连续氨基酸残基，以整数增量，直至整个Ras蛋白的片段，其包含相对于野生型Ras蛋白的第12位、第13位、第59位、第61位、第73位、第74位、第75位、第76位、第77位和/或第78位氨基酸，其中所述第12位、第13位、第59位、第61位、第73位、第74位、第75位、第76位、第77位和/或第78位氨基酸残基相对于野生型Ras蛋白是突变的。优选地，所述蛋白质或肽至少包含第76位突变，更优选地，所述突变是甘氨酸、赖氨酸或谷氨酰胺对通常在该位置的残基即谷氨酸的替代。

在一方面中，可用于本发明的融合蛋白构建物由至少一种肽与另一种突变型肿瘤抗原的符合读码框方式的融合物组成，其中所述肽选自：（a）包含SEQ ID NO:3的至少第4-20位或至少第8-16位的肽（或在此之间的或更大的任何大小的肽），其中相对于SEQ ID NO:3的第12位氨基酸残基相比于SEQ ID NO:3是突变的；（b）包含SEQ ID NO:3的至少第5-21位或至少第9-17位的肽（或在此之间的或更大的任何大小的肽），其中相对于SEQ ID NO:3的第13位氨基酸残基相比于SEQ ID NO:3是突变的；（c）包含SEQ ID NO:3的至少第51-67位或至少第55-63位的肽（或在此之间的或更大的任何大小的肽），其中

相对于SEQ ID NO:3的第59位氨基酸残基相比于SEQ ID NO:3是突变的; (d) 包含SEQ ID NO:3的至少第53-69位或至少第57-65位的肽 (或在此之间的或更大的任何大小的肽), 其中相对于SEQ ID NO:3的第61位氨基酸残基相比于SEQ ID NO:3是突变的; (e) 包含SEQ ID NO:3的至少第65-81位或至少第69-77位的肽 (或在此之间的或更大的任何大小的肽), 其中相对于SEQ ID NO:3的第73位氨基酸残基相比于SEQ ID NO:3是突变的; (f) 包含SEQ ID NO:3的至少第66-82位或至少第70-78位的肽 (或在此之间的或更大的任何大小的肽), 其中相对于SEQ ID NO:3的第74位氨基酸残基相比于SEQ ID NO:3是突变的; (g) 包含SEQ ID NO:3的至少第67-83位或至少第71-79位的肽 (或在此之间的或更大的任何大小的肽), 其中相对于SEQ ID NO:3的第75位氨基酸残基相比于SEQ ID NO:3是突变的; (h) 包含SEQ ID NO:3的至少第69-84位或至少第73-81位的肽 (或在此之间的或更大的任何大小的肽), 其中相对于SEQ ID NO:3的第77位氨基酸残基相比于SEQ ID NO:3是突变的; (i) 包含SEQ ID NO:3的至少第70-85位或至少第74-82位的肽 (或在此之间的或更大的任何大小的肽), 其中相对于SEQ ID NO:3的第78位氨基酸残基相比于SEQ ID NO:3是突变的; 和/或最优选地实施方案为 (j) 包含SEQ ID NO:3的至少第68-84位或至少第72-80位的肽 (或在此之间的或更大的任何大小的肽), 其中相对于SEQ ID NO:3的第76位氨基酸残基相比于SEQ ID NO:3是突变的。应当注意, 这些位置还对应于SEQ ID NO:5、7、9、11或13中的任何一个, 因为人和小鼠氨基酸序列在该蛋白质的该区域中是相同的, 并因为K-Ras、H-Ras和N-Ras蛋白在该区域中是相同的。片段不限于上文提及的那些 (它们是例示性的), 只要所述片段具有至少约5个氨基酸的长度, 包含期望的突变, 并且可用于或其编码核酸分子可用于本文所述研究、诊断、筛选或治疗方法。

在一个实施方案中, 可用于本发明的融合蛋白构建物包含本文以SEQ ID NO:14所示的融合蛋白。在另一个实施方案中, 可用于本发明的融合蛋白构建物包含本文以SEQ ID NO:15所示的融合蛋白。

因而, 本发明包括任何如下核酸分子, 其编码、杂交至、或互补于编码本文所述任何Ras蛋白或其片段的核酸分子, 并包括编码本文所述任何融合蛋白的核酸分子。本发明还包括基于本发明核酸序列的反义RNA和DNA分子、基于本发明核酸序列的核酶、基于本发明核酸序列的RNAi、和/或基于本发明Ras蛋白三级结构的适体, 它们可以通过本领域任何已知方法来制备。

这些包括本领域公知的用于化学合成多核苷酸的技术，诸如固相亚磷酰胺化学合成。或者，RNA分子可以通过编码反义RNA分子的DNA序列的体外和体内转录来产生。可将此类DNA序列掺入极其多种掺入有合适RNA聚合酶启动子（诸如T7或SP6聚合酶启动子）的载体。根据所使用的启动子，可以将组成性或诱导性合成反义RNA的反义cDNA构建物稳定地导入宿主细胞。可以将此类基于核酸的药剂导入宿主细胞或组织并用于抑制突变型Ras蛋白的表达和/或功能。

本发明的另一个实施方案包括重组核酸分子，其包含重组载体和衍生自*ras*基因和/或编码Ras蛋白或肽或其片段的核酸序列，如本文所述。典型地，重组核酸分子包括至少一个可操作连接至一个或多个表达控制序列的本发明核酸分子。上文已经描述了可以在本发明中使用的多种类型的重组载体。

本发明的一种或多种重组分子可以用于产生所编码的产物（例如突变型Ras蛋白或其部分）。在一个实施方案中，通过在有效生产蛋白质的条件下表达本文所述核酸分子来产生所编码的产物。产生所编码的蛋白质的一种优选方法是通过用一种或多种重组分子转染宿主细胞以形成重组细胞。适于转染的宿主细胞包括但不限于任何可转染的细菌、真菌（例如酵母）、昆虫、植物或动物细胞。宿主细胞可以或是未经转染的细胞或是早已用至少一种其它重组核酸分子转染的细胞。

在本发明的一个实施方案中，优选的宿主细胞是酵母细胞。转化入本发明酵母媒介的核酸分子可以包括编码一种或多种蛋白质和/或其一个或多个部分的核酸序列。此类核酸分子可以包含部分的或整个的编码区、调节区或其组合。酵母菌株的一个优点是它们携带若干核酸分子和能够产生若干异源蛋白质的能力。将要由本发明酵母媒介产生的抗原的优选数目是可以由酵母媒介适度产生的任何数目的抗原，典型范围从至少一种至至少大约5种或更多，更优选大约2种至大约5种化合物。下文详细讨论了优选的酵母宿主。

本领域技术人员应当领会，重组DNA技术的使用可以改进所转染的核酸分子的表达控制，通过例如操作宿主细胞内的核酸分子的拷贝数、转录那些核酸分子的效率、翻译所得转录物的效率、和翻译后修饰的效率。另外，可以基因工程改造启动子序列以改进与天然启动子相比的表达水平。可用于控制核酸分子表达的重组技术包括但不限于将核酸分子整合入一个或多个宿主细胞染色体、将载体稳定性序列添加至质粒、转录控制信号（例如启动子、

操纵基因、增强子)的替代或修饰、翻译控制信号(例如核糖体结合位点、Kozak序列、Shine-Dalgarno序列)的替代或修饰、修饰核酸分子以符合宿主细胞的密码子用法、和删除使转录物不稳定的序列。

融合蛋白

如上文所讨论的,可以构建用于本发明各种实施方案的融合蛋白,包括如下融合蛋白,所述融合蛋白包含至少一种包含第76位突变残基(或者第73位、第74位、第75位、第77位或第78位突变残基或者本文所述任何组合)(如上述,第76位是相对于野生型哺乳动物的特别是人或鼠的Ras氨基酸序列而表示的)的Ras肽或蛋白质的融合蛋白,而且所述融合蛋白还可包含其它的包含已知在某些癌症中突变的其它残基突变的Ras肽或蛋白质。此类融合物还可包含Ras以外的抗原或其部分,包括其它癌抗原和包括与癌症有关的其它蛋白质的各种突变体。本发明还涵盖编码此类融合蛋白的核酸分子。

在一方面中,设计成在酵母媒介中稳定表达异源蛋白和/或防止所表达异源蛋白翻译后修饰的融合蛋白中包括本发明的基于Ras的蛋白质和肽,包括上文所述不同Ras蛋白和肽和/或其它蛋白质和肽的组合。此类融合蛋白一般记载于PCT公开号WO 2004/058157 A2,将其完整收入本文作为参考。这些融合蛋白最典型的是由酵母媒介(例如完整酵母或酵母原生质球,其可以任选地进一步加工成酵母胞质、酵母菌蛻、或酵母膜提取物或其级分,如下文所描述的)表达为重组蛋白,尽管本发明的一个实施方案是可以将一种或多种此类融合蛋白加载入酵母媒介或如下文所述以其它方式与酵母媒介复合或混合以形成可用于本发明的疫苗或组合物。

可用于本发明的一种此类融合蛋白是包含下列各项的融合蛋白:(a)至少一种包含本文所述第76位突变的Ras抗原(包括肽或蛋白质);和(b)合成肽。在一个实施方案中,可用于本发明的融合蛋白包含本文以SEQ ID NO:14所示的融合蛋白。在另一个实施方案中,可用于本发明的融合蛋白包含本文以SEQ ID NO:15所示的融合蛋白。

在一个实施方案中,将合成肽连接至抗原的N末端,所述肽由至少两个对于所述抗原而言是异源的氨基酸残基组成,其中所述肽稳定融合蛋白在酵母媒介中的表达或防止所表达融合蛋白的翻译后修饰。所述合成肽和所述抗原N末端部分一起形成具有下列要求的融合蛋白:(1)融合蛋白第1位氨基酸

残基是甲硫氨酸（即合成肽的第一个氨基酸是甲硫氨酸）；（2）融合蛋白第2位氨基酸残基不是甘氨酸或脯氨酸（即合成肽的第二个氨基酸不是甘氨酸或脯氨酸）；（3）融合蛋白的第2-6位氨基酸残基无一是甲硫氨酸（即第2-6位氨基酸（无论是合成肽或者是蛋白质的一部分，如果合成肽短于6个氨基酸的话）不包括甲硫氨酸）；和（4）融合蛋白的第2-6位氨基酸残基无一是赖氨酸或精氨酸（即第2-6位氨基酸（无论是合成肽或者是蛋白质的一部分，如果合成肽短于5个氨基酸的话）不包括赖氨酸或精氨酸）。合成肽可以短至2个氨基酸，但是更优选至少2-6个氨基酸（包括3个、4个、5个氨基酸），而且可以长于6个氨基酸，为整数，多至大约200个氨基酸、300个氨基酸、400个氨基酸、500个氨基酸、或更多。

在一个实施方案中，融合蛋白包含氨基酸序列M-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆，其中M是甲硫氨酸；其中X₂是除了甘氨酸、脯氨酸、赖氨酸或精氨酸之外的任何氨基酸；其中X₃是除了甲硫氨酸、赖氨酸或精氨酸之外的任何氨基酸；其中X₄是除了甲硫氨酸、赖氨酸或精氨酸之外的任何氨基酸；其中X₅是除了甲硫氨酸、赖氨酸或精氨酸之外的任何氨基酸；且其中X₆是除了甲硫氨酸、赖氨酸或精氨酸之外的任何氨基酸。在一个实施方案中，X₆残基是脯氨酸。增强抗原在酵母细胞中表达的稳定性和/或防止蛋白质在酵母中的翻译后修饰的一种例示性合成序列包括序列M-A-D-E-A-P (SEQ ID NO:1)。MADEAP序列可以与所述抗原以外的其它抗原一起使用。在增强表达产物的稳定性以外，此融合配偶不表现出对针对构建物中的疫苗接种用抗原的免疫应答有不利影响。另外，合成融合肽可以设计成提供可以受到选择剂（诸如抗体）识别的表位。

在本发明的另一个实施方案中，编码本发明中所使用的合成肽翻译起始位点的核酸是符合Kozak翻译序列法则的A-C-C-A-T-G-G，其中该序列中的ATG就是最初的翻译起始位点并编码M-A-D-E-A-P (SEQ ID NO:1)的甲硫氨酸。应当理解，本文所述的本发明各个实施方案还可以进行组合。例如，在本发明的一个方面，若合成肽是M-A-D-E-A-P (SEQ ID NO:1)，则编码该肽的起始位点的核酸可以是A-C-C-A-T-G-G。本发明实施方案的各种其它组合对于本领域技术人员是显而易见的。

在本发明的一个方面，对酵母媒介进行操作，使得抗原通过所表达抗原产物的递送或易位而部分的或完全的在酵母媒介表面上表达或提供（胞外表

达)。用于实现本发明这个方面的一种方法是使用间隔臂将一种或多种抗原定位在酵母媒介的表面上。使用间隔臂的一种方式创建感兴趣抗原与将该抗原靶向至酵母细胞壁的蛋白质的融合蛋白。例如,可使用的一种蛋白质是使得抗原能够靶向至酵母细胞壁,从而使得抗原定位在酵母表面上的酵母蛋白质(例如细胞壁蛋白质2(cwp2)、Aga2、Pir4或Flo1蛋白质)。可以使用酵母蛋白质以外的蛋白质作为间隔臂;然而,对于任何间隔臂蛋白质,最希望免疫原性应答针对靶抗原而非间隔臂蛋白质。因此,如果使用其它蛋白质作为间隔臂,那么所使用的间隔臂蛋白质不应如下针对间隔臂蛋白质自身的免疫应答,其大得使得针对靶抗原的免疫应答被淹没。本领域技术人员应当致力于针对间隔臂蛋白质的免疫应答小于针对靶抗原的免疫应答。

用于定位靶抗原使其在酵母表面上暴露的另一种方法是利用信号序列诸如糖基磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidyl inositol, GPI)将靶物锚定至酵母细胞壁。或者,定位可以通过附加使感兴趣抗原经易位入内质网(ER)而靶向入分泌途径的信号序列,使得抗原与结合至细胞壁的蛋白质(例如cwp)结合来实现。

一方面,间隔臂蛋白质是酵母蛋白质。酵母蛋白质可以由介于大约2个和大约800个氨基酸之间的酵母蛋白质组成。在一个实施方案中,酵母蛋白质是大约10-700个氨基酸。在另一个实施方案中,酵母蛋白质是大约40-600个氨基酸。本发明的其它实施方案包括至少250个氨基酸、至少300个氨基酸、至少350个氨基酸、至少400个氨基酸、至少450个氨基酸、至少500个氨基酸、至少550个氨基酸、至少600个氨基酸、或至少650个氨基酸的酵母蛋白质。在一个实施方案中,酵母蛋白质的长度是至少450个氨基酸。

在另一个实施方案中,酵母蛋白质稳定融合蛋白在酵母媒介中的表达,防止所表达融合蛋白的翻译后修饰,和/或靶向融合蛋白至酵母中的特定隔室(例如表达在酵母细胞表面上)。为了递送入酵母分泌途径,待使用的例示性的酵母蛋白质包括但不限于:Aga(包括但不限于Aga1和/或Aga2);SUC2(酵母转化酶); α 因子信号前导序列;CPY;Cwp2p,利用其在细胞壁中的定位和保持;BUD基因,利用子细胞形成的初始阶段中在酵母细胞芽处的定位;Flo1p;Pir2p;和Pir4p。

在本发明的另一个方面,可以使用其它序列来进行蛋白质对酵母媒介其它部分的靶向、保持和/或稳定,例如在胞质溶胶或线粒体中。可用于任何上

述实施方案的合适酵母蛋白质的例子包括但不限于SEC7；磷酸烯醇丙酮酸羧激酶PCK1、磷酸甘油激酶PGK和磷酸丙糖异构酶TPI基因产物，利用其在葡萄糖中的可抑制表达和胞质溶胶定位；热休克蛋白SSA1、SSA3、SSA4、SSC1，其表达是诱导性的而且其蛋白质在细胞暴露于热处理时是更加热稳定的；线粒体蛋白质CYC1，利用输入线粒体；ACT1。

抗体和抗原结合肽

本发明的一个实施方案涉及选择性结合具有本文所述E76突变的Ras蛋白或肽的抗体或抗原结合肽，所述E76突变包括但不限于E76G突变、E76K突变和/或E76Q突变。本发明的其它实施方案涉及如下抗体或抗原结合肽，其选择性结合具有第73位、第74位、第75位、第77位或第78位中的任何一个或多个的突变的Ras蛋白，或者包括上文所述Ras突变的任何组合的Ras，特别是第12位和/第13位突变与第59位、第61位、第73位、第74位、第75位、第76位、第77位和/或第78位突变的任何组合。抗体的特征在于它们包含免疫球蛋白结构域，因此它们是免疫球蛋白类蛋白质超家族的成员。本发明的抗体包括多克隆抗体和单克隆抗体、二价抗体和单价抗体、双特异性抗体或多特异性抗体、含有此类抗体的血清、已经纯化至不同程度的抗体、及完整抗体的任何功能等同物。本发明的分离的抗体可以包括含有此类抗体的血清或已经纯化至不同程度的抗体。本发明的完整抗体可以是多克隆的或单克隆的。或者，本发明中还可以采用完整抗体的功能等同物，诸如抗原结合片段，其中一个或多个抗体结构域是截短的或缺失的（例如Fv、Fab、Fab'或F(ab)₂片段），以及基因工程抗体或其抗原结合片段，包括单链抗体或者可结合超过一个/一种表位的抗体（例如双特异性抗体）或可结合一个或多个/一种或多种不同抗原的抗体（例如双特异性抗体或多特异性抗体）。

本发明的基因工程抗体包括由标准重组DNA技术产生的那些，所述标准重组DNA技术牵涉操作和再表达编码抗体可变区和/或恒定区的DNA。具体的实例包括嵌合抗体，其中抗体的VH和/或VL结构域与抗体的剩余部分来自不同的来源，和CDR嫁接抗体（及其抗原结合片段），其中至少一种CDR序列和任选的至少一种可变区框架氨基酸衍生自同一来源而可变区和恒定区（在适当时）的剩余部分衍生自不同来源。嵌合抗体和CDR嫁接抗体的构建记载于例如欧洲专利申请：EP-A 0194276、EP-A 0239400、EP-A 0451216和

EP-A 0460617。

一般地，在抗体的产生中，将合适的实验动物，诸如例如但不限于家兔、绵羊、仓鼠、豚鼠、小鼠、大鼠或鸡暴露于希望得到针对它的抗体的抗原。典型地，给动物免疫接种，即将有效量的抗原注射入动物。有效量的抗原指诱导动物产生抗体所需要的量。然后使动物免疫系统在预定的时段内做出响应。可以重复免疫接种过程，直至发现免疫系统产生针对抗原的抗体。为了获得抗原特异性的多克隆抗体，自包含期望抗体的动物收集血清（或者在鸡的情况中，可以从鸡蛋中收集抗体）。此类血清可用作试剂。多克隆抗体可以从血清（或鸡蛋）中进一步纯化，例如通过用硫酸铵处理血清。

单克隆抗体可依照Kohler和Milstein (Nature 256:495-497, 1975)的方法来产生。例如，将B淋巴细胞从经免疫接种的动物的脾（或任何合适组织）中回收，然后与骨髓瘤细胞融合以获得能够在合适培养基中连续生长的杂交瘤细胞群体。通过测试由杂交瘤所产生的抗体结合期望抗原的能力来选择产生期望抗体的杂交瘤。

本发明还延伸至非抗体多肽（有时称为结合配偶体），其设计成特异性结合和在适当时或是激活或是抑制本发明的突变型Ras蛋白。此类多肽（其具有指定的配体特异性）的设计的实例见Beste等，Proc. Natl. Acad. Sci. 96:1898-1903, 1999（完整收入本文作为参考）。

小分子、构象拮抗剂和其它化合物

本发明还包括小分子化合物（例如利用发明人所发现的突变型Ras的药物发现产物），诸如GTP水解的构象拮抗剂或激动剂。在一个实施方案中，此类化合物可以是能够与突变型Ras蛋白相互作用以触发GTP水解的Ras-GAP模拟物或修饰形式。在另一个实施方案中，此类化合物可以直接与Ras-GAP相互作用以使内源Ras-GAP蛋白适于在Ras突变体（诸如本文所描述的那些）中触发GTP水解。优选地，此类化合物不触发野生型（未突变的或非致瘤性的）Ras的GTP水解，使得该化合物更有效的作为肿瘤特异性化合物。

此类药剂可以获自例如分子多样性策略(molecular diversity strategy)（容许快速构建大型化学多样性分子文库的相关策略的组合）；天然化合物或合成化合物的文库，特别是化学或组合文库（即序列或大小不同但具有相同构

件的化合物的文库); 或者通过理性药物设计。参见例如Maulik等, 1997, *Molecular Biotechnology: Therapeutic Applications and Strategies*, Wiley-Liss, Inc., 完整收入本文作为参考。由药物设计方法最初鉴定的候选化合物可以针对调控GTP水解或充当本文所描述突变型Ras蛋白的构象拮抗剂的能力进行筛选。

在分子多样性策略中, 使用生物学的、酶的和/或化学的方法从例如肽、寡核苷酸、碳水化合物和/或合成有机分子合成大型化合物文库。开发分子多样性策略时的关键参数包括亚基多样性、分子大小、和文库多样性。筛选此类文库的一般目标是利用组合选择的连续应用来获得针对期望靶物的高亲和力和配体, 然后通过随机的或定向的设计策略来优化引导分子(lead molecule)。分子多样性的方法详细记载于Maulik等, 见上文。

在理性药物设计规程中, 可以通过例如核磁共振(NMR)或X射线晶体学来分析调节性化合物的三维结构。然后通过例如计算机建模将此三维结构用于预测潜在化合物(诸如潜在调节剂)的结构。可以使用所预测的化合物结构来优化所衍生的引导化合物, 例如通过分子多样性方法。另外, 所预测的化合物结构可以通过例如化学合成、重组DNA技术、或从天然来源(例如植物、动物、细菌和真菌)分离模拟表位(mimotope)来产生。

基于结构的药物设计的各种其它方法披露于Maulik等, 1997, 见上文。Maulik等人披露了例如定向设计方法, 其中使用者引导从适当选择片段的片段文库中产生新分子的过程; 随机设计, 其中使用者使用遗传算法或其它算法以随机突变片段和它们的组合, 同时应用选择标准以评估候选配体的适合度; 和基于栅格(grid)的方法, 其中使用者计算三维受体结构和小片段探针之间的相互作用能量, 接着将有利的探针位点联系在一起。

组合物和疫苗

如上文所讨论的, 本发明的一个实施方案涉及组合物或疫苗, 其包括上文所讨论的突变型Ras蛋白、编码突变型Ras蛋白的核酸分子、或任何治疗性核酸(例如适体、核酶、RNAi)或肽或小分子(例如构象拮抗剂、GTP水解激动剂)。本发明包括如下实施方案, 其中本文所述突变型Ras蛋白可用在“常规的”组合物或疫苗中或者与基于酵母的疫苗联用(记载于下文美国专利No. 5,830,463和7,083,787以及美国专利公开No. 2004-0156858A1和2006-0110755

A1)。任一类型的组合物或疫苗可以在任何本文所述突变型Ras蛋白(例如具有第76位突变的Ras蛋白或肽,优选E76G、E76K或E76Q突变,或者Ras E76突变与另一突变诸如G12突变的组合)以外包括药学可接受载体。在用于本文时,药学可接受载体指适于将可用在本发明方法中的突变型Ras蛋白递送至合适的体内或离体位点的任何物质或媒介。此类载体可以包括但不限于佐剂、赋形剂、或任何其它类型的递送媒介或载体。

依照本发明,佐剂典型地是通常增强动物对特定抗原的免疫应答的物质。合适的佐剂包括但不限于弗氏佐剂;其它细菌细胞壁组分;基于铝的盐;基于钙的盐;硅土(silica);多核苷酸;类毒素;血清蛋白质;病毒外壳蛋白;其它细菌衍生的制备物; γ 干扰素;嵌段共聚物佐剂,诸如亨特(Hunter)氏Titermax佐剂(CytRxTM, Inc. Norcross, GA);Ribi佐剂(可从Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT获得);和皂苷及其衍生物,诸如Quil A(可从Superfos Biosector A/S, Denmark获得)。

载体典型地是延长治疗性组合物在所治疗动物中的半衰期的化合物。合适的载体包括但不限于多聚体可控释放配制剂、生物可降解埋植剂、脂质体、油、酯、和二醇。

本发明的治疗性组合物(包括疫苗)还可以含有一种或多种药学可接受赋形剂。在用于本文时,药学可接受赋形剂指适于将可用于本发明方法的治疗性组合物递送至合适的体内或离体位点的任何物质。优选的药学可接受赋形剂能够使组合物(或一些实施方案中的酵母媒介或包含酵母媒介的树突细胞)维持这样一种形式,即使得组合物在到达身体内的靶细胞、组织、或位点时,该组合物能够在靶位点引发免疫应答(注意,靶位点可以是全身性的)。本发明的合适的赋形剂包括转运但不是特异性地将疫苗靶向至某位点的赋形剂或配制剂(本文中也可称作非寻靶载体)。药学可接受赋形剂的例子包括但不限于水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液、含血清溶液、Hank氏液、其它水性生理学平衡溶液、油、酯、和二醇。水性载体可包含通过例如提高化学稳定性和等渗性从而接近受者生理学疾患所需的合适的辅助物质。合适的辅助物质包括例如乙酸钠、氯化钠、乳酸钠、氯化钾、氯化钙、及用于产生磷酸盐缓冲液、Tris缓冲液和碳酸氢盐缓冲液的其它物质。辅助物质还可包括防腐剂,诸如硫柳汞、间甲酚或邻甲酚、福尔马林和苯甲醇(benzol alcohol)。

本发明的治疗性组合物或疫苗的一种成分包括至少一种用于给动物疫苗接种的抗原，具体是至少一种包含Ras蛋白至少一部分的抗原，其包含本文所述第76位突变。如果需要，组合物或疫苗可以包括一个/种、两个/种、一些、数个/种、或多个/种抗原，其包括一种或多种抗原的一个或多个免疫原性结构域。依照本发明，适用于本发明组合物或疫苗的抗原可以包含两个/种或多个/种来自相同抗原的免疫原性结构域或表位，两个/种或多个/种来自相同细胞、组织或生物体的抗原、免疫原性结构域、或表位，或者两个/种或多个/种来自不同细胞、组织或生物体的不同抗原、免疫原性结构域、或表位。优选地，抗原对于酵母菌株是异源的（即不是由酵母菌株在缺乏基因操作或生物学操作时天然产生的蛋白质）。上文已经描述了可用在常规疫苗或组合物中的或与本发明的酵母媒介一起使用的优选的突变型Ras蛋白和优选的融合蛋白。

在本发明的一个实施方案中，组合物或疫苗还可包括生物学应答改性剂化合物，或产生此类改性剂的能力（即通过使用编码此类改性剂的核酸分子的转染），尽管此类改性剂在使用酵母媒介时不是实现强力免疫应答所必需的（在下文讨论）。生物学应答改性剂指可以调控免疫应答的化合物。某些生物学应答改性剂可以刺激保护性免疫应答，而其它生物学应答改性剂可以抑制有害的免疫应答。某些生物学应答改性剂优先增强细胞介导的免疫应答，而其它生物学应答改性剂优先增强体液免疫应答（即可以刺激这样的免疫应答，其中细胞免疫力的水平高于体液免疫力的水平，反之亦然）。本领域技术人员知道许多技术来测量免疫应答的刺激或抑制，以及区别细胞免疫应答与体液免疫应答。

合适的生物学应答改性剂包括细胞因子、激素、脂质衍生物、小分子药物和其它生长调控剂，诸如但不限于白介素2 (IL-2)、白介素4 (IL-4)、白介素10 (IL-10)、白介素12 (IL-12)、干扰素 γ (IFN- γ)、胰岛素样生长因子I (IGF-I)、转化生长因子 β (TGF- β)、类固醇、前列腺素和白三烯。其它合适的生物学应答改性剂包括但不限于：抗CTLA-4抗体（例如为了释放无变应性T细胞）；T细胞共刺激物（例如抗CD137、抗CD28、抗CD40）；alemtuzumab（例如CamPath®）、denileukin diftitox（例如ONTAK®）、抗CD4、抗CD25、抗PD-1、抗PD-L1、抗PD-L2或阻断FOXP3的药剂（例如为了消除活性/杀死CD4⁺/CD25⁺ T调节细胞）；Flt3配体、咪喹莫特(imiquimod)（AldaraTM）、

GM-CSF、沙格司亭(sargramostim) (Leukine®)、Toll样受体 (TLR) -7激动剂、或TLR-9激动剂 (例如提高树突细胞、巨噬细胞和其它专门抗原呈递细胞的数目或活化状态的药剂)。此类生物学应答改性剂在本领域是众所周知的且公众可获得的。

基于酵母的疫苗或组合物

本发明的一个方面涉及组合物或基于酵母的疫苗, 其包含 (a) 酵母媒介; 和 (b) 包含至少一种本文所述突变型Ras蛋白或肽 (例如具有第76位突变的Ras蛋白, 或者包含E76突变和另一Ras突变 (诸如G12突变) 的蛋白质或蛋白质组合) 的抗原, 或由该酵母媒介所表达的本文所述多种表位或抗原或融合蛋白。如上文所讨论的, 在E76突变以外, 本发明还涵盖第73位、第74位、第75位、第77位或第78位的任何一个或多个的突变, 或上文所述Ras突变的任何组合, 特别是第12位和/或第13位突变与第59位、第61位、第73位、第74位、第75位、第76位、第77位和/或第78位突变的任何组合。

依照本发明, 酵母媒介指可以与抗原联合用于本发明的疫苗或治疗性组合物、或者用作佐剂的任何酵母细胞 (例如完整细胞) 或其衍生物 (见下文)。酵母媒介因此可以包括但不限于活的完整酵母微生物 (即具有其所有成分 (包括细胞壁) 的酵母细胞)、杀死的 (死的) 完整酵母微生物、或其衍生物, 包括酵母原生质球 (即缺乏细胞壁的酵母细胞)、酵母胞质 (即缺乏细胞壁和细胞核的酵母细胞)、酵母菌蛻 (即缺乏细胞壁、细胞核和细胞质的酵母细胞)、酵母细胞壁制备物、或亚细胞酵母膜提取物或其级分 (也称为酵母膜颗粒, 先前称为亚细胞酵母颗粒)。

酵母原生质球通常通过酵母细胞壁的酶促消化来产生。此类方法记载于例如Franzusoff等, 1991, *Meth. Enzymol.* 194:662-674 (完整收入本文作为参考)。

酵母胞质通常通过对酵母细胞去核来生成。此类方法记载于例如Coon, 1978, *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 48:45-55 (完整收入本文作为参考)。

酵母菌蛻通常通过将经透化或溶解的细胞重新密封(reseal)来生成, 可以而非必须包含该细胞的至少一些细胞器。此类方法记载于例如Franzusoff等, 1983, *J. Biol. Chem.* 258:3608-3614和Bussey等, 1979, *Biochim. Biophys. Acta* 553:185-196 (将每一篇都完整收入本文作为参考)。

酵母膜颗粒（亚细胞酵母膜提取物或其级分）指缺乏天然细胞核或细胞质的酵母膜。该颗粒可以是任何大小的，包括从天然酵母膜的大小至通过超声处理或本领域技术人员知道的其它膜破坏方法继以重新密封来产生的微颗粒的大小的范围。用于产生亚细胞酵母膜提取物的一种方法记载于例如Franzusoﬀ等, 1991, *Meth. Enzymol.* 194:662-674。还可以使用包含酵母膜部分和（在制备酵母膜颗粒前由酵母重组表达抗原时）感兴趣抗原的酵母膜颗粒级分。抗原可以在膜内、在膜的表面上、或其组合（即该抗原既有膜内的又有膜外的，和/或跨越酵母膜颗粒的膜）运载。在一个实施方案中，酵母膜颗粒是重组酵母膜颗粒，其可以是完整的、遭到破坏的、或遭到破坏并重新密封的酵母膜，其在膜的表面上包含至少一种期望抗原或至少部分包埋在膜内。

酵母细胞壁制备物的一个例子是在其表面上携带抗原或至少部分包埋在细胞壁内的分离的酵母细胞壁，使得酵母细胞壁制备物在施用于动物时刺激针对传染剂的期望（例如保护性的）免疫应答。

任何酵母菌株都可用于产生本发明的酵母媒介。酵母是属于下列三个纲之一的单细胞微生物：子囊菌纲(*Ascomycetes*)、担子菌纲(*Basidiomycetes*)和不完全菌纲(*Fungi Imperfecti*)。关于选择用作免疫调控剂的酵母类型的一项主要考虑是酵母的病原性。在一个实施方案中，酵母是非病原性菌株，诸如啤酒糖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。非病原性酵母菌株选择成使对接受酵母媒介施用的个体的任何不利效应最小化。然而，如果酵母的病原性可以通过本领域技术人员知道的任何手段（例如突变株）来消除，那么可以使用病原性酵母。虽然病原性酵母菌株或其非病原性突变株过去已经用作佐剂或生物学应答改性剂，而且可依照本发明使用，但是非病原性酵母菌株是优选的。

优选的酵母菌株属包括糖酵母属(*Saccharomyces*)、假丝酵母属(*Candida*)（其可以是病原性的）、隐球酵母属(*Cryptococcus*)、汉逊酵母属(*Hansenula*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、红酵母属(*Rhodotorula*)、裂殖糖酵母属(*Schizosaccharomyces*)和亚罗酵母属(*Yarrowia*)，其中糖酵母属、假丝酵母属、汉逊酵母属、毕赤酵母属和裂殖糖酵母属是更加优选的，而且糖酵母属是特别优选的。优选的酵母菌株种包括啤酒糖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、卡尔斯伯糖酵母(*Saccharomyces carlsbergensis*)、白色假丝酵母

(*Candida albicans*)、乳酒假丝酵母(*Candida kefir*)、热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)、罗伦氏隐球酵母(*Cryptococcus laurentii*)、新型隐球酵母(*Cryptococcus neoformans*)、异常汉逊酵母(*Hansenula anomala*)、多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)、脆壁克鲁维酵母(*Kluyveromyces fragilis*)、乳克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、马克思克鲁维酵母乳变种(*Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*)、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、深红酵母(*Rhodotorula rubra*)、粟酒裂殖糖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、和脂肪溶解亚罗酵母(*Yarrowia lipolytica*)。应当领会，这些物种中的许多包括多种亚种、型、亚型等，它们意图包括在上述物种内。更优选的酵母种包括啤酒糖酵母、白色假丝酵母、多形汉逊酵母、巴斯德毕赤酵母和粟酒裂殖糖酵母。啤酒糖酵母是特别优选的，因为它相对易于操作而且用作食品添加剂是“公认是安全的”(Generally Recognized As Safe或GRAS)(GRAS, 1997年4月17日FDA建议的规则62FR18938)。本发明的一个实施方案是能够复制质粒至特别高的拷贝数的酵母菌株，诸如啤酒糖酵母 cir^0 株。该啤酒糖酵母菌株是这样一种菌株，其能够支持表达载体，容许一种或多种靶抗原和/或抗原融合蛋白以高水平表达。另外，任何突变酵母株都可用于本发明，包括那些展现出所表达靶抗原的翻译后修饰降低，诸如延伸N-连接的糖基化的酶中有突变的。

在一个实施方案中，本发明的优选酵母媒介能够与接受酵母媒介和抗原递送的细胞类型(诸如树突细胞或巨噬细胞)融合，由此实现特别有效的将酵母媒介和(在许多实施方案中)抗原递送至该细胞类型。在用于本文时，酵母媒介与靶细胞类型的融合指酵母细胞膜或其颗粒与靶细胞类型(例如树突细胞或巨噬细胞)的膜融合而导致合胞体形成的能力。在用于本文时，合胞体指通过细胞合并而生成的多核原生质块。许多病毒表面蛋白(包括免疫缺陷病毒诸如HIV、流感病毒、脊髓灰质炎病毒和腺病毒的那些)和其它促融剂(fusogen)(诸如那些牵涉卵子与精子间融合的)已经显示出能够实现两种膜之间(即病毒与哺乳动物细胞膜之间或哺乳动物细胞膜之间)的融合。例如，在其表面上生成HIV gp120/gp41异源抗原的酵母媒介能够与CD4⁺ T淋巴细胞融合。然而，应当注意，将寻靶模块掺入酵母媒介不是必需的，尽管这可能是有些情况中所期望的。先前已经显示了本发明的酵母媒介易于由树突细胞(以及其它细胞，诸如巨噬细胞)摄取。

依照本发明，术语“酵母媒介-抗原复合物”或“酵母-抗原复合物”一

般用于描述酵母媒介与抗原的任何联合体。此类联合体包括由酵母（重组酵母）表达抗原、将抗原导入酵母、抗原物理附着至酵母、和酵母与抗原混合在一起，诸如在缓冲液或其它溶液或配制剂中。这些类型的复合物在下文中有详细描述。

在一个实施方案中，将用于制备酵母媒介的酵母细胞用编码抗原的异源核酸分子来转染，使得该酵母细胞表达该抗原。此类酵母在本文中也称为重组酵母或重组酵母媒介。然后可以将酵母细胞作为完整细胞加载入树突细胞，或者可以将酵母细胞杀死，或者可以将它衍生化，诸如通过形成酵母原生质球、胞质、菌蛻、或亚细胞颗粒，在任何这些之后将衍生物加载入树突细胞。还可以将酵母原生质球直接用重组核酸分子转染（例如从完整酵母生成原生质球，然后转染）以产生表达抗原的重组原生质球。

在一方面，将用于制备酵母媒介的酵母细胞或酵母原生质球用编码抗原的重组核酸分子转染，使得该酵母细胞或酵母原生质球重组表达该抗原。在这方面，使用重组表达抗原的酵母细胞或酵母原生质球来生成酵母媒介，其包含酵母胞质、酵母菌蛻、或酵母膜颗粒或酵母细胞壁颗粒，或其级分。

一般而言，酵母媒介和抗原可以通过本文所述任何技术来联合。在一方面，给酵母媒介胞内加载抗原。在另一方面，将抗原共价或非共价附着至酵母媒介。在又一方面，酵母媒介和抗原通过混合来联合。在另一方面，和在优选的实施方案中，由酵母媒介或者由衍生该酵母媒介的酵母细胞或酵母原生质球重组表达抗原。

本发明的酵母媒介中抗原的表达使用本领域技术人员知道的技术来实现。简言之，以这样一种方式将编码至少一种期望抗原的核酸分子插入表达载体，使得该核酸分子与转录控制序列可操作连接，从而在转化入宿主酵母细胞后能够实现核酸分子的组成性的或受调节的表达。编码一种或多种抗原的核酸分子可以在一种或多种表达载体上，可操作连接至一种或多种表达控制序列。特别重要的表达控制序列是那些控制转录起始的，诸如启动子和上游激活序列。任何合适的酵母启动子可以用于本发明，而且多种此类启动子是本领域技术人员知道的。用于在啤酒糖酵母中表达的优选启动子包括但不限于编码如下酵母蛋白质的基因的启动子：醇脱氢酶I (ADH1)或II (ADH2)、CUP1、磷酸甘油激酶(PGK)、磷酸丙糖异构酶(TPI)、翻译延长因子EF-1 α (TEF2)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH; 也称为TDH3, 即磷酸丙糖脱氢酶)、

半乳糖激酶(GAL1)、半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶(GAL7)、UDP-半乳糖差向异构酶(GAL10)、细胞色素 c_1 (CYC1)、Sec7蛋白(SEC7)和酸性磷酸酶(PHO5),更优选杂合启动子,诸如ADH2/GAPDH和CYC1/GAL10启动子,甚至更优选ADH2/GAPDH启动子(其在细胞中的葡萄糖浓度低时(例如大约0.1%至大约0.2%)被诱导)以及CUP1启动子和TEF2启动子。同样的,知道许多上游激活序列(UAS),也称为增强子。用于在啤酒糖酵母中表达的优选上游激活序列包括但不限于编码如下蛋白质的基因的UAS: PCK1、TPI、TDH3、CYC1、ADH1、ADH2、SUC2、GAL1、GAL7和GAL10,以及由GAL4基因产物激活的其它UAS,特别优选ADH2 UAS。因为ADH2 UAS受ADR1基因产物激活,所以优选在异源基因可操作连接至ADH2 UAS时过表达ADR1基因。用于在啤酒糖酵母中表达的优选转录终止序列包括 α -因子、GAPDH、和CYC1基因的终止序列。

用于在甲基营养型酵母中表达基因的优选转录控制序列包括编码醇氧化酶和甲酸脱氢酶的基因的转录控制区。

用于由酵母胞外表达抗原的优化考虑和方法在本文中先前有详细描述。

将核酸分子转染入依照本发明的酵母细胞可以通过将核酸分子施用入细胞的任何方法来实现,包括但不限于扩散、主动转运、超声浴、电穿孔、显微注射、脂转染、吸附、和原生质体融合。使用本领域技术人员知道的技术,可以使所转染的核酸分子整合入酵母染色体或保留在染色体外载体上。携带此类核酸分子的酵母媒介的例子在本文中有详细描述。如上所述,酵母胞质、酵母菌蛻、和酵母膜颗粒或细胞壁制备物还可以如下重组生产,即使用本领域技术人员知道的技术,将完整的酵母微生物或酵母原生质球用期望核酸分子转染,在其中生成抗原,然后进一步操作微生物或原生质球,以生成包含期望抗原的胞质、菌蛻或亚细胞酵母膜提取物或其级分。

产生重组酵母媒介和由酵母媒介表达抗原的有效条件包括可以培养酵母菌株的有效培养基。有效培养基通常是水性培养基,其包含可同化的碳水化合物源、氮源和磷酸盐源,以及适宜的盐、矿物质、金属和其它养分,诸如维生素和生长因子。培养基可以包含复合营养素,或者可以是确定成分的极限培养基。本发明的酵母菌株可以在多种容器中培养,包括但不限于生物反应器、锥形烧瓶、试管、微量滴定皿、和皮氏培养皿。培养在适合酵母菌株的温度、pH和氧含量进行。此类培养条件在本领域普通技术人员的专业知

识内(参见例如Guthrie等编, 1991, *Methods in Enzymology*, vol. 194, Academic Press, San Diego)。

在本发明的有些方面, 特别是在期望诱导体液免疫应答的实施方案中在期望具有充分的抗原表面表达或提供时, 将酵母在pH维持在中性的培养基中培养。在用于本文时, 术语“中性pH”的一般使用指pH范围介于约pH 5.5和约pH 8之间, 优选介于约pH 6和约pH 8之间。本领域技术人员应当领会, 在用pH计进行测量时可发生较小的波动(例如十分之几或百分之几)。因此, 中性pH对于培养酵母细胞的应用意味着在培养酵母细胞的大部分时间里在中性pH中培养它们。优选地, 将酵母在pH水平维持在至少5.5的培养基中培养, 即培养液的pH不容许降至pH 5.5以下。中性pH在培养酵母中的应用促进了数项生物学效应, 它们是使用酵母作为免疫调控媒介的期望特征。

在本发明的一个实施方案中, 作为在酵母媒介中重组表达抗原的替代, 给酵母媒介胞内加载蛋白质或肽抗原, 或者碳水化合物或其它充当抗原的分子。随后, 现在胞内包含抗原的酵母媒介可以施用于患者或加载入载体诸如树突细胞(下文所述)。在用于本文时, 肽包含少于或等于约30-50个氨基酸的氨基酸序列, 而蛋白质包含多于大约30-50个氨基酸的氨基酸序列; 蛋白质可以是多聚体的。可用作抗原的蛋白质或肽可以小至T细胞表位(即长度大于5个氨基酸)和大于它、包含多个表位、蛋白质片段、全长蛋白质、嵌合蛋白或融合蛋白的任何合适大小。肽和蛋白质可以进行天然或合成衍生化; 此类修饰包括但不限于糖基化、磷酸化、乙酰化、肉豆蔻酰化、异戊二烯化(prenylation)、棕榈化(palmitoylation)、酰胺化、和/或添加甘油磷脂酰肌醇。肽和蛋白质可以通过本领域技术人员知道的技术直接插入本发明的酵母媒介, 诸如通过扩散、主动转运、脂质体融合、电穿孔、吞噬作用、冻融循环和超声浴。可以直接加载肽、蛋白质、碳水化合物、或其它分子的酵母媒介包括完整酵母, 以及原生质球、菌蛻或胞质, 它们可以在生成后但是在加载入树突细胞前加载抗原。或者, 可以给完整酵母加载抗原, 然后由其制备原生质球、菌蛻、胞质、或亚细胞颗粒。在此实施方案中可以将任何数目的抗原加载入酵母媒介, 从至少1、2、3、4个/种或任何整数直至数百或数千个/种抗原, 诸如例如通过加载微生物、通过加载哺乳动物肿瘤细胞、或其部分会提供的。

在本发明的另一个实施方案中, 将抗原物理附着至酵母媒介。抗原对酵

母媒介的物理附着可以通过本领域的任何适合方法来实现,包括共价和非共价的结合方法,包括但不限于化学交联抗原至酵母媒介的外表面或生物学连接抗原至酵母媒介的外表面,诸如通过使用抗体或其它结合配偶。化学交联可以通过例如包括以下各项的方法来实现:戊二醛连接、光亲和标记、碳二亚胺处理、能够连接二硫键的化学药品的处理、和本领域的其它标准交联化学药品的处理。或者,可以使化学药品接触酵母媒介,改变酵母膜的脂双层的电荷或细胞壁的组成,使得酵母的外表面更有可能融合或结合具有特定电荷特征的抗原。结合肽、可溶性受体和其它配体的靶向剂(诸如抗体)也可掺入抗原作为融合蛋白或以其它方式与抗原联合用于将抗原结合至酵母媒介。

在又一个实施方案中,酵母媒介和抗原通过更被动的、非特异性的或非共价的结合机制彼此联合,诸如通过在缓冲液或其它合适配制剂(例如混合物)中一起温和混合酵母媒介和抗原。

在本发明的一个实施方案中,将酵母媒介和抗原二者都胞内加载入载体,诸如树突细胞或巨噬细胞,以形成本发明的治疗性组合物或疫苗。或者,本发明的抗原(即本发明的Ras融合蛋白)可以在缺乏酵母媒介的情况中加载入树突细胞。

可以实现这两种成分的加载的各种形式在下文中详细讨论。在用于本文时,术语“加载”及其派生词指一种成分(例如酵母媒介和/或抗原)插入、导入、或进入细胞(例如树突细胞)。胞内加载成分指将该成分插入或导入细胞的胞内区室(例如穿过质膜和至少进入胞质、吞噬体、溶酶体、或细胞的一些胞内空间)。加载一种成分入细胞指迫使该成分进入细胞(例如通过电穿孔)或将该成分置于该成分很可能通过一些过程(例如吞噬作用)进入细胞的环境中(例如接触或接近细胞)的任何技术。加载技术包括但不限于:扩散、主动转运、脂质体融合、电穿孔、吞噬作用、和超声浴。在一个优选的实施方案中,使用给树突细胞加载酵母媒介和/或抗原的被动机制,此类被动机制包括树突细胞对酵母媒介和/或抗原的吞噬作用。

在一个实施方案中,可以将完整酵母(有或无异源抗原的表达)磨碎或以一定方式加工以生成酵母细胞壁制备物、酵母膜颗粒或酵母片段(即不完整的),而在有些实施方案中,酵母片段可以与包括抗原(例如DNA疫苗、蛋白质亚基疫苗、杀死的或灭活的病原体)的其它组合物一起提供或施用来

增强免疫应答。例如，酶促处理、化学处理或物理力（例如机械剪切或超声处理）可以用来将酵母破碎成多个用作佐剂的部分。

本发明的治疗方法

本发明的一个实施方案涉及任何本文所述涉及本发明突变型Ras（例如具有至少第76位密码子突变，或第76位密码子突变与另一Ras突变诸如第12位密码子突变的组合的Ras）的药剂在制备用于保护动物免于癌症的药物或组合物或疫苗中的用途。如上文所讨论的，在E76突变以外，本发明还涵盖第73位、第74位、第75位、第77位或第78位的任何一个或多个的突变，或任何上文所述Ras突变的组合，特别是第12位和/或第13位突变与第59位、第61位、第73位、第74位、第75位、第76位、第77位和/或第78位突变的任何组合。本发明的其它实施方案涉及保护动物免于癌症的方法，包括给具有癌症或有风险形成癌症的动物施用本文所述疫苗或治疗性组合物以在该动物中降低或预防癌症的至少一种症状。

在一个方面中，疫苗或组合物包含任何上文所述疫苗或组合物，其至少包含包含至少一种包含第76位突变的突变型Ras蛋白或肽的抗原，或包含第76位突变与另一Ras突变诸如第12位突变的组合的一种或多种抗原；更优选地，其包含上文所述各种肽、蛋白质、嵌合构建物和/或融合蛋白。可用于疫苗或组合物的其它Ras突变及其组合在上文中有描述。可用于本发明方法的其它治疗性组合物包括包含如下化合物或药剂的组合物，所述化合物或药剂靶向发明人所鉴定的突变型Ras蛋白并抑制肿瘤表达此类蛋白质，或启动或上调Ras蛋白的GTP水解以克服或补偿突变型Ras蛋白对GTP水解的影响。此类化合物或药剂可以包括但不限于各种抑制性核酸，诸如核酶、RNAi、或适体，和/或各种肽和合成化合物或小分子化合物（例如药物发现的产物，其利用本发明人所发现的突变型Ras）诸如构象拮抗剂或GTP水解的激动剂。此类化合物或药剂及其鉴定方法在本文别处讨论。在本发明的一个方面中，不给个体施用与本发明治疗方法和用途联合的全长突变型Ras产物（例如核酸分子和蛋白质）；而是选择此类Ras产物的肽和片段，或与此类Ras产物相关的其它工具（例如适体、RNAi等等）。在用于引发免疫应答的组合物的环境中，特别是在由本发明酵母媒介来表达的环境中，可以使用全长Ras，尽管免疫原性部分和多结构域融合蛋白是优选的。

疫苗或组合物还包含药学可接受载体或赋形剂,而且在一个实施方案中(例如其中该组合物是疫苗),包括本文所述酵母媒介。在一方面,疫苗中所包括的融合蛋白包含至少两种或多种癌抗原。在另一方面,此类融合蛋白包含一种或多种癌抗原的至少一种或多种免疫原性结构域。

在另一方面,癌抗原指与癌症相关的抗原,所述癌症包括但不限于黑素瘤、鳞状细胞癌、乳腺癌、头颈癌、甲状腺癌、软组织肉瘤、骨肉瘤、睾丸癌、前列腺癌、胰腺癌、卵巢癌、膀胱癌、皮肤癌、脑癌、血管肉瘤(angiosarcoma)、血管肉瘤(hemangiosarcoma)、肥大细胞瘤、原发性肝癌、肺癌(包括非小细胞肺癌)、胰腺癌、肠胃癌(包括结肠直肠癌)、肾细胞癌、造血瘤形成(hematopoietic neoplasia)及其转移癌。

在所有方面,如上文所描述的,疫苗或组合物中包括至少一种抗原,其包含以下各项、基本上由以下各项组成、或由以下各项组成:包含第76位突变、第76位突变与至少一种别的Ras突变诸如第12位突变的组合的Ras肽,包含第73位、第74位、第75位、第77位或第78位突变的Ras,包含本文所述突变的任何组合的Ras,或利用此类突变的核酸药剂或其它药剂。

本发明包括给动物递送本发明的组合物或疫苗。可以离体或体内进行施用过程。离体施用指部分操作步骤在患者体外进行,诸如在使得酵母媒介和抗原加载入细胞的条件下给从患者身体内取出的一群细胞(树突细胞)施用本发明的组合物,并将这些细胞返回患者身体内。本发明的治疗性组合物可以通过任何合适的施用模式来返回患者或给患者施用。

疫苗或组合物的施用可以是系统性的、经粘膜的和/或最接近靶位点的位置的(例如肿瘤附近)。优选的施用路径对于本领域技术人员是显而易见的,依赖于待预防或治疗的疾患的类型、使用的抗原、和/或靶细胞群体或组织。优选的施用方法包括但不限于静脉内施用、腹膜内施用、肌肉内施用、结节内(intranodal)施用、冠状动脉内施用、动脉内施用(例如进入颈动脉)、皮下施用、经皮投递、气管内施用、皮下施用、关节内施用、心室内施用、吸入(例如气雾剂)、颅内、脊柱内、眼内、耳的、鼻内、口服、肺部施用、导管注入(impregnation of a catheter)、和直接注射入组织。特别优选的施用路径包括静脉内、腹膜内、皮下、皮内、结节内、肌肉内、经皮、吸入、鼻内、口服、眼内、关节内、颅内和脊柱内。胃肠外递送可以包括皮内、肌肉内、腹膜内、胸膜内、肺内、静脉内、皮下、心房导管和静脉导管(venal catheter)

路径。耳的投递可以包括滴耳液，鼻内投递可以包括滴鼻液或鼻内注射，而眼内投递可以包括滴眼液。气溶胶（吸入）投递还可以使用本领域标准方法来进行（参见例如Stribling等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 189:11277-11281, 1992, 完整收入本文作为参考）。例如，在一个实施方案中，本发明的组合物或疫苗可以配制成适于使用合适的吸入装置或喷雾器喷雾投递的组合物。口服投递可以包括可以通过口摄取的固体和液体，而且可用于建立粘膜免疫，因为包含酵母媒介的组合物可以容易的制备成供口服投递，例如片剂或胶囊剂，以及配制成食品和饮料产品。调控粘膜免疫的其它施用路径可用于病毒感染的治疗。此类路径包括支气管、皮内、肌肉内、鼻内、其它吸入、直肠、皮下、表面、经皮、阴道和尿道路径。

依照本发明，有效的施用方案（即以有效的方式施用疫苗或治疗性组合物）包含合适剂量参数和施用模式，其导致在患有疾病或疾患或有风险发生疾病或疾患的动物中引发免疫应答，在施用疫苗（治疗性的或预防性的）的情况下，优选地使得动物得到保护免于疾病。在该组合物包含本文所述不同治疗性化合物或药剂时，有效施用方案包含合适的剂量参数和施用模式，其导致缓和或可察觉地改善患者疾病或疾患的至少一种症状或指标，诸如降低肿瘤大小或水平，或者在患者有风险发生疾病或病患时预防疾病。关于特定疾病的有效剂量参数可以使用本领域标准方法来确定。此类方法包括例如测定存活率、副作用（即毒性）、和疾病的进展或消退。

依照本发明，合适的单剂大小指在合适的一段时间里施用一次或多次后能够在动物中引发抗原特异性免疫应答或引发改善疾病的至少一种症状或指标的剂量。剂量可以随所治疗的疾病或疾患而有所变化。例如，在一个实施方案中，在抗原与酵母媒介一起递送时，本发明的酵母媒介的单剂是大约 1×10^5 至大约 5×10^7 个酵母细胞等同物每千克接受组合物施用的生物体体重。在一个优选的实施方案中，每剂的酵母细胞不根据生物体的重量进行调整。在这个实施方案中，本发明的酵母媒介的单剂是大约 1×10^4 至大约 1×10^9 个酵母细胞每剂。更优选地，本发明的酵母媒介的单剂是大约0.1 Y.U. (1×10^6 个细胞)至大约100 Y.U. (1×10^9 个细胞) 每剂（即每个生物体），包括任何中间剂量，增量为 0.1×10^6 个细胞（即 1.1×10^6 、 1.2×10^6 、 1.3×10^6 ...）。这个剂量范围可以在任何大小的任何生物体中有效使用，包括小鼠、猴、人等。在通过将酵母媒介和抗原加载入树突细胞来施用疫苗时，本发明疫苗的优选单剂是

大约 0.5×10^6 至大约 40×10^6 个树突细胞每个个体每次施用。优选地，单剂是大约 1×10^6 至大约 20×10^6 个树突细胞每个个体，更优选大约 1×10^6 至大约 10×10^6 个树突细胞每个个体。

优选的核酸疫苗单剂范围从大约1纳克 (ng) 至大约100 μg ，这依赖于施用路径和/或递送方法，正如本领域技术人员可确定的。合适的递送方法包括例如通过注射、作为滴剂、雾化的和/或局部的。在一个实施方案中，用纯DNA构建物覆盖金颗粒 (直径1至3 μm) 的表面并使用“基因枪”将其推进入皮肤细胞或肌肉。

核酸:脂质体复合物的合适单剂是大约0.1 μg 至大约100 μg 每千克接受该复合物施用的患者体重。在另一个实施方案中，合适的单剂是大约1 μg 至大约10 μg 每千克体重。在另一个实施方案中，核酸:脂质复合物的合适单剂是至少约0.1 μg 核酸，更优选至少约1 μg 核酸，甚至更优选至少约10 μg 核酸，甚至更优选至少约50 μg 核酸，和甚至更优选至少约100 μg 核酸。

在组合物包含蛋白质、小分子 (即药物设计的产物) 或抗体时，此类化合物的优选单剂通常包含介于约0.01微克 $\times$ 千克⁻¹和约10毫克 $\times$ 千克⁻¹动物体重之间。此类药剂的更优选单剂包含介于约1微克 $\times$ 千克⁻¹和约10毫克 $\times$ 千克⁻¹动物体重之间。甚至更优选的药剂单剂包含介于约5微克 $\times$ 千克⁻¹和约7毫克 $\times$ 千克⁻¹动物体重之间。甚至更优选的药剂单剂包含介于约10微克 $\times$ 千克⁻¹和约5毫克 $\times$ 千克⁻¹动物体重之间。另一个特别优选的药剂单剂包含介于约0.1毫克 $\times$ 千克⁻¹和约10毫克 $\times$ 千克⁻¹动物体重之间 (如果胃肠外地递送该药剂)。

在针对抗原的免疫应答已经减弱或者需要针对特定的一种或多种抗原提供免疫应答或诱导记忆应答时，优选施用治疗性组合物 (即疫苗) 的“加强” (剂)。加强 (剂) 可以在最初施用后约2周至数年施用。在一个实施方案中，施用方案是这样的，其中在大约1个月至大约6个月的一段时间里大约1次至大约4次施用大约 1×10^5 至大约 5×10^7 个酵母细胞等同物的组合物每千克生物体体重。基于施用后对患者的重估和对疾病或疾患或其症状或指标的状态的评估，临床医生可以确定本文所述其它治疗性组合物的额外定量给药。

在本发明的一个实施方案中，给鉴定为具有本文所述Ras突变的患者单独施用或与本文所述另一疗法联用基因疗法以将野生型或“健康的” (未突变的) Ras递送至患者。在基因治疗方案中施用核酸分子的方法是本领域已

知的。

涉及本发明的治疗性组合物和疫苗的方法和用途主要意图用于预防和/或治疗疾病或疾患。术语“保护”一般可用于表示预防和/或治疗。本发明的治疗性组合物或疫苗在施用于个体后可以：预防疾病发生；治愈疾病；延迟疾病的发作；和/或缓解（减轻、延迟、减少）疾病症状、体征或病因（例如减轻疾病的一个或多个症状；降低疾病的发生；增加具有或形成疾病的个体的存活；和/或降低疾病的严重性）。因此，本发明包括预防疾病发生（预防性处理或预防性疫苗）和治疗患有疾病或经历疾病症状的动物（治疗性处理或治疗性疫苗）二者。在一个实施方案中，本发明的方法有效地在个体中引发免疫应答，即诱导有益的或保护性的免疫应答，在有些实施方案中可以额外抑制（例如降低、抑制或阻断）过于活跃的或有害的免疫应答。在另一个方面，本发明的方法有效地导致疾病或疾患的至少一种症状或指标中至少一种可检测的改善或益处，对于癌症，可以包括但不限于降低肿瘤负荷 (burden)，例如降低肿瘤大小、降低肿瘤水平、降低肿瘤生长速率、和/或降低转移和/或延迟疾病发作，和/或增加患者的存活。

本发明的诊断和预后方法

本发明的另一个实施方案涉及本发明的突变型Ras蛋白或*ras*核酸分子及其部分作为癌症的诊断或预后测定法或试剂盒中的生物标志物的用途。在一个优选的实施方案中，本发明涉及在癌症的诊断或预后测定法中检测编码突变型Ras蛋白的核酸（基因或RNA）。在一个实施方案中，该方法包括在核酸或蛋白质样品中确定E76突变型标志物（本文一般也称为生物标志物）的存在和/或水平。E76突变可以包括本文所述任何E76突变，优选地包括E76G突变、E76K突变或E76Q突变，尽管应当理解，与野生型蛋白质或基因相比，其它肿瘤在该Ras位置可以具有不同的突变。该生物标志物可以通过检测突变型Ras蛋白来检测，但更优选通过检测编码此类突变型Ras蛋白的核酸分子（RNA或DNA）来检测。在另一个实施方案中，该方法包括额外检测（同时地或相继地）另一Ras突变型标志物的存在和/或水平，包括先前已知的Ras第12位、第13位、第59位或第61位（密码子）突变。在一个实施方案中，该方法包括在单个患者样品（核酸或蛋白质）中检测E76突变和G12突变两者的存在和/或水平。在另一个实施方案中，该方法可以包括确定下列各项的存

在和/或水平：第73位、第74位、第75位、第77位或第78位的任何一个或多个的突变，或上文所述Ras突变的任何组合，特别是第12位和/或第13位突变与第59位、第61位、第73位、第74位、第75位、第76位、第77位和/或第78位突变的任何组合。为了简单，以下方面关于E76突变进行描述，但应当延伸以涵盖任何这些突变或其组合。

本发明的此方法的第一步包括在来自患者的测试样品（也称为患者样品）中检测突变型*ras*基因（包含导致E76 Ras突变的突变）的存在和/或E76 Ras的表达或生物学活性。获得患者样品的适当方法对本领域技术人员是已知的。患者样品可以包括可包含肿瘤细胞或肿瘤细胞蛋白质的、来自患者的任何体液或组织。更具体地，依照本发明，术语“测试样品”或“患者样品”一般可以用来指任何类型的样品，其包含待本方法评估的细胞或已自该细胞分泌的或包含于该细胞内的产物，包括但不限于分离的细胞的样品、组织样品、体液样品、或例如获自分离自患者的细胞样品的核酸样品。

依照本发明，分离的细胞的样品指通过任何合适的方法从器官、组织或液体收集的细胞（通常在悬浮液中或者分离自在体内连接组织内细胞的结缔组织）的样本，所述合适的方法导致收集合适数目的细胞用于本发明方法的评估。细胞样品中的细胞不必是相同类型的，尽管纯化方法可以用于富集优先评估的细胞类型。可以通过例如刮擦组织、加工组织样品以释放细胞个体、或从体液分离来获得细胞。

尽管与分离的细胞的样品类似，但本文将组织样品定义为身体的器官或组织的切片，其通常包括几种细胞类型和/或使细胞保持在一起的细胞骨架结构。本领域技术人员应当领会，在有些情况中，术语“组织样品”可以与“细胞样品”互换使用，尽管优选将其用于指明更复杂的结构而非细胞样品。组织样品可以通过活检来获得，例如包括通过切割、切片或打孔机。

与组织样品类似，体液样品包含要评估标志物表达或生物学活性的细胞和/或可包含由细胞分泌的可溶性生物标志物，而且是通过适于对特定体液取样的任何方法来获得的液体。适于取样的体液包括但不限于血液、粘液、精液、唾液、乳汁、胆汁和尿液。

一般而言，基于要评估肿瘤细胞存在或生长的器官或组织的可获得性和结构和/或基于待评估的癌症类型来选择样品类型（即细胞、组织或体液）。例如，如果待评估的器官/组织是乳房，则样品可以是来自活检的上皮细胞样

品（即细胞样品）或来自活检的乳房组织样品（组织样品）。在本发明中最有用的样品是通过活检或手术或常规实验室液体收集从患者中分离的细胞、组织或体液（及其成分，诸如DNA）。

一旦从患者获得样品，就对该样品进行评估以在样品细胞中检测本发明突变型*ras*基因的存在，或检测本发明E76 Ras的表达或生物学活性（例如通过检测编码突变型基因产物的mRNA或通过检测突变型Ras蛋白）（单独的或与其它突变诸如其它Ras或*ras*突变特别是G12突变的组合）。

例如，*ras*生物标志物的存在和/或水平可以通过下列常规方法来确定，诸如基因或RNA检测方法（例如DNA测序、寡核苷酸杂交、使用突变特异性引物的PCR扩增）或蛋白质检测方法（例如测定基因产物水平的免疫测定法或生化测定法）。一般而言，可以通过测量或检测基因序列或表达的任何合适方法或技术来检测患者样品中的*ras*基因或RNA的核酸序列。此类方法包括但不限于PCR、逆转录酶-PCR（RT-PCR）、原位PCR、原位杂交、Southern印迹、RNA印迹、序列分析、微阵列分析、报告基因检测、或其它DNA/RNA杂交平台。表达可以仅针对突变型*ras*序列的存在进行评估和/或将其与分离自健康个体或另一阴性对照的样品进行比较。

例如，可以将来自包埋石蜡块的患者肿瘤活检样品切片并用苏木精染色，之后可以通过激光捕获显微解剖自该样品分离病理性细胞。然后将来自分离细胞的基因组DNA作为模板，用于PCR反应以使用感兴趣序列侧翼的引物扩增包含外显子3中指定*ras*序列的DNA片段。或者，来自肿瘤活检的切片可以如下分析，即原位PCR，使得扩增依赖于与突变序列结合的引物的杂交，并用带标记物的核苷酸来延伸，使得在肿瘤细胞内特异性地检测所扩增的序列。又或者，可以用与一种或多种E76突变而非野生型*ras*序列特异性杂交的寡核苷酸探查切片。

在检测Ras E76突变型蛋白（或本文所述Ras突变组合）时，可以在合适组织（诸如通过活检获得的肿瘤组织和细胞材料）中检测蛋白质表达。例如，可以使患者肿瘤活检样品（其可以是固定化的）与选择性结合待检测Ras蛋白的抗体、抗体片段或适体接触并确定该抗体、其片段或适体是否已经结合至Ras蛋白。可以使用多种本领域标准方法来测量结合，包括但不限于Western印迹、免疫印迹、酶联免疫吸附测定法（ELISA）、放射免疫测定法（RIA）、免疫沉淀、表面等离子共振、化学发光、荧光偏振（fluorescent polarization）、

磷光、免疫组织化学分析、基质辅助激光解吸/电离-飞行时间(MALDI-TOF)质谱术、微量细胞术(microcytometry)、微阵列、显微镜检术、荧光激活细胞分选术(FACS)和流式细胞术。在一种特定免疫测定法中,使用特异性结合突变型Ras蛋白的第一单克隆抗体和结合该第一抗体的第二抗体来测定对Ras蛋白的结合。

在本发明的诊断/预后方法中,如果检测到E76 Ras或*ras*突变(或本文所述Ras或*ras*突变组合)(通过核酸或蛋白质的检测),则认为此类突变检测指示该患者中存在肿瘤细胞或易于形成肿瘤细胞,因为预计这种突变不会存在于“健康的”个体中(即不具有或不显现易患由这种Ras突变引起的或造成的癌症的个体)。然而,如果需要,可以将Ras或*ras*突变的检测结果与健康或正常个体的“Ras状态”(即Ras蛋白或基因的序列)进行比较,如果需要。

尽管检测到E76突变足以得出患者中存在肿瘤细胞或易于形成肿瘤细胞的阳性诊断结果,据信在肿瘤样品中检测到E76与另一Ras或*ras*突变特别是G12突变的组合不仅指示存在肿瘤细胞或易于形成肿瘤细胞,还指示该肿瘤与仅检测到E76突变、仅检测到其它Ras突变(例如G12突变)和/或未检测到突变相比更具攻击性(例如展现出更快或更高的体积肿瘤生长、增加的侵入性、增加的转移性生长倾向、增加的不良预后结果)。

按照本发明,“基线水平”指生物标志物(例如Ras或*ras*)表达或活性的对照水平和有些实施方案(但不是所有实施方案,依赖于方法)中的正常水平,可以将生物标志物表达或生物学活性的测试水平(即在测试样品中的)与其进行比较。提到生物标志物表达或生物学活性的基线水平时使用的术语“阴性对照”通常指在来自患者或来自据信是正常的(即非肿瘤的、非癌性的、未经历肿瘤性转化的、未展现肿瘤细胞存在或不当细胞生长)一群个体的样品中建立的基线水平。在一个实施方案中,可以从来自所测试病人的无关组织(即据信未被癌症侵袭的组织)建立基线水平或对照,使得可以在一段时间内监测患者的肿瘤状态(肿瘤负荷、生长、体积等)和/或使得可以在一段时间内评估给定治疗方案的功效。用于检测Ras生物标志物表达或生物学活性的方法在下文中有详细描述。“阳性对照”可以包括确认生物标志物的阳性检测结果的任何对照,诸如在确认的肿瘤中建立的生物标志物表达或活性水平,或关于生物标志物所评估的参数的任何其它阳性指标。

在使用基线或对照时,本领域技术人员应当领会,在进行测定时不需要

为每个测定建立基线或对照，而可以通过参考存储信息形式建立基线或对照，所述存储信息形式关于给定对照样品的先前测定的生物标志物表达的基线水平，诸如通过任何上述方法建立的基线水平。此类存储信息形式可以包括例如但不限于关于“健康的”（阴性对照）或肿瘤阳性的（包括分级肿瘤（staged tumor））生物标志物表达的群体或个体数据的参比图表（reference chart）、列表或电子文档；为患者记录先前评估数据的病历（medical chart）；或者关于可用于待诊断患者的基线生物标志物表达的任何其它数据源。

在有待评估肿瘤细胞的样品中检测突变型Ras蛋白或其编码基因或RNA的存在与否后，可以进行最终步骤即做出患者的诊断、监测或分级，并可以关于治疗或预防方案或进一步筛选方案做出规定。另外，如果检测到存在Ras突变，则可以通过别的癌症诊断方法对患者进行评估以确认最初的诊断。

在本发明的一个实施方案中，可以使用诊断方法来确定患者的诊断结果、患者的预后，还确定合适治疗方案和预测采用给定癌症治疗方案对患者的结果或效果。例如，如果怀疑患者具有癌症或有风险形成癌症，就可以使用该方法来确定该患者是否具有与癌症相关的Ras突变，并如此诊断癌症。另外，如果据信患者患有肿瘤，那么与不同突变的鉴定或至少没有鉴定到Ras突变相比，Ras突变的鉴定可以向临床医生指出患者肿瘤可能具有的攻击性程度，如此容许更明确地癌症预后。如上文所讨论的，不限于理论，本发明人相信检测到Ras E76突变与G12突变的组合预示更具攻击性的肿瘤，因而，该患者的预后较之没有此类组合的患者的预后更差，和/或与没有此类突变组合的患者相比，可以更具攻击性地治疗具有此类组合的患者。最后，在患者肿瘤中鉴定Ras突变或突变组合可以用于开发基于此特定突变任何影响细胞活性的认识的特定癌症治疗方案，还可用于预测患者对特定类型治疗的响应或易感性。

本发明还包括利用本发明诊断方法的试剂盒。该试剂盒优选包含可用于在测试样品中检测依照本发明的Ras（蛋白质）或*ras*（核酸）突变的存在与否的任何试剂，优选包括结合生物标志物（即突变型*ras*基因、RNA、cDNA或由其编码的蛋白质）的寡核苷酸探针、PCR引物、或抗体、抗原结合肽、或适体。该试剂盒可以包括实施本文所涵盖的诊断方法所需要的任何试剂。该试剂盒还可以包括用于检测其它癌症生物标志物（诸如先前记载的Ras突变）或癌症诊断（甚至具有与本文所述Ras突变无关的起因或作用的癌症）

的任何其它合适靶物的试剂。可以将该试剂（例如探针、抗体、适体）与另一单元（例如标志物）结合或固定化至固体载体（片基）。在一个实施方案中，该试剂盒可包含用于在测试样品中检测一种细胞类型的对照生物标志物特征的试剂。该试剂可以以游离形式存在或固定化至片基，诸如塑料碟、微阵列板、试管、试验棒等等。该试剂盒还可以包括适于检测试剂和/或标记阳性或阴性对照的试剂、洗涤液、稀释缓冲液等等。该试剂盒还可以包括用于使用该试剂盒和解释结果的一套书面说明。在一个实施方案中，将该试剂盒设计为高通量测定法。

更具体地，依照本发明，用于检测生物标志物存在、表达或生物学活性的试剂可以是任何如下合适试剂，其可用于上文所述检测Ras生物标志物存在、表达或生物学活性的方法。此类试剂包括但不限于：探针，其在严格杂交条件下杂交至编码生物标志物或其片段的核酸分子；引物，其用于扩增编码生物标志物或其片段的核酸；适体，其特异性结合靶物分子上的构象独特位点（即其可以区别具有E76突变（包括特定E76突变，诸如E76G、E76K 或 E76Q）的Ras和没有此类突变的Ras）；和/或抗体、其抗原结合片段或其它抗原结合肽，其选择性结合生物标志物。还可以使用本领域可获得的信息产生在样品中选择性结合突变型Ras蛋白的抗体（包括但不限于多克隆和单克隆抗体、二价和单价抗体、双特异性或多特异性抗体、包含此类抗体的血清、已经纯化至不同程度的抗体、和完整抗体的任何功能等同物）（上文所描述的）。

在一个实施方案中，用于检测对照生物标志物（其是所采样的细胞类型的特征）的试剂一般可以是任何类型的如下试剂，其可用于在样品中检测已知标志物存在的方法（在核酸或蛋白质水平），诸如通过用于检测上文所述生物标志物存在的方法。具体地，该试剂的特征在于它鉴定所分析细胞类型的特定标志物，该特定标志物将该细胞类型鉴定为阳性。例如，在乳房肿瘤测定法中，期望对乳房上皮细胞筛选生物标志物表达和/或生物学活性水平。因此，用于检测对照标志物的试剂鉴定上皮细胞（优选乳房上皮细胞）的特征性标志物，使得该细胞区别于其它细胞类型，诸如成纤维细胞。此类试剂提高本发明测定法的准确性和特异性。用于检测对照标志物的此类试剂包括但不限于：探针，其在严格杂交条件下杂交至编码蛋白质标志物的核酸分子；PCR引物，其扩增此类核酸分子；适体，其特异性结合靶物分子上的构象独

特位点；和/或抗体、其抗原结合片段或抗原结合肽，其选择性结合样品中的对照标志物。许多细胞标志物的核酸和氨基酸序列是本领域已知的，并可用于产生此类试剂，供检测用。

本发明测定试剂盒中用于检测Ras生物标志物和/或对照标志物的试剂可以与可检测标签或可检测标记物偶联。此类标签可以是任何如下合适标签，其容许检测用于检测生物标志物或对照标志物的试剂，包括但不限于分光光度法、光化学、生物化学、免疫化学、电学、光学或化学手段可检测的任何组合物或标记物。本发明中有用的标记物包括生物素（其用于使用带标记物的链霉亲和素偶联物的染色）、磁珠（例如Dynabeads™）、荧光染料（例如荧光素、德克萨斯红、罗丹明、绿色荧光蛋白等等）、放射性标记物（例如³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C或³²P）、酶（例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和ELISA中常用的其它酶）、和比色标记物，诸如胶体金或有色玻璃或塑料（例如聚苯乙烯、聚丙烯、胶乳等等）珠。

此外，本发明测定试剂盒的检测试剂可固定化在片基上。此类片基可包括适于检测试剂（诸如将用于任何前述检测方法的）固定化的任何片基。简言之，适于固定化检测试剂的片基包括任何固体支持物，诸如任何固体的有机的、生物聚合物的或无机的支持物，其可以与检测试剂形成键，而不显著影响检测试剂检测期望靶物分子的活性和/或能力。例示性的有机固体支持物包括聚合物，诸如聚苯乙烯、尼龙、苯酚-甲醛树脂、丙烯酸共聚物（例如聚丙烯酰胺）、稳定化的完整全细胞、和稳定化的粗品全细胞/膜匀浆物。例示性的生物聚合物支持物包括纤维素、聚右旋糖苷(polydextran)（例如Sephadex®）、琼脂糖、胶原和壳多糖。例示性的无机支持物包括玻璃珠（有孔的和无孔的）、不锈钢、金属氧化物（例如多孔陶瓷，诸如ZrO₂、TiO₂、Al₂O₃和NiO）和沙子。

本发明的筛选方法

本发明的一个实施方案涉及鉴定可用于保护患者免于如下癌症的化合物的方法，所述癌携带突变型Ras基因或表达具有本文所述E76突变或E76突变与另一Ras突变诸如G12的组合的Ras蛋白。该方法包括在用于筛选和选择如下化学化合物和/或生物学化合物的测定法中使用Ras E76蛋白或肽、或编码此类蛋白质或肽的核酸分子作为靶物，所述化学化合物和/或生物学化合物

具有抗肿瘤治疗剂活性的，这基于该化合物下调突变型*ras*基因表达、抑制其基因产物的活性、或逆转或补偿突变型Ras蛋白的生物学活性的能力，诸如尽管存在本文所鉴定的突变仍能触发Ras的GTP水解的化合物。在一个实施方案中，该方法包括使用Ras蛋白或肽、或编码此类蛋白质或肽的核酸分子作为靶物，其中该Ras蛋白或肽具有第73位、第74位、第75位、第77位或第78位的任何一个或多个的突变，或者上文所Ras突变的任何组合，特别是第12位和/或第13位突变与第59位、第61位、第73位、第74位、第75位、第76位、第77位和/或第78位突变的任何组合。

例如，用于鉴定的候选化合物包括如下化合物，其触发GTP酶活性，使得尽管存在该突变仍能将突变型Ras中所结合的GTP水解成GDP，由此关闭“组成性”Ras活性，如此淬灭细胞增殖的不受调节信号。本文中提到抑制靶物可以指抑制靶物基因的表达和抑制其相应表达产物（蛋白质）的表达和/或活性中的一者或两者。鉴定方法还涵盖修饰靶物生物学活性的化合物，诸如上述化合物，其触发或启动本发明突变型Ras的GTP水解。此类化合物在本文中可称为治疗性化合物。

在一个实施方案中，待鉴定的化合物包括调节、改变（adapt）或模拟Ras-GAP的化合物，其中经调节的、经改变的或经模拟的Ras-GAP具有如下能力，其能使与任何本文所述突变型Ras蛋白（例如Ras E76突变体、任何Ras 73-78突变体、或本文所述任何组合突变体）结合的GTP水解，但不能使与野生型Ras结合的GTP水解。在这方面，本文所述新突变用于鉴定如下化合物，其可恢复包含一种或多种本文所述Ras突变的细胞（例如肿瘤细胞）中Ras GTP水解途径的功能，由此阻滞此类细胞不受控制的增殖和转移，而仅留下“正常的”细胞（非癌性细胞）。此类策略容许鉴定如下化合物，其靶向肿瘤细胞，但不会在非肿瘤细胞中引起中断正常Ras细胞功能的问题。在这个实施方案中，如下鉴定化合物，即选择这样的化合物，其使表达（天然地或通过重组方法的）突变型Ras靶物的细胞恢复GTP水解，但在表达非突变型（野生型）Ras的细胞中不引起GTP水解。

在这个实施方案的一个方面中，如下鉴定治疗性化合物，即将本发明的靶物蛋白（例如E76G Ras）（或天然地或重组地表达该蛋白质的细胞）暴露于候选化合物，并测量该化合物抑制（降低、减少、阻断）该蛋白质的生物学活性（或更具体地是该蛋白质促成细胞无限制细胞生长或增殖能力）的能

力。在一个实施方案中，候选化合物通过其启动或触发GTP水解和有效克服或补偿本发明突变型Ras的存在的能力来鉴定。用于测量GTP水解和GTP酶活性的方法是本领域公知的。

在这个实施方案的另一方面中，将天然地表达突变型*ras*基因或经该基因或编码突变型Ras蛋白的其它重组核酸分子转染的细胞系与不同化合物（也称为候选化合物、测试化合物或假定的调节性化合物）一起温育。可以使用突变型*ras*基因表达的降低或其编码产物活性的改变来鉴定治疗性化合物。例如，可以使表达突变型Ras的细胞与候选化合物接触，并如上所述鉴定触发GTP酶活性的化合物。此类化合物可以通过它们在Ras突变阻断内源性Ras-GAP结合Ras的条件下结合Ras和活化GTP酶的能力来鉴定，和/或可以容许在启动水解时从Ras GTP释放 γ -磷酸。换言之，该测定法试图检测克服Ras突变或突变组合的效应的化合物。或者，可以使用多种相似的无细胞测定法鉴定此类治疗性化合物。如果需要，以此方式鉴定的治疗性化合物然后可以以其它测定法再测试以证实它们的活性。优选地，选择这样的化合物，其还不在于表达野生型Ras的细胞（其不表达突变型Ras）中触发GTP水解。

在本发明的一个实施方案中，如下鉴定不受控制的细胞生长的抑制剂：将靶物基因或其部分（即突变型E76G *ras*基因）暴露于测试化合物；测量靶物（E76G Ras）的表达；并选择下调（降低、减少、抑制、阻断）该靶物表达或修饰该靶物活性的化合物。例如，可以将假定的抑制剂暴露于表达靶物基因（内源地或重组地）的细胞。可用于测定法的优选细胞包括哺乳动物细胞，其或是天然地表达靶物基因或是经重组形式靶物基因（诸如包含编码靶物蛋白或其有效片段的核酸序列的重组核酸分子）的转染。测定基因表达水平的方法是本领域公知的。用于设计和鉴定抑制基因表达或由此编码的蛋白质的生物学活性的核酸分子的方法是本领域公知的。

在本发明的一个实施方案中，如下鉴定治疗性化合物：将靶物（例如E76G Ras-GTP）暴露于候选化合物；测量候选化合物对该靶物的结合；并选择以期望的浓度、亲和力或亲合力结合该靶物的化合物。在一个优选的实施方案中，在有助于促进该化合物与靶物相互作用或结合的条件下实施测定。本领域技术人员可基于测定法中所使用的靶物和化合物确定此类条件。在一个实施方案中，可以使用BIAcore仪器来测定存在和缺乏候选化合物情况下的靶物蛋白（靶物基因所编码的蛋白质）和天然配体间的复合物的结合

常数。例如，可以将靶物蛋白或其配体结合片段固定化在片基上。将天然的或合成的配体与该片基接触以形成复合物。可如下测定该复合物的解离常数，即在缓冲液通过芯片时监测折射率随时间的变化（O'Shannessy等, *Anal. Biochem.* 212:457-468 (1993); Schuster等, *Nature* 365:343-347 (1993)）。以不同浓度的候选化合物与该复合物接触并监测响应函数（例如折射率随时间的变化）容许测定存在测试化合物时的复合物解离常数，并指出该候选化合物是该复合物的抑制剂还是激动剂。或者，可以将候选化合物和配体同时与固定化的靶物蛋白接触以观察该候选化合物是否抑制或稳定该配体对该靶物蛋白的结合。

在本发明方法中待筛选的化合物包括已知有机化合物，诸如肽文库的产物、核酸分子（例如RNAi、核酶、适体、反义）、抗体、和化学组合文库的产物。还可以使用依赖于基因产物结构（单独的或与另一成分复合的，例如与GTP复合的突变型Ras）的理性药物设计来鉴定化合物。此类方法是本领域技术人员所知的，牵涉使用三维成像软件程序。例如，图4说明了作为两种已知Ras突变结果的在Ras中发生的三维构象变化。可用于设计或选择在本发明中有用的模拟物或其它治疗性化合物的不同药物设计方法披露于Maulik等，1997, *Molecular Biotechnology: Therapeutic Applications and Strategies*, Wiley-Liss, Inc., 完整收入本文作为参考。

在用于本文时，术语“测试化合物”、“假定的抑制性化合物”或“假定的调节性化合物”指在特定过程中具有未知的或先前未意识到的调节活性的化合物。因此，对于鉴定化合物的方法的术语“鉴定”意图包括所有化合物，其作为抑制细胞生长目的的调节性化合物的有效性是由本发明方法所测定的。

本发明的细胞、细胞裂解物、核酸分子或蛋白质暴露或接触假定的调节性化合物的条件（诸如通过混合）是任何合适的培养或测定条件。在基于细胞的测定法的情况中，所述条件包括有效的培养基，其中可以培养细胞或者其中在存在和缺乏假定的调节性化合物时可以评估细胞裂解物。本发明的细胞可以在多种容器中培养，包括但不限于组织培养烧瓶、试管、微量滴定皿和皮氏培养皿。在适合细胞的温度、pH和二氧化碳含量进行培养。此类培养条件也在本领域技术范围之内。在考虑了以下各项的条件下将细胞与假定的调节性化合物接触：每个接触容器的细胞数目、施用至细胞的假定的调节性

化合物的浓度、假定的调节性化合物与细胞的温育时间、和施用至细胞的化合物的浓度。本领域技术人员可以基于如下变量完成有效方案的确定，诸如容器大小、容器中液体体积、已知适于培养测定法中所使用的特定细胞类型的条件、和待测试的假定的调节性化合物的化学组成（即大小、电荷等）。假定的调节性化合物的优选量可以包含介于约1 nM至约10 nM之间的假定的调节性化合物每96孔平板的孔。

在用于本文时，术语“表达”在与检测本发明靶物的表达结合使用时，可以指检测靶物基因的转录和/或检测靶物基因所编码的靶物蛋白的翻译。检测靶物的表达指主动地测定靶物是否被表达的行为。这可以包括确定靶物表达与对照相比是否是上调的、是否是下调的、或者是否是不变的。因此，检测表达的步骤不需要靶物表达实际上是上调的或下调的，而是还可以包括检测靶物表达没有改变（即检测靶物的未表达或靶物表达的未改变）。通过多种本领域已知方法中的任何一种来测量转录物和/或蛋白质的表达。对于RNA表达，方法包括但不限于：提取细胞mRNA和Northern印迹，其使用与编码一种或多种本发明基因的整个或部分的转录物杂交的带标记物探针；使用基因特异性引物扩增自一种或多种本发明基因表达的mRNA、聚合酶链式反应（PCR）和逆转录酶-聚合酶链式反应（RT-PCR），继而通过多种手段中的任何一种来定量检测产物；从细胞中提取总RNA，然后将其标记，并用于探查阵列化在多种表面中的任何一种上的编码本发明基因的整个或部分的cDNA或寡核苷酸；原位杂交；和检测报告基因。术语“定量”或“量化”在用于定量基因转录水平的语境中可以指绝对或相对数量测定。可以如下实现绝对定量：包含已知浓度的一种或多种靶物核酸，并将未知靶物核酸的杂交强度参照未知靶物核酸的杂交强度（例如通过产生标准曲线）。或者，可以如下实现相对定量：比较两种或多种基因间或两种或多种处理间的杂交信号以定量杂交强度的改变和转录水平的改变（暗示）。

在一个优选的实施方案中，通过聚合酶链式反应来测量靶物基因的表达。在另一个实施方案中，使用聚丙烯酰胺凝胶分析、层析或光谱法来测量靶物基因的表达。

在另一个优选的实施方案中，通过测量所编码蛋白质的产量（测量蛋白质的翻译）来测量靶物基因的表达。蛋白质翻译的测量包括用于检测和/或测量来自细胞或细胞提取物的蛋白质的任何合适方法。此类方法包括但不限于

免疫印迹（例如Western印迹）、酶联免疫吸附测定法（ELISA）、放射免疫测定法（RIA）、免疫沉淀、免疫组织化学、免疫荧光、荧光激活细胞分选（FACS）和免疫荧光显微镜检术。用于检测蛋白质的特别优选的方法包括任何单细胞测定法，包括免疫组织化学和免疫荧光测定法。例如，可以使用检测剂，诸如特异性识别（选择性结合）基因所编码的蛋白质的抗体。此类方法是本领域公知的。

可以使用本领域已知技术并根据化合物的类型来合成通过上文所述方法鉴定或设计的候选化合物。用于产生非蛋白质化合物（包括有机和无机化合物）的合成技术是本领域公知的。例如，对于较小的肽，优选化学合成法。例如，此类方法包括公知的化学规程，诸如溶液或固相肽合成，或者溶液中的半合成，其以通过常规溶液方法偶联的蛋白质片段开始。此类方法是本领域公知的并记载于本领域一般的教科书和文章，诸如Merrifield, 1997, *Methods Enzymol.* 289:3-13; Wade等, 1993, *Australas Biotechnol.* 3(6):332-336; Wong等, 1991, *Experientia* 47(11-12):1123-1129; Carey等, 1991, *Ciba Found Symp.* 158:187-203; Plaue等, 1990, *Biologicals* 18(3):147-157; Bodanszky, 1985, *Int. J. Pept. Protein Res.* 25(5):449-474; 或H.Dugas和C.Penney, *BIOORGANIC CHEMISTRY*, 1981, 第54-92页（都完整收入本文作为参考）。例如，可以利用商品化肽合成仪和制造商提供的合成循环，通过固相方法学合成肽。本领域技术人员应当认可，还可以使用FMOC策略和TFA/清除剂切割混合物实现固相合成。还可以使用重组DNA技术和本领域标准方法来产生是蛋白质或肽的化合物，特别是如果期望较大数量的蛋白质的话。

由这些方法鉴定的任何化合物可以用于制备用于治疗或预防癌症的药物，或用于本文所述其它方法或用途。

提供下列实验结果用于说明目的并不意图限制本发明的范围。

实施例

实施例1

下列实施例描述完整的、热灭活的表达突变型Ras蛋白的酵母（Tarmogen）的第1期免疫疗法试验期间，所评估肿瘤中新Ras突变的鉴定。

材料和方法（用于实施例1和2）

患者。在完整的、热灭活的表达突变型Ras蛋白的酵母（Tarmogen）的

靶向分子免疫疗法第1期试验 (GlobeImmune, Inc.) 中, 登记了149位患有胰腺癌、结肠直肠癌或非小细胞肺癌的患者。将患者肿瘤的活检样品针对*ras*突变确定基因型, 以鉴定在免疫疗法试验中登记的具有产物相关突变的受试者。

组织样品和基因组DNA分离。以石蜡包埋块或用切自石蜡块的切片制作的载玻片形式接受每位患者的肿瘤样品。通过LCM (激光捕获显微术) 或显微镜解剖刀刮擦从经染色的 (HistoGene染色液, Arcturus, CA) 6-8 μ m厚度的切片中分离肿瘤细胞, 然后通过SDS-蛋白酶K处理和RNA酶A消化从这些分离的肿瘤细胞中提取基因组DNA, 继而异丙醇沉淀。

PCR和*ras*测序。使用铂Taq DNA聚合酶高保真试剂盒 (Invitrogen, CA), 对K-、N-和H-*ras*基因的外显子2和3实施嵌套PCR。25 μ L外部PCR反应混合物包括100ng模板DNA、1X PCR缓冲液、50-100pmol MgSO₄、5nmol dNTP、10pmol每种外部引物、和2.5个单位高保真Taq DNA聚合酶。热循环以94°C、5分钟变性起始, 接着是35轮三步骤循环: 94°C、30秒, 55°C、30秒和68°C、50秒, 接着是68°C、10分钟最终温育。内部PCR反应在总共50 μ L混合物中实施, 其中有1 μ L作为模板的外部PCR产物和20pmol每种内部引物。使用下列引物:

K-*ras*外显子2外部正向引物:

5'-AGGTGAGTTTGTATTAAAAG-3' (SEQ ID NO:16);

K-*ras*外显子2外部反向引物:

5'-TCATGAAAATGGTCAGAG-3' (SEQ ID NO:17);

K-*ras*外显子2内部正向引物:

5'-TAATACGACTCACTATAGGGTGTGTGACATGTTCTAAT-3' (SEQ ID NO:18);

K-*ras*外显子2内部反向引物:

5'-ATTTAGGTGACACTATAGAAGAATGGTCCTGCACCAGTAA-3' (SEQ ID NO:19);

K-*ras*外显子3外部正向引物:

5'-TGAGTTGTATATAACACC-3' (SEQ ID NO:20);

K-*ras*外显子3外部反向引物:

5'-GGCATTAGCAAAGACTCA-3' (SEQ ID NO:21);

K-*ras*外显子3内部正向引物:

5'-TAATACGACTCACTATAGGG TGCACGTGTAATAATCCAG-3' (SEQ ID NO:22);

K-*ras*外显子3内部反向引物:

5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA ATTACTCCTTAATGTCAGC-3' (SEQ ID NO:23);

N-*ras*外显子2外部正向引物:

5'-ATGGAAGGTCACACTAGGG-3' (SEQ ID NO:24);

N-*ras*外显子2外部反向引物:

5'-AAGATGATCCGACAAGTG-3' (SEQ ID NO:25);

N-*ras*外显子2内部正向引物:

5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGTACTGTAGATGTGGCTCG-3' (SEQ ID NO:26);

N-*ras*外显子2内部反向引物:

5'-ATTTAGGTGACACTATAGAAGAGACAGGATCAGGTCAGCG-3' (SEQ ID NO:27);

N-*ras*外显子3外部正向引物:

5'-TGGCAATAGCATTGCATTC-3' (SEQ ID NO:28);

N-*ras*外显子3外部反向引物:

5'-GGTAACCTCATTTCCCCA-3' (SEQ ID NO:29);

N-*ras*外显子3内部正向引物:

5'-TAATACGACTCACTATAGGGTTGAACTTCCCTCCCTCCCTG-3' (SEQ ID NO:30);

N-*ras*外显子3内部反向引物:

5'-ATTTAGGTGACACTATAGAATTCAGAACACAAAGATCA-3' (SEQ ID NO:31);

H-*ras*外显子2外部正向引物:

5'-TTGGCAGGTGGGGCAGGAGA-3' (SEQ ID NO:32);

H-*ras*外显子2外部反向引物:

5'-CCTATCCTGGCTGTGTCC-3' (SEQ ID NO:33);

H-*ras*外显子2内部正向引物:

5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGGAGACCCTGTAGGAG-3' (SEQ ID NO:34);

H-*ras*外显子2内部反向引物:

5'-ATTTAGGTGACACTATAGAAGTCGCCCCGAGCAGCTGC-3' (SEQ ID NO:35);

H-*ras*外显子3外部正向引物:

5'-ACCAGGGAGAGGCTGGC-3' (SEQ ID NO:36);

H-*ras*外显子3外部反向引物:

5'-CTCCCGGGCCAGCCTCAC-3' (SEQ ID NO:37);

H-*ras*外显子3内部正向引物:

5'-TAATACGACTCACTATAGGGTGAAGTCCCCCCCACGGAAGG-3' (SEQ ID NO:38); 和

H-*ras*外显子3内部正向引物:

5'-ATTTAGGTGACACTATAGAAGTTCACCTGTACTGGTGGA-3' (SEQ ID NO:39)。

所有正向内部引物在5'末端增补T7引物序列, 而所有反向内部引物在5'末端增补SP6引物序列。在通过1.5%琼脂糖电泳后, 用QIA快速凝胶提取试剂盒 (Qiagen, CA) 纯化内部PCR产物。将纯化后的DNA送至CU癌症中心DNA测序和分析中心, 使用T7和SP6引物对两条链测序。

构建小鼠K-*ras*基因表达载体。使用Trizol试剂(Invitrogen, CA)自E9小鼠肺上皮细胞系分离总RNA。使用m-*kras*反向引物: 5'-GCTCGGCTGCGGCCGCTCACTACATAACTGTACACCTTGTCT-3' (SEQ ID NO:40)和SuperScript™ III逆转录酶试剂盒(Invitrogen, CA)依照制造商的说明书自2.5μg总RNA逆转录小鼠K-*ras*基因的cDNA。随后通过PCR扩增十分之一的反应后等份试样, 其中使用m-*kras*正向引物: 5'-GGAATTCACCATGGGCACTGAGTATAAACTTGTGGTG-3' (SEQ ID NO:41)和m-*kras*反向引物, 将其设计成覆盖小鼠K-*ras* cDNA的整个编码区。热循环以94°C、5分钟温育起始, 接着是35轮三步骤循环: 94°C、25秒, 55°C、25秒和68°C、30秒。依照制造商的说明书, 将PCR产物克隆至pGEM-T载体 (Promega, WI)。此小鼠k-*ras*基因包含Q61R突变, 然后通过定点诱变产生野生型小鼠k-*ras*和包含G12V、E76G、E76K和G12V/E76G突变的小鼠k-*ras*,

并将它们克隆入哺乳动物表达载体pUP，位于EcoRI 和NotI位点。使用了m-*kras*正向引物、反向引物和下列引物：

rasQ61 5'-TACTCCTCTTGACCTGCTGT-3' (SEQ ID NO:42);

rasG76 5'-AAGAAAGCCCCCCCCCAGTTCTC-3' (SEQ ID NO:43);

rasV12 5'-ACGGAATTCACCATGACTGAGTATAAACTTGTGGTGGTTGG
AGCTGTTGGCG TAG-3' (SEQ ID NO:44);

rasK76 5'-AAGAAAGCCCTTCCCAGTTCTC-3' (SEQ ID NO:45)。

细胞培养和转染。在含10%新生小牛血清、50U/ml青霉素和50μg/ml链霉素的DMEM中培养BALB3T3细胞。使用Effectene转染试剂盒 (Qiagen, CA) 将WT、G12V、E76G、E76K和G12V+E76G *k-ras*表达质粒转染入BALB3T3细胞。将经转染细胞用G418选择并通过从培养皿（野生型）或从软琼脂（G12V、E76G、E76K、G12V+E76G）中选择克隆来纯化。通过RT-PCR和Ras蛋白的免疫印迹来证实经转染的野生型K-*ras* (WT)或突变型K-*ras*基因的表达。使用Trizol试剂从每个经转染细胞克隆中分离总RNA，并使用SuperScript™ III逆转录酶试剂盒 (Invitrogen, CA) 和m-*kras*反向引物来逆扩增*ras*基因的cDNA，然后通过PCR使用m-*kras*反向引物和pUP载体启动子中的正向引物5'-TTGGGTTCGCGGTTCTTGT-3' (SEQ ID NO:46)来扩增外源性*ras*基因。使用RIPA裂解缓冲液 (Upstate, NY) 从每个经转染细胞克隆中提取总蛋白质，并在12% SDS-PAGE凝胶 (Invitrogen, CA) 上解析蛋白质，继而转移至硝酸纤维素膜并分别用抗Ras抗体 (Oncogene, MA) 和抗GAPDH抗体 (Abcam, MA) 印迹。

软琼脂测定法。将 5×10^4 个细胞悬浮于含0.35%低熔点琼脂糖 (SeaPlaque 琼脂糖, Cambres BioScience Rockland Inc, me) 和10%新生小牛血清 (NBCS) 的DMEM中，并覆盖在含10% NBCS的底部0.5%低熔点琼脂糖层上。在培养2-4周后，观察集落或者将集落挑入含10% NBCS的液体DMEM培养基。

致瘤性测定法。将每个转染子克隆进行培养、收获、和PBS悬浮。将 5×10^6 个细胞皮下注射入4-6周龄的Balb/c裸鼠。在30天期间一周两次地监测所注射的细胞，测量肿瘤，并如下计算肿瘤体积， $3.142 \times (\text{长度}) \times (\text{宽度})^2 / 6$ 。

结果

在本研究中，在完整的、热灭活的表达突变型Ras蛋白的酵母 (Tarmogen) 的第1期免疫疗法试验中，通过对来自患有胰腺癌（68%包含突变）、结肠直

肠癌（40%包含突变）或非小细胞肺癌（NSCLC）（9%包含突变）的149位患者的肿瘤进行的嵌套PCR扩增和直接测序，对K-、N-和H-ras DNA序列表征了肿瘤相关突变的存在。从所有3种癌症类型的24位受试者中检测到*ras*第76位密码子的新突变，其中22个是E76G，而各有1个肿瘤包含E76K或E76Q突变。在8个肿瘤中鉴定到E76加第12位或第13位密码子突变的双重组合。参见表1和2和图1。

表1: 第76位密码子突变汇总表

	结肠直肠 (85)			肺 (33)			胰腺 (31)			总数 (149)
	K-ras	N-ras	H-ras	K-ras	N-ras	H-ras	K-ras	N-ras	H-ras	
E76G	2*		3*	3		1	2			
可能E76G [#]	5		1			1	4		1	
E76K		1								
E76Q	1									
总数	8*	1	4*	3	0	2	6	0	1	24

*一个样品在K-ras和H-ras两者中都具有E76G; #检测到较弱的E76突变信号，可能是由于肿瘤细胞在活检样品中的低丰度。

表2: 热点*ras*突变 (第12、13和61位密码子) 汇总表

癌症类型	每种癌症筛选的样品数	具有ras突变的受试者数 (%每种癌症)	突变													
			第12位密码子								第13位密码子		第61位密码子			
			总数	G12V	G12C	G12D	G12R	G12S	G12A	总数	G13D	Q61R	Q61L	Q61H	Q61P	
结肠直肠	85	34 (40%)	29 (85.3%)	10	4	10	0	3	2	3	3	2	0	1	1	0
肺	33	3 (9.1%)	2 (66.7%)	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
胰腺	31	21 (67.7%)	19 (95%)	6	0	10	3	0	0	0	0	2	1	0	1	0
总数	149	58 (38.9%)	50 (86.2%)	17	6	20	3	3	2	3	3	5	1	1	2	1

实施例2

下列实施例证明了Ras E76突变是转化性的(transforming)，而且进一步地，Ras E76突变与Ras G12突变协同作用而提高肿瘤致癌性。

在非临床研究中证实了Ras E76G和E76K突变是转化性的。特别感兴趣地，偶联第76位和第12位密码子突变导致肿瘤生长协同。将G12V、E76G和E76K单个突变或G12V-E76G双重突变导入小鼠K-*ras*基因，然后转染入BALB/3T3成纤维细胞。经包含单独的G12V或单独的E76K或G12V-E76G双重突变的*ras*转染的细胞在软琼脂中形成集落（参见图2A和2B和表3）。

表3：作为转化性突变的E76

克隆 (经K- <i>ras</i> 基因型转染 的BALB/3T3细胞)	所转染 <i>ras</i> 基因的 mRNA转录物 (通过RT-PCR)	外源性Ras 蛋白表达 (Western印迹)	软琼脂 中的 集落形成
野生型 (WT)	+	+	-
G12V	+	+	++++
G12V + E76G	+	+	+++++
E76G	+	+	-
E76K	+	+	++
pUP (空载体)	-	-	-
Balb3T3 (未经转染的)	-	-	-

将经野生型或突变型K-*ras*基因转染的BALB/3T3细胞皮下 (s.c.) 注射入BALB/c裸鼠。图3A和3B是该测定的重复。工形线(bar)指明每组3只小鼠的标准偏差。图3C是图3A中所显示的研究的延伸详情，以显示经各E76突变体转染的细胞相对于未经转染的（野生型）BALB/3T3细胞的生长。

与经野生型K-Ras转染的细胞相比，在K-Ras中包含单个E76G或E76K突变的细胞导致在裸鼠中可检测的生长，尽管具有单个E76突变的肿瘤生长显著低于经转染而表达G12V突变型K-Ras的细胞（参见图3C）。经包含G12V+E76G Ras双重突变的Ras转染的细胞导致与包含任何单个突变的细胞相比加速的肿瘤生长（参见图3A-3C）。

实施例3

下列试验描述基于酵母的疫苗，其包含酵母媒介和包含Ras E76突变的

融合蛋白。

将啤酒糖酵母改造成在铜可诱导性启动子*CUP1*控制下表达多结构域突变型Ras融合蛋白。该融合蛋白是具有从N端至C端以符合读码框的方式融合在一起的如下序列元件的单一多肽(融合蛋白的氨基酸序列如本文中SEQ ID NO:14所示): 1) 序列MADEAP (SEQ ID NO:1), 以在细胞培养期间赋予初生酵母表达的异源蛋白稳定性 (SEQ ID NO:14第1-6位); 2) Ras片段, 其包含相对于野生型Ras蛋白的第12位氨基酸, 其中用半胱氨酸替代第12位甘氨酸 (SEQ ID NO:14第7-52位; 第12位突变在SEQ ID NO:14第17位); 3) Ras片段, 其包含相对于野生型Ras蛋白的第61位氨基酸, 其中用精氨酸替代第61位甘氨酸 (SEQ ID NO:14第53-91位; 第61位突变在SEQ ID NO:14第66位); 4) Ras片段, 其包含相对于野生型Ras蛋白的第12位氨基酸, 其中用天冬氨酸替代第12位甘氨酸 (SEQ ID NO:14第92-137位; 第12位突变在SEQ ID NO:14第102位); 5) Ras片段, 其包含相对于野生型Ras蛋白的第12位氨基酸, 其中用缬氨酸替代第12位甘氨酸 (SEQ ID NO:14第138-183位; 第12位突变在SEQ ID NO:14第148位); 6) Ras片段, 其包含相对于野生型Ras蛋白的第12位氨基酸, 其中用精氨酸替代第12位甘氨酸 (SEQ ID NO:14第184-229位; 第12位突变在SEQ ID NO:14第194位); 和7) Ras片段, 其包含相对于野生型Ras蛋白的第76位氨基酸, 其中用甘氨酸替代第76位谷氨酸 (SEQ ID NO:14第230-275位; 第76位突变在SEQ ID NO:14第258位)。

实施表达Ras融合蛋白的酵母的培养和诱导, 并检测该蛋白质的表达。

给A/J小鼠施用这些酵母, 其中通过尿烷暴露自发诱导25-50个肺肿瘤, 所述尿烷暴露触发Ras第61位密码子 (80-90%的肿瘤) 和第12位密码子 (约10%的肿瘤) 的突变或不依赖Ras突变而显现的肿瘤 (小于10%的肿瘤)。在尿烷诱导后2或5周, 通过皮下施用进行疫苗的施用。与未接受疫苗的小鼠相比, 该疫苗以统计学显著方式降低了小鼠中的肿瘤负荷, 表明该酵母疫苗能够引发抗肿瘤免疫应答, 其靶向包含至少一种由融合蛋白构建物所编码的突变的肿瘤。

在测试诱导针对包含第76位突变的Ras的免疫应答的进一步实验中, 给已起始或将起始肿瘤的小鼠施用这些酵母, 其中肿瘤细胞已经改造成表达包含E76G突变的Ras或者肿瘤细胞天然地表达包含E76G突变的Ras。评估该疫苗对降低肿瘤负荷的效果。另外, 自该小鼠分离T细胞, 并测试它们杀死表

达包含E76G突变的Ras的靶物细胞的能力（在CTL测定法中）和/或在应答由抗原呈递细胞所呈递的包含E76G突变的Ras时增殖的能力。与没有施用该疫苗相比，小鼠中的肿瘤负荷得到降低。类似地，自这些小鼠分离的T细胞能够以抗原特异性方式杀死表达突变型Ras蛋白的靶物和/或在应答突变型Ras蛋白时增殖。

实施例4

下列试验描述基于酵母的疫苗，其包含酵母媒介和包含Ras E76突变的融合蛋白。

将啤酒糖酵母改造成在启动子控制下表达双结构域突变型Ras融合蛋白。该融合蛋白是具有从N端至C端以符合读码框的方式融合在一起的如下序列元件的单一多肽（融合蛋白的氨基酸序列如本文中SEQ ID NO:15所示）：1）序列MADEAP（SEQ ID NO:1），以在细胞培养期间赋予初生酵母表达的异源蛋白稳定性（SEQ ID NO:15第1-6位）；2）Ras片段，其包含相对于野生型Ras蛋白的第12位氨基酸，其中用精氨酸替代第12位甘氨酸（SEQ ID NO:15第7-52位；第12位突变在SEQ ID NO:15第17位）；和7）Ras片段，其包含相对于野生型Ras蛋白的第76位氨基酸，其中用甘氨酸替代第76位谷氨酸（SEQ ID NO:15第53-98位；第76位突变在SEQ ID NO:15第81位）。

实施表达Ras融合蛋白的酵母的培养和诱导，并检测该蛋白质的表达。

在测试诱导针对包含第76位突变的Ras的免疫应答的实验中，给已起始或将起始肿瘤的小鼠施用这些酵母，其中肿瘤细胞已经改造成表达包含E76G突变的Ras或者肿瘤细胞天然地表达包含E76G突变的Ras。评估该疫苗对降低肿瘤负荷的效果。另外，自该小鼠分离T细胞，并测试它们杀死表达包含E76G突变的Ras的靶物细胞的能力（在CTL测定法中）和/或在应答由抗原呈递细胞所呈递的包含E76G突变的Ras时增殖的能力。与没有施用该疫苗相比，小鼠的肿瘤负荷得到降低。类似地，自这些小鼠分离的T细胞能够以抗原特异性方式杀死表达突变型Ras蛋白的靶物和/或在应答突变型Ras蛋白时增殖。

将美国临时申请No. 60/786,568的全部公开收入本文作为参考。

尽管已经详细描述了本发明的各种实施方案，对这些实施方案的更改和改动对于本领域技术人员是显而易见的。然而，应当清楚的了解，此类更改和改动在本发明的范围之内，正如所述权利要求中所列的。

<110> 全球免疫股份有限公司 (GlobeImmune, Inc.)

<120> Ras 突变及其相关组合物和方法

<130> 3923-13-PCT

<150> 60/786,568

<151> 2006-03-27

<160> 46

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400> 1

Met Ala Asp Glu Ala Pro

1

5

<210> 2

<211> 570

<212> DNA

<213> 人类 (Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (570)

<400> 2

atg act gaa tat aaa ctt gtg gta gtt gga gct ggt ggc gta ggc aag	48
Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys	
1 5 10 15	

agt gcc ttg acg ata cag cta att cag aat cat ttt gtg gac gaa tat	96
Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr	
20 25 30	

gat cca aca ata gag gat tcc tac agg aag caa gta gta att gat gga	144
Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly	
35 40 45	

gaa acc tgt ctc ttg gat att ctc gac aca gca ggt caa gag gag tac	192
Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr	
50 55 60	

agt gca atg agg gac cag tac atg agg act ggg gag ggc ttt ctt tgt	240
Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys	
65 70 75 80	

gta ttt gcc ata aat aat act aaa tca ttt gaa gat att cac cat tat	288
Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr	
85 90 95	
aga gaa caa att aaa aga gtt aag gac tct gaa gat gta cct atg gtc	336
Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val	
100 105 110	
cta gta gga aat aaa tgt gat ttg cct tct aga aca gta gac aca aaa	384
Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys	
115 120 125	
cag gct cag gac tta gca aga agt tat gga att cct ttt att gaa aca	432
Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr	
130 135 140	
tca gca aag aca aga cag aga gtg gag gat gct ttt tat aca ttg gtg	480
Ser Ala Lys Thr Arg Gln Arg Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val	
145 150 155 160	
agg gag atc cga caa tac aga ttg aaa aaa atc agc aaa gaa gaa aag	528
Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Leu Lys Lys Ile Ser Lys Glu Glu Lys	
165 170 175	
act cct ggc tgt gtg aaa att aaa aaa tgc att ata atg taa	570
Thr Pro Gly Cys Val Lys Ile Lys Lys Cys Ile Ile Met	
180 185	

<210> 3
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 3

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
20 25 30

Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
35 40 45

Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
50 55 60

Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
65 70 75 80

Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr
85 90 95

Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val
100 105 110

Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys
115 120 125

Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
130 135 140

Ser Ala Lys Thr Arg Gln Arg Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
145 150 155 160

Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Leu Lys Lys Ile Ser Lys Glu Glu Lys
165 170 175

Thr Pro Gly Cys Val Lys Ile Lys Lys Cys Ile Ile Met
180 185

<210> 4

<211> 567

<212> DNA

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(567)

<400> 4

atg act gag tat aaa ctt gtg gtg gtt gga gct ggt ggc gta ggc aag 48
Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
1 5 10 15

agc gcc ttg acg ata cag cta att cag aat cac ttt gtg gat gag tac 96
Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
20 25 30

gac cct acg ata gag gac tcc tac agg aaa caa gta gta att gat gga 144
Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
35 40 45

gaa acc tgt ctc ttg gat att ctc gac aca gca ggt caa gag gag tac 192
Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
50 55 60

agt gca atg agg gac cag tac atg aga act ggg gag ggc ttt ctt tgt 240
Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
65 70 75 80

gta ttt gcc ata aat aat act aaa tca ttt gaa gat att cac cat tat 288
Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr
85 90 95

aga gaa caa att aaa aga gta aag gac tct gaa gat gtg cct atg gtc 336

Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val	
100 105 110	
cig gta ggg aat aag tgt gat ttg cct tct aga aca gta gac acg aaa	384
Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys	
115 120 125	
cag gct cag gag tta gca agg agt tac ggg att ccg ttc att gag acc	432
Gln Ala Gln Glu Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr	
130 135 140	
tca gca aag aca aga cag ggt gtt gac gat gcc ttc tat aca tta gtc	480
Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Asp Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val	
145 150 155 160	
cga gaa att cga aaa cat aaa gaa aag atg agc aaa gat ggg aag aag	528
Arg Glu Ile Arg Lys His Lys Glu Lys Met Ser Lys Asp Gly Lys Lys	
165 170 175	
aag aag aag aag tca agg aca agg tgt aca gtt atg tga	567
Lys Lys Lys Lys Ser Arg Thr Arg Cys Thr Val Met	
180 185	

<210> 5

<211> 188

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 5

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
20 25 30

Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
35 40 45

Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
50 55 60

Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
65 70 75 80

Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr
85 90 95

Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val
100 105 110

Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys

115	120	125	
Gln Ala Gln Glu Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr			
130	135	140	
Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Asp Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val			
145	150	155	160
Arg Glu Ile Arg Lys His Lys Glu Lys Met Ser Lys Asp Gly Lys Lys			
165	170	175	
Lys Lys Lys Lys Ser Arg Thr Arg Cys Thr Val Met			
180	185		
<210> 6			
<211> 570			
<212> DNA			
<213> 人类 (Homo sapiens)			
<220>			
<221> CDS			
<222> (1).. (570)			
<400> 6			
aig acg gaa tat aag ctg gtg gtg gtg ggc gcc ggc ggt gtg ggc aag			48
Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys			
1 5 10 15			
agt gcg ctg acc atc cag ctg atc cag aac cat ttt gtg gac gaa tac			96
Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr			
20 25 30			
gac ccc act ata gag gat tcc tac cgg aag cag gtg gtc att gat ggg			144
Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly			
35 40 45			
gag acg tgc ctg ttg gac atc ctg gat acc gcc ggc cag gag gag tac			192
Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr			
50 55 60			
agc gcc atg cgg gac cag tac atg cgc acc ggg gag ggc ttc ctg tgt			240
Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys			
65 70 75 80			
gtg ttt gcc atc aac aac acc aag tct ttt gag gac atc cac cag tac			288
Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His Gln Tyr			
85 90 95			
agg gag cag atc aaa cgg gtg aag gac tcg gat gac gtg ccc atg gtg			336
Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val			
100 105 110			
ctg gtg ggg aac aag tgt gac ctg gct gca cgc act gtg gaa tct cgg			384
Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Ala Ala Arg Thr Val Glu Ser Arg			

115	120	125	
cag gct cag gac ctc gcc cga agc tac ggc atc ccc tac atc gag acc			432
Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Tyr Ile Glu Thr			
130	135	140	
tcg gcc aag acc cgg cag gga gtg gag gat gcc ttc tac acg ttg gtg			480
Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val			
145	150	155	160
cgt gag atc cgg cag cac aag ctg cgg aag ctg aac cct cct gat gag			528
Arg Glu Ile Arg Gln His Lys Leu Arg Lys Leu Asn Pro Pro Asp Glu			
	165	170	175
agt ggc ccc ggc tgc atg agc tgc aag tgt gtg ctc tcc tga			570
Ser Gly Pro Gly Cys Met Ser Cys Lys Cys Val Leu Ser			
180	185		
<210> 7			
<211> 189			
<212> PRT			
<213> 人类 (Homo sapiens)			
<400> 7			
Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys			
1	5	10	15
Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr			
20	25	30	
Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly			
35	40	45	
Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr			
50	55	60	
Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys			
65	70	75	80
Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His Gln Tyr			
85	90	95	
Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val			
100	105	110	
Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Ala Ala Arg Thr Val Glu Ser Arg			
115	120	125	
Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Tyr Ile Glu Thr			
130	135	140	

Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
145 150 155 160

Arg Glu Ile Arg Gln His Lys Leu Arg Lys Leu Asn Pro Pro Asp Glu
165 170 175

Ser Gly Pro Gly Cys Met Ser Cys Lys Cys Val Leu Ser
180 185

<210> 8

<211> 570

<212> DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (570)

<400> 8

atg aca gaa tac aag ctt gtg gtg gtg ggc gct gga ggc gtg gga aag 48
Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
1 5 10 15

agt gcc ctg acc atc cag ctg atc cag aac cac ttt gtg gac gag tat 96
Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
20 25 30

gat ccc act ata gag gac tcc tac cgg aaa cag gtg gtc att gat ggg 144
Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
35 40 45

gag aca tgt cta ctg gac tac tta gac aca gca ggt caa gaa gag tat 192
Glu Thr Cys Leu Leu Asp Tyr Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
50 55 60

agt gcc atg cgg gac cag tac atg cgc aca ggg gag ggc ttc ctc tgt 240
Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
65 70 75 80

gta ttt gcc atc aac aac acc aag tcc ttc gag gac atc cat cag tac 288
Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His Gln Tyr
85 90 95

agg gag cag atc aag cgg gtg aaa gat tca gat gat gtg cca atg gtg 336
Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val
100 105 110

ctg gtg ggc aac aag tgt gac ctg gct gct cgc act gtt gag tct cgg 384
Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Ala Ala Arg Thr Val Glu Ser Arg
115 120 125

cag gcc cag gac ctt gct cgc agc tat ggc atc ccc tac att gaa aca 432
Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Tyr Ile Glu Thr
130 135 140

tca gcc aag acc cgg cag ggc gtg gag gat gcc ttc tat aca cta gtc 480
 Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
 145 150 155 160

cgt gag att cgg cag cat aaa itg cgg aaa ctg aac cca ccc gat gag 528
 Arg Glu Ile Arg Gln His Lys Leu Arg Lys Leu Asn Pro Pro Asp Glu
 165 170 175

agt ggt cct ggc tgc atg agc tgc aaa tgt gtg ctg tcc tga 570
 Ser Gly Pro Gly Cys Met Ser Cys Lys Cys Val Leu Ser
 180 185

<210> 9

<211> 189

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 9

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
 1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
 20 25 30

Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
 35 40 45

Glu Thr Cys Leu Leu Asp Tyr Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
 50 55 60

Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
 65 70 75 80

Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His Gln Tyr
 85 90 95

Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val
 100 105 110

Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Ala Ala Arg Thr Val Glu Ser Arg
 115 120 125

Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Tyr Ile Glu Thr
 130 135 140

Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
 145 150 155 160

Arg Glu Ile Arg Gln His Lys Leu Arg Lys Leu Asn Pro Pro Asp Glu
165 170 175

Ser Gly Pro Gly Cys Met Ser Cys Lys Cys Val Leu Ser
180 185

<210> 10

<211> 570

<212> DNA

<213> 人类 (Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (570)

<400> 10

atg act gag tac aaa ctg gtg gtg gtt gga gca ggt ggt gtt ggg aaa 48
Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
1 5 10 15

agc gca ctg aca atc cag cta atc cag aac cac ttt gta gat gaa tat 96
Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
20 25 30

gat ccc acc ata gag gat tct tac aga aaa caa gtg gtt ata gat ggt 144
Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
35 40 45

gaa acc tgt ttg ttg gac ata ctg gat aca gct gga caa gaa gag tac 192
Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
50 55 60

agt gcc atg aga gac caa tac atg agg aca ggc gaa ggc ttc ctc tgt 240
Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
65 70 75 80

gta ttt gcc atc aat aat agc aag tca ttt gcg gat att aac ctc tac 288
Val Phe Ala Ile Asn Asn Ser Lys Ser Phe Ala Asp Ile Asn Leu Tyr
85 90 95

agg gag cag att aag cga gta aaa gac tcg gat gat gta cct atg gtg 336
Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val
100 105 110

cta gtg gga aac aag tgt gat ttg cca aca agg aca gtt gat aca aaa 384
Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Thr Arg Thr Val Asp Thr Lys
115 120 125

caa gcc cac gaa ctg gcc aag agt tac ggg att cca ttc att gaa acc 432
Gln Ala His Glu Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
130 135 140

tca gcc aag acc aga cag ggt gtt gaa gat gct ttt tac aca ctg gta 480
Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
145 150 155 160

```

aga gaa ata cgc cag tac cga atg aaa aaa ctc aac agc agt gat gat      528
Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Met Lys Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asp
                165                      170                      175

```

```

ggg act cag ggt tgt atg gga ttg cca tgt gtg gtg atg taa      570
Gly Thr Gln Gly Cys Met Gly Leu Pro Cys Val Val Met
                180                      185

```

```

<210> 11
<211> 189
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

```

```

<400> 11

```

```

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
1                5                10                15

```

```

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
                20                25                30

```

```

Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
                35                40                45

```

```

Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
                50                55                60

```

```

Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
65                70                75                80

```

```

Val Phe Ala Ile Asn Asn Ser Lys Ser Phe Ala Asp Ile Asn Leu Tyr
                85                90                95

```

```

Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val
                100                105                110

```

```

Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Thr Arg Thr Val Asp Thr Lys
                115                120                125

```

```

Gln Ala His Glu Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
                130                135                140

```

```

Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
145                150                155                160

```

```

Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Met Lys Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asp
                165                170                175

```

Gly Thr Gln Gly Cys Met Gly Leu Pro Cys Val Val Met
180 185

<210> 12
<211> 582
<212> DNA
<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(582)

<400> 12
atg act gag tac aaa ctg gtg gtg gtt gga gca ggt ggt gtt ggg aaa 48
Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
1 5 10 15
agc gcc ctg acg aic cag cta atc cag aac cac ttt gtg gat gaa tat 96
Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
20 25 30
gat ccc acc ata gag gat tct tac cga aag caa gtg gtg att gat ggt 144
Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
35 40 45
gag acc tgc ctg ctg gac ata ctg gac aca gct gga caa gag gag tac 192
Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
50 55 60
agt gcc atg aga gac cag tac atg agg aca ggc gaa ggg ttc ctc tgt 240
Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
65 70 75 80
gta ttt gcc aic aat aat agc aaa tca ttt gca gat att aac ctc tac 288
Val Phe Ala Ile Asn Asn Ser Lys Ser Phe Ala Asp Ile Asn Leu Tyr
85 90 95
agg gag caa att aag cgt gtg aaa gat tct gat gat gtc ccc atg gtg 336
Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val
100 105 110
ctg gta ggc aac aag tgt gac ttg cca aca agg aca gtt gac aca aag 384
Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Thr Arg Thr Val Asp Thr Lys
115 120 125
caa gcc cac gaa ctg gcc aag agt tac gga aat cca ttc att gag acc 432
Gln Ala His Glu Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
130 135 140
tca gcc aag acc cga cag ggt gtg gag gat gcc ttt tac aca ctg gta 480
Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
145 150 155 160
agg gag ata cgc cag tac cga ttg aaa aag ctc aac agc agt gac gat 528
Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Leu Lys Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asp
165 170 175
ggc act caa ggt tgt atg ggg tcg ccc tgt gtg ctg atg tgt aag aca 576

Gly Thr Gln Gly Cys Met Gly Ser Pro Cys Val Leu Met Cys Lys Thr
180 185 190

ctt tga 582
Leu

<210> 13
<211> 193
<212> PRT
<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 13

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
20 25 30

Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
35 40 45

Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
50 55 60

Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
65 70 75 80

Val Phe Ala Ile Asn Asn Ser Lys Ser Phe Ala Asp Ile Asn Leu Tyr
85 90 95

Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val
100 105 110

Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Thr Arg Thr Val Asp Thr Lys
115 120 125

Gln Ala His Glu Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
130 135 140

Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
145 150 155 160

Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Leu Lys Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asp
165 170 175

Gly Thr Gln Gly Cys Met Gly Ser Pro Cys Val Leu Met Cys Lys Thr

95

Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly
180 185 190

Ala Arg Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn
195 200 205

His Phe Val Asp Glu Tyr Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys
210 215 220

Gln Val Val Ile Asp Gly Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr
225 230 235 240

Ala Gly Gln Glu Glu Tyr Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr
245 250 255

Gly Gly Gly Phe Leu Cys Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe
260 265 270

Glu Asp Ile
275

<210> 15
<211> 98
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 15

Met Ala Asp Glu Ala Pro Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala
1 5 10 15

Arg Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His
20 25 30

Phe Val Asp Glu Tyr Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln
35 40 45

Val Val Ile Asp Gly Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala
50 55 60

Gly Gln Glu Glu Tyr Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly
65 70 75 80

Gly Gly Phe Leu Cys Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu

85	90	95
Asp Ile		
<210> 16		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 合成的		
<400> 16		
aggtagattt gtattaaaag		20
<210> 17		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 合成的		
<400> 17		
tcatgaaaat ggtcagag		18
<210> 18		
<211> 38		
<212> DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 合成的		
<400> 18		
taatacgact cactataggg tigtigacat gttcta		38
<210> 19		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 合成的		
<400> 19		
atttagtga cactatagaa gaatggtcct gcaccagtaa		40
<210> 20		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> 人工的		

<220>		
<223>	合成的	
<400>	20	
tgagttgtat	ataacacc	18
<210>	21	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	21	
ggcattagca	aagactca	18
<210>	22	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	22	
taatacgact	cactataggg tgcactgtaa taatccag	38
<210>	23	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	23	
atttaggtga	cactatagaa attactcctt aatgtcagc	39
<210>	24	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	24	
atggaaggtc	acactaggg	19
<210>	25	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工的	

<220>		
<223>	合成的	
<400>	25	
aagatgatcc gacaagtg		18
<210>	26	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	26	
taatacgact cactataggg agtactgtag atgtggctcg		40
<210>	27	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	27	
atttaggtga cactatagaa gagacaggat caggtcagcg		40
<210>	28	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	28	
lggcaatagc attgcattc		19
<210>	29	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	29	
ggtaacctca ttccccca		18
<210>	30	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	人工的	

<220>		
<223>	合成的	
<400>	30	
laatacgact cactataggg ttgaacttcc ctccctccct g		41
<210>	31	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	31	
atttaggtga cactatagaa ttcagaacac aaagatca		38
<210>	32	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	32	
ttggcaggtg gggcaggaga		20
<210>	33	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	33	
cctatcctgg ctgtgtcc		18
<210>	34	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	34	
laatacgact cactataggg aggagaccct gtaggag		37
<210>	35	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工的	

<220>		
<223>	合成的	
<400>	35	
atttaggtga cactatagaa ctgccccgca gcagctgc		38
<210>	36	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	36	
accagggaga ggctggc		17
<210>	37	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	37	
ctccccgggcc agcctcac		18
<210>	38	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	38	
taatacgact cactataggg tgaactcccc ccacggaagg		40
<210>	39	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	39	
atttaggtga cactatagaa gttcacctgt actggtgga		39
<210>	40	
<211>	43	
<212>	DNA	
<213>	人工的	

<220>

<223> 合成的

<400> 40

gctcggctgc ggccgctcac tacataactg tacaccttgt cct 43

<210> 41

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400> 41

ggaattcacc atgggcactg agtataaact tgttggtg 37

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400> 42

tactcctctt gacctgctgt 20

<210> 43

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400> 43

aagaaagccc cccccagttc tc 22

<210> 44

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400> 44

acggaattca ccatgactga gtataaactt gtggtggttg gagctgttgg cgtag 55

<210> 45

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400> 45

aagaaagccc ttcccagttc tc

22

<210> 46

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400> 46

ttgggtcgcg gttcttgt

18

在第1期试验活检样品中检测 *ras* 突变
(第2-91位氨基酸)

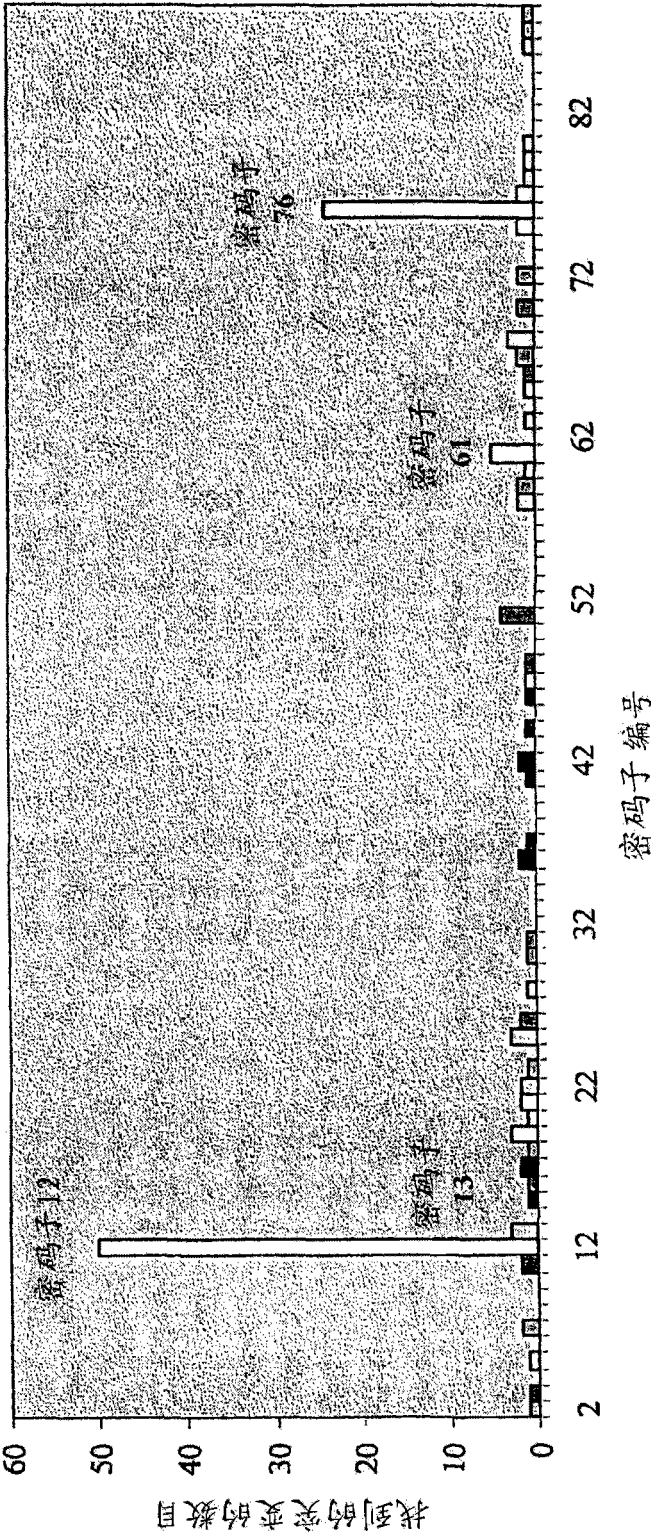
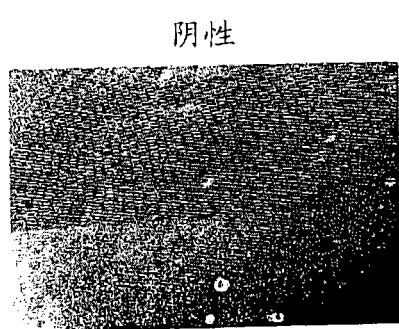
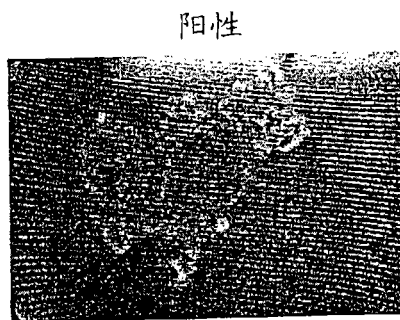


图 1



BALB/3T3 细胞-
未转染的

图 2A



BALB/3T3 细胞-
经G12V+E76G Ras 转染的

图 2B

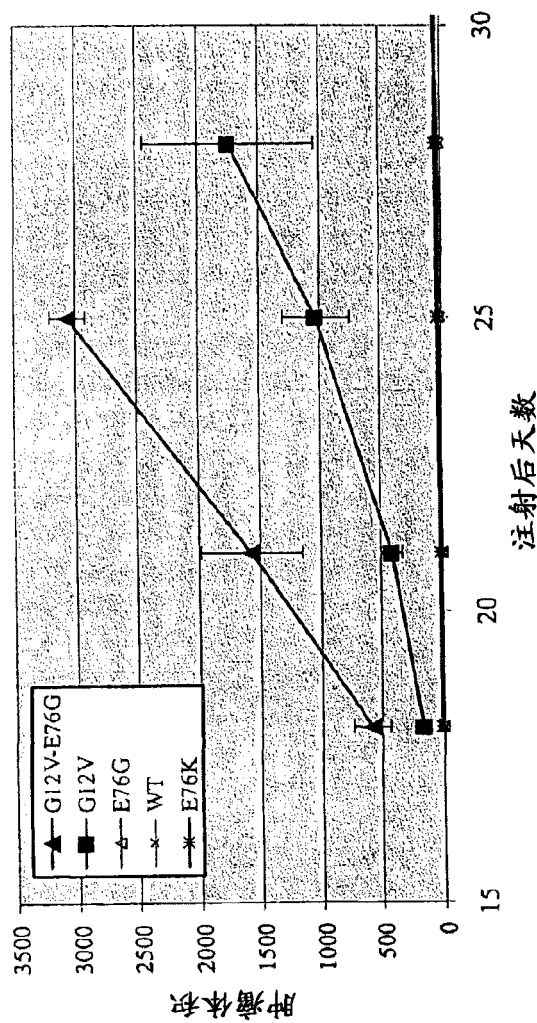


图 3A

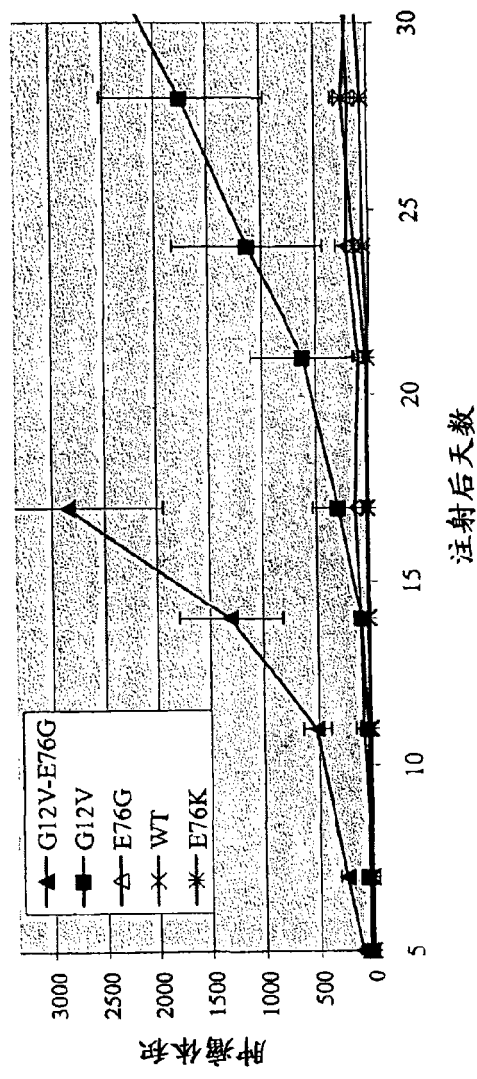


图 3B

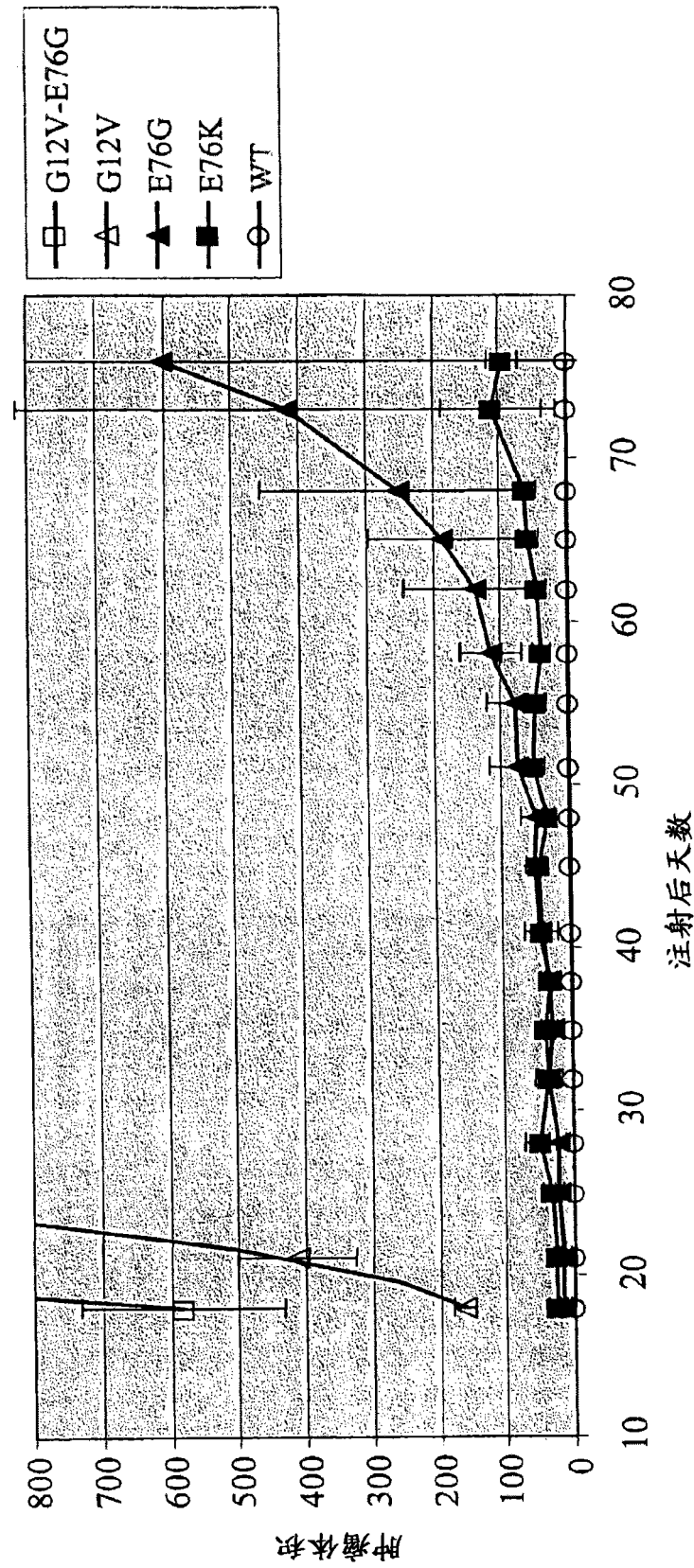


图 3C

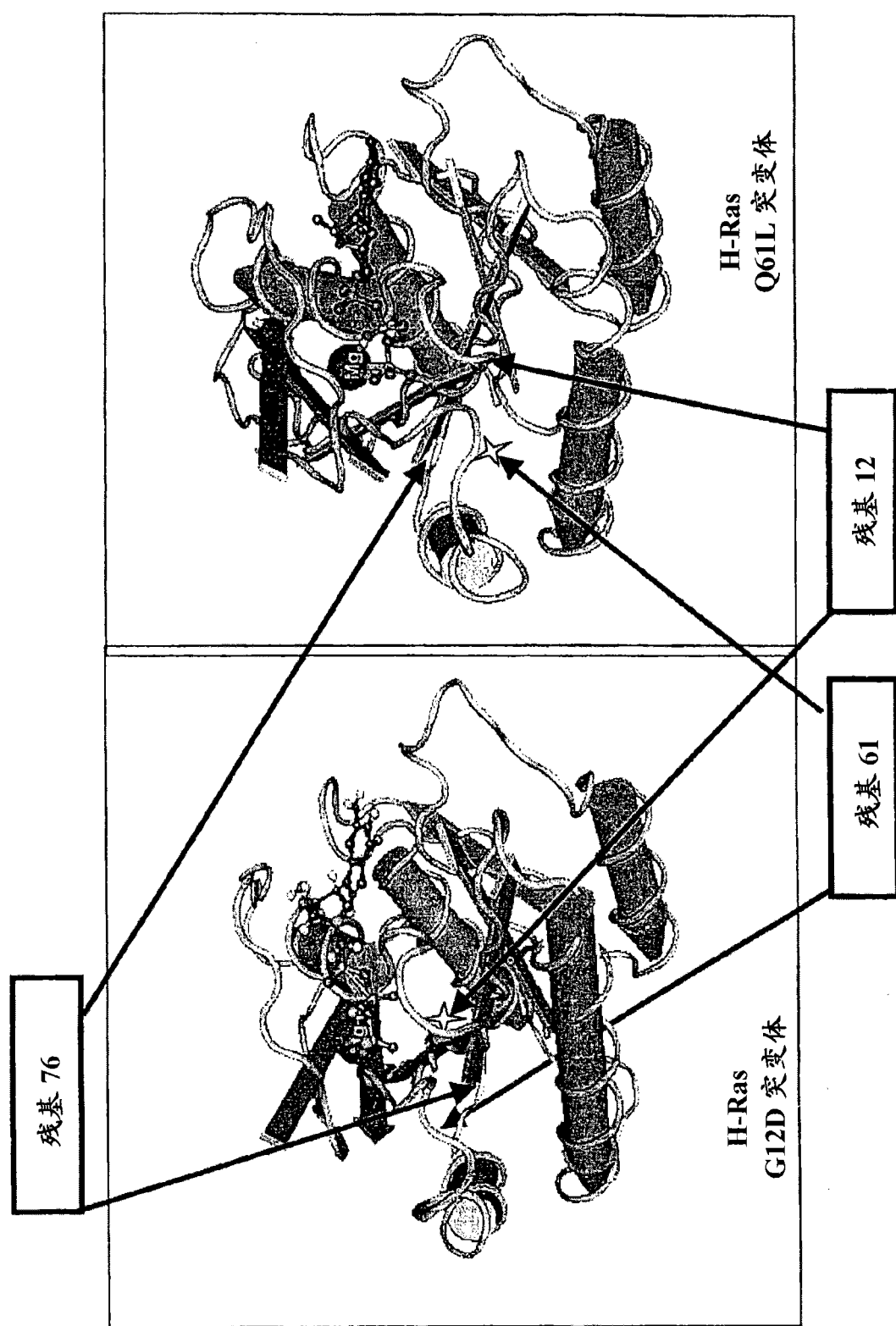


图 4

专利名称(译)	Ras突变及其相关组合物和方法		
公开(公告)号	CN101448848A	公开(公告)日	2009-06-03
申请号	CN200780018381.4	申请日	2007-03-09
[标]申请(专利权)人(译)	全球免疫股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	全球免疫股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	全球免疫股份有限公司		
[标]发明人	郭志敏 鲁迎年 唐纳德·贝尔格劳 亚力克斯·弗兰泽索夫		
发明人	郭志敏 鲁迎年 唐纳德·贝尔格劳 亚力克斯·弗兰泽索夫		
IPC分类号	C07H21/02 C07H21/04 A61K39/00 A61K39/38 C07K1/00 C07K14/00 C07K17/00 C12P21/06 C12N1/14 G01N33/53 G01N33/574 C12Q1/68		
CPC分类号	C12Q2600/178 A61K2039/523 C07K14/82 A61K39/0011 C12Q1/6886 A61K2039/5156 G01N33/574 G01N2800/52 C12Q2600/136 A61P35/00 Y10T436/143333 A61K39/001162		
优先权	60/786568 2006-03-27 US		
其他公开文献	CN101448848B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

所公开的是最近发现的Ras突变和突变组合，包含这些突变的蛋白质、肽和融合蛋白，编码这些蛋白质、肽和融合蛋白的核酸分子，以及与这些突变的用途有关的各种工具及诊断、治疗和筛选方法。

	结肠直肠 (85)			肺 (33)			胰腺 (31)			总数 (149)
	K-ras	N-ras	H-ras	K-ras	N-ras	H-ras	K-ras	N-ras	H-ras	
E76G	2*		3*	3		1	2			
可能E76G [#]	5		1			1	4		1	
E76K		1								
E76Q	1									
总数	8*	1	4*	3	0	2	6	0	1	24