(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2015-43773
(P2015-43773A)
(43)公開日　平成27年3月12日(2015.3.12)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	2G045
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4B024
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A	4B050
C12N 15/113	(2010.01)	C12N	15/00	G	4B063
C12N 15/115	(2010.01)	C12N	15/00	H	4B065

審査請求 未請求　請求項の数 67　ＯＬ　（全 75 頁）　最終頁に続く

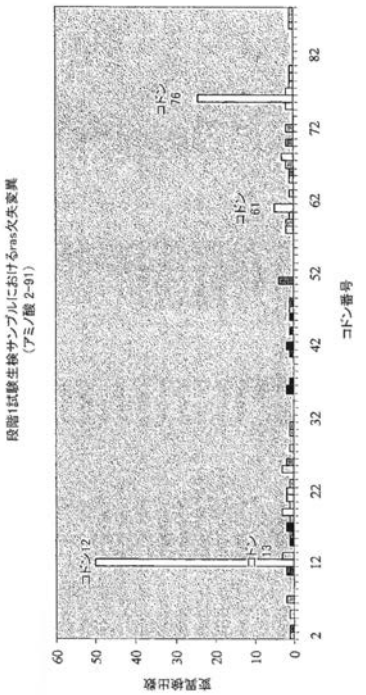
(21)出願番号　特願2014-198353 (P2014-198353)
(22)出願日　平成26年9月29日 (2014.9.29)
(62)分割の表示　特願2009-503126 (P2009-503126)の分割
原出願日　平成19年3月9日 (2007.3.9)
(31)優先権主張番号　60/786,568
(32)優先日　平成18年3月27日 (2006.3.27)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　505226437
グローブイミューン，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国，コロラド州　８００２７，ルイヴィル，インフィニト　ドライブ　１４５０
(74)代理人　100105957
弁理士　恩田　誠
(74)代理人　100068755
弁理士　恩田　博宣
(74)代理人　100142907
弁理士　本田　淳

最終頁に続く

(54)【発明の名称】Ｒａｓ変異並びにこれに関連する組成物及び方法

(57)【要約】
【課題】さらなる癌危険因子の同定及び癌の早期診断及び治療のための手段を提供する。
【解決手段】本発明は、新たに見出されたＲａｓ変異及び変異の組合せ、これらの変異を含むタンパク質及びペプチド及び融合タンパク質、このようなタンパク質、ペプチド及び融合タンパク質をコードする核酸分子、並びにこのような変異の利用に関連付けられた様々な技術、及び診断、治療及びスクリーニング方法を開示する。
【選択図】図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
変異Ｒａｓタンパク質の少なくとも５個の隣接するアミノ酸を含むアミノ酸配列をコードする核酸配列を含み、当該アミノ酸配列は、Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ、又はＨ－ｒａｓの野生型タンパク質の第７６位の位置のアミノ酸を含み、かつ、当該第７６位の位置のアミノ酸は上記野生型タンパク質と比較して変異している、単離された核酸分子。
【請求項２】
上記第７６位の位置のアミノ酸は、グルタミン酸塩が、グリシン、リシン及びグルタミンからなる群より選択されるグルタミン酸塩以外のアミノ酸残基に変異したものである、請求項１に記載の単離された核酸分子。
【請求項３】
上記グルタミン酸塩以外のアミノ酸残基がグリシンである、請求項２に記載の単離された核酸分子。
【請求項４】
上記アミノ酸配列は、配列番号３、５、７、９、１１、又は１３の第７６位におけるグルタミン酸塩のグルタミン酸塩以外のアミノ酸への置換によって、上記配列番号３、５、７、９、１１、又は１３のいずれか１つと異なっている、請求項１に記載の単離された核酸分子。
【請求項５】
上記アミノ酸配列はさらに、変異Ｒａｓタンパク質の少なくとも５個の隣接するアミノ酸残基を含み、当該アミノ酸配列は、Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ、又はＨ－ｒａｓの野生型タンパク質の第１２位、第１３位、第５９位及び第６１位からなる群より選択される位置のアミノ酸を含み、さらに、当該位置のアミノ酸は、上記野生型タンパク質と比較して変異している、請求項１に記載の単離された核酸分子。
【請求項６】
上記アミノ酸配列はさらに、変異Ｒａｓタンパク質の少なくとも５個の隣接するアミノ酸残基を含み、当該アミノ酸配列は、Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ、又はＨ－ｒａｓの野生型タンパク質の第１２位の位置のアミノ酸を含み、さらに、当該第１２位の位置のアミノ酸は、上記野生型タンパク質と比較して変異している、請求項１に記載の単離された核酸分子。
【請求項７】
第１２位又は第１３位の位置のアミノ酸が、グリシンからグリシン以外のアミノ酸残基に変異している、請求項６に記載の単離された核酸分子。
【請求項８】
第１２位の位置のアミノ酸が、グリシンからグリシン以外のアミノ酸残基に変異している、請求項６に記載の単離された核酸分子。
【請求項９】
上記グリシン以外のアミノ酸残基が、バリン、システイン、アスパラギン酸塩、アルギニン、セリン及びアラニンからなる群より選択される、請求項７又は８に記載の単離された核酸分子。
【請求項１０】
上記核酸配列は２個以上のドメインを含む融合タンパク質をコードし、上記ドメインの１個が、第７６位の位置に変異を含む変異Ｒａｓタンパク質の少なくとも５個のアミノ酸を含み、さらに他の各ドメインは免疫原からなる、請求項１に記載の単離された核酸分子。
【請求項１１】
上記免疫原は腫瘍抗原である、請求項１０に記載の単離された核酸分子。
【請求項１２】
上記腫瘍抗原は、野生型Ｒａｓアミノ酸配列に関連して少なくとも１個の変異を含む、Ｒａｓタンパク質又はその免疫原性フラグメントである、請求項１１に記載の単離された

核酸分子。
【請求項１３】
上記腫瘍抗原は、上記野生型Ｒａｓアミノ酸配列に関する第１２位又は第１３位の位置を含むＲａｓタンパク質又はその免疫原性フラグメントであり、上記第１２位又は第１３位の位置のアミノ酸は、グリシン残基からグリシン以外の残基に変異している、請求項１２に記載の単離された核酸分子。
【請求項１４】
上記腫瘍抗原は、（ａ）Ｒａｓタンパク質の第８位～第１６位の位置のアミノ酸残基を少なくとも含み、野生型の上記Ｒａｓタンパク質に関して第１２位の位置の上記アミノ酸残基が変異したペプチド；（ｂ）Ｒａｓタンパク質の第９位～第１７位の位置のアミノ酸残基を少なくとも含み、野生型の上記Ｒａｓタンパク質に関して第１３位の位置の上記アミノ酸残基が変異したペプチド；（ｃ）Ｒａｓタンパク質の第５５位～第６３位の位置のアミノ酸残基を少なくとも含み、野生型の上記Ｒａｓタンパク質に関して第５９位の位置の上記アミノ酸残基が変異したペプチド；（ｄ）Ｒａｓタンパク質の第５７位～第６５位の位置のアミノ酸残基を少なくとも含み、野生型の上記Ｒａｓタンパク質に関して第６１位の位置の上記アミノ酸残基が変異したペプチド；（ｅ）Ｒａｓタンパク質の第６９位～第７７位の位置のアミノ酸残基を少なくとも含み、野生型の上記Ｒａｓタンパク質に関して第７３位の位置の上記アミノ酸残基が変異したペプチド；（ｆ）Ｒａｓタンパク質の第７０位～第７８位の位置のアミノ酸残基を少なくとも含み、野生型の上記Ｒａｓタンパク質に関して第７４位の位置の上記アミノ酸残基が変異したペプチド；（ｇ）Ｒａｓタンパク質の第７１位～第７９位の位置のアミノ酸残基を少なくとも含み、野生型の上記Ｒａｓタンパク質に関して第７５位の位置の上記アミノ酸残基が変異したペプチド；（ｈ）Ｒａｓタンパク質の第７３位～第８１位の位置のアミノ酸残基を少なくとも含み、野生型の上記Ｒａｓタンパク質に関して第７７位の位置の上記アミノ酸残基が変異したペプチド；及び（ｉ）Ｒａｓタンパク質の第７４位～第８２位の位置のアミノ酸残基を少なくとも含み、野生型の上記Ｒａｓタンパク質に関して第７８位の位置の上記アミノ酸残基が変異したペプチドからなる群より選択される、請求項１０に記載の単離された核酸分子。
【請求項１５】
上記核酸配列は、配列番号１４に示すアミノ酸配列を含む融合タンパク質をコードしている、請求項１に記載の単離された核酸分子。
【請求項１６】
上記核酸配列は、配列番号１５に示すアミノ酸配列を含む融合タンパク質をコードしている、請求項１に記載の単離された核酸分子。
【請求項１７】
請求項１～１６のいずれか１項に記載の上記核酸配列に完全に相補的である、単離された核酸分子。
【請求項１８】
上記核酸分子は、オリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーである、請求項１～１７のいずれか１項に記載の単離された核酸分子。
【請求項１９】
少なくとも１つの発現制御配列に作動可能に連結された、請求項１～１６のいずれか１項に記載の単離された核酸分子を含む、組み換え核酸分子。
【請求項２０】
請求項１９に記載の組み換え核酸分子を用いてトランスフェクトした、組み換え細胞。
【請求項２１】
上記細胞が酵母である、請求項２０に記載の組み換え細胞。
【請求項２２】
請求項１～１６のいずれか１項に記載の単離された核酸分子によってコードされた、単離されたタンパク質又はペプチド。
【請求項２３】

上記単離されたタンパク質又はペプチドは融合タンパク質の一部である、請求項２２に記載の単離されたタンパク質又はペプチド。
【請求項２４】
請求項１～１６のいずれか１項に記載の核酸分子を含む、ワクチン。
【請求項２５】
請求項２２に記載のタンパク質又はペプチドを含む、ワクチン。
【請求項２６】
上記ワクチンはさらに酵母運搬体を含む、請求項２５に記載のワクチン。
【請求項２７】
上記酵母運搬体は、上記タンパク質又はペプチドを組み換え的に発現する、請求項２６に記載のワクチン。
【請求項２８】
上記ワクチンはさらに樹状細胞を含み、当該樹状細胞は細胞内に上記酵母運搬体及び上記タンパク質又はペプチドを搭載している、請求項２６に記載のワクチン。
【請求項２９】
ａ）酵母運搬体と、
ｂ）変異Ｒａｓタンパク質又はその断片を含む融合タンパク質であって、当該タンパク質又はその断片はＫ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓの野生型タンパク質に関して第７６位の位置のアミノ酸を含み、さらに当該第７６位の位置のアミノ酸は上記野生型タンパク質と比較して変異した融合タンパク質と
を含むワクチンであって、
上記融合タンパク質はＣｕｐ１プロモータによって制御されており、上記融合タンパク質は上記酵母運搬体によって発現される、ワクチン。
【請求項３０】
上記融合タンパク質はさらに第２の変異Ｒａｓタンパク質又はその断片を含み、当該第２の変異Ｒａｓタンパク質又はその断片はＫ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓの野生型タンパク質に関して第１２位の位置のアミノ酸を含み、さらに当該第１２位の位置のアミノ酸は上記野生型タンパク質と比較して変異している、請求項２９に記載のワクチン。
【請求項３１】
上記融合タンパク質は、フレーム単位で融合した以下のタンパク質又は断片を含む、請求項２９に記載のワクチン：
ｉ）Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓの野生型タンパク質に関して第１２位の位置のアミノ酸を含み、上記第１２位の位置のグリシンがシステインに置換されている、変異Ｒａｓタンパク質又はその断片；
ｉｉ）Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓの野生型タンパク質に関して第６１位の位置のアミノ酸を含み、上記第６１位の位置のグルタミンがアルギニンに置換されている、変異Ｒａｓタンパク質又はその断片；
ｉｉｉ）Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓの野生型タンパク質に関して第１２位の位置のアミノ酸を含み、上記第１２位の位置のグリシンがアスパラギン酸塩に置換されている、変異Ｒａｓタンパク質又はその断片；
ｉｖ）Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓの野生型タンパク質に関して第１２位の位置のアミノ酸を含み、上記第１２位の位置のグリシンがバリンに置換されている、変異Ｒａｓタンパク質又はその断片；
ｖ）Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓの野生型タンパク質に関して第１２位の位置のアミノ酸を含み、上記第１２位の位置のグリシンがアルギニンに置換されている、変異Ｒａｓタンパク質又はその断片；及び
ｖｉ）Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓの野生型タンパク質に関して第７６位の位置のアミノ酸を含み、上記第７６位の位置のグルタミン酸塩がグリシンに置換されている、変異Ｒａｓタンパク質又はその断片。
【請求項３２】

上記融合タンパク質は、フレーム単位で融合した以下のタンパク質又は断片を含む、請求項２９に記載のワクチン：
ｉ）Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓの野生型タンパク質に関して第１２位の位置のアミノ酸を含み、上記第１２位の位置のグリシンがアルギニンに置換されている、変異Ｒａｓタンパク質又はその断片；
ｉｉ）Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓの野生型タンパク質に関して第７６位の位置のアミノ酸を含み、上記第７６位の位置のグルタミン酸塩がグリシンに置換されている、変異Ｒａｓタンパク質又はその断片。
【請求項３３】
上記融合タンパク質は配列番号１４に示すアミノ酸配列を含む、請求項２９に記載のワクチン。
【請求項３４】
上記融合タンパク質は配列番号１５に示すアミノ酸配列を含む、請求項２９に記載のワクチン。
【請求項３５】
請求項２２に記載の単離されたタンパク質又はペプチドに選択的に結合する、抗体又はその抗原結合断片。
【請求項３６】
請求項２２に記載の単離されたタンパク質又はペプチドに選択的に結合する、アプタマー。
【請求項３７】
請求項１～１６のいずれか１項に記載の核酸分子によって転写されたＲＮＡ又は変異Ｒａｓタンパク質をコードするｒａｓ遺伝子によって転写されたＲＮＡ、の選択的な切断を触媒するｓｉＲＮＡであって、上記変異Ｒａｓタンパク質は、Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓの野生型アミノ酸配列に関して少なくとも第７６位の位置の変異によって、上記野生型アミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列含む、ｓｉＲＮＡ。
【請求項３８】
請求項１～１６のいずれか１項に記載の核酸分子又は変異Ｒａｓタンパク質をコードするｒａｓ遺伝子、の不活性化を選択的に触媒するリボザイムであって、上記変異Ｒａｓタンパク質は、Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓの野生型アミノ酸配列に関して少なくとも第７６位の位置の変異によって、上記野生型アミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列含む、リボザイム。
【請求項３９】
請求項１～１６のいずれか１項に記載の核酸分子又は変異Ｒａｓタンパク質をコードするｒａｓ遺伝子、に非常に高いストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ発現を抑制する、アンチセンス核酸分子であって、上記変異Ｒａｓタンパク質は、Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓの野生型アミノ酸配列に関して少なくとも第７６位の位置の変異によって、上記野生型アミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列含む、リボザイム。
【請求項４０】
癌の予防又は治療のための組成物の調製における、請求項１～１６のいずれか１項に記載の核酸分子、又は請求項２２若しくは２３に記載のタンパク質若しくはペプチドの使用。
【請求項４１】
癌の予防又は治療のための医薬の調整における、請求項２４～３４のいずれか１項に記載のワクチンの使用。
【請求項４２】
癌の予防又は治療のための医薬の調整における、請求項３６に記載のアプタマー、請求項２７に記載のｓｉＲＮＡ、請求項３８に記載のリボザイム、又は請求項３９に記載のアンチセンス核酸分子の使用。
【請求項４３】

癌を有する又は癌が進行する危険性のある動物に、請求項２４～３４のいずれか1項に記載のワクチンを投与する工程を包含する、癌を予防又は治療する方法。
【請求項４４】
癌を有する又は癌が進行する危険性のある動物に、請求項３６に記載のアプタマー、請求項２７に記載のｓｉＲＮＡ、請求項３８に記載のリボザイム、又は請求項３９に記載のアンチセンス核酸分子を投与する工程を包含する、癌を予防又は治療する方法。
【請求項４５】
癌を有する又は癌が進行する危険性のある動物に、変異Ｒａｓタンパク質の発現を抑制する化合物を投与する工程を包含し、上記変異Ｒａｓタンパク質は、Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓの野生型のアミノ酸配列に関して第７６位において少なくとも変異することによって、上記野生型のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む、癌を予防又は治療する方法。
【請求項４６】
癌を有する又は癌が進行する危険性のある動物に、変異ＲａｓタンパクのＧＴＰ加水分解を先導する又は誘発する化合物を投与する工程を包含し、上記変異Ｒａｓタンパク質は、Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓの野生型のアミノ酸配列に関して第７６位において少なくとも変異することによって、上記野生型のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む、癌を予防又は治療する方法。
【請求項４７】
診断する患者からの試験サンプルにおけるＲａｓタンパク質の発現若しくは活性、又は上記Ｒａｓタンパク質をコードする核酸配列を検出する検出工程を包含し、上記Ｒａｓタンパク質は野生型の上記Ｒａｓのアミノ酸配列に関して第７６位の位置に変異を含み、
上記試験サンプル中における上記変異Ｒａｓタンパク質又は上記Ｒａｓタンパク質をコードする核酸配列の検出が、試験サンプル中における癌細胞の存在又はその可能性を示す、腫瘍の診断のための方法。
【請求項４８】
上記Ｒａｓタンパク質は、野生型タンパク質の第７６位におけるグルタミン酸塩のグリシンへの置換を含む、請求項４７に記載の方法。
【請求項４９】
Ｒａｓタンパク質が、野生型Ｒａｓアミノ酸配列に関して第１２位の位置にも変異を有するか否かを検出する検出工程をさらに包含し、第７６位及び第１２位の位置の変異の検出が、試験サンプル中における腫瘍細胞の存在又はその可能性を示し、さらに、これらの位置の１個のみが変異した又はいずれも変異していないＲａｓタンパク質が潜む腫瘍細胞と比較して、上記患者においてより悪性の腫瘍であることを示す、請求項４７に記載の方法。
【請求項５０】
上記検出工程は、上記試験サンプル中における、Ｒａｓ変異をコードする核酸配列の検出を含む、請求項４７に記載の方法。
【請求項５１】
上記検出工程は、変異をコードするゲノムＤＮＡテンプレートのＰＣＲ増幅、又は変異をコードするＤＮＡ配列のｉｎｓｉｔｕ ＰＣＲ増幅を含む、請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
上記検出工程は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、逆転写酵素－ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）、ｉｎｓｉｔｕハイブリダイゼーション、ノーザンブロット、配列分析、遺伝子マイクロアレイ分析、及びレポーター遺伝子の検出からなる群より選択される方法により行われる、請求項５０に記載の方法。
【請求項５３】
上記試験サンプルから単離された核酸配列を、上記変異Ｒａｓタンパク質をコードする核酸配列に選択的に結合するプライマー又はプローブに接触させ、かつ上記変異Ｒａｓタンパク質をコードする核酸配列が上記プライマー又はプローブに結合するか否かを検出す

ることによって、上記変異Ｒａｓタンパク質をコードする核酸配列のレベルを決定する、請求項４７に記載の方法。
【請求項５４】
上記試験サンプルを、上記変異Ｒａｓタンパク質に特異的に選択的に結合する抗体若しくはその断片又はアプタマーに接触させ、かつ上記抗体若しくはその断片又は上記アプタマーが変異Ｒａｓタンパク質に結合するか否かを検出することによって、上記変異Ｒａｓタンパク質のレベルを決定する、請求項４７に記載の方法。
【請求項５５】
上記試験サンプルは、癌を診断する患者からのものであり、上記試験サンプルをネガティブコントロールサンプルと比較する、請求項４７に記載の方法。
【請求項５６】
上記試験サンプルを基板上に固定している、請求項４７に記載の方法。
【請求項５７】
患者において癌を診断するために用いられる、請求項４７に記載の方法。
【請求項５８】
患者において癌の予後を決定するために用いられる、請求項４７に記載の方法。
【請求項５９】
治療上の処置のための患者の感受性の決定するために用いられる、請求項４７に記載の方法。
【請求項６０】
標的Ｒａｓタンパク質又は標的Ｒａｓタンパク質をコードする核酸分子の阻害物質を同定する同定工程を包含し、上記標的Ｒａｓタンパク質は、野生型Ｒａｓタンパク質に関連する第７６位の位置のアミノ酸に変異を含む、癌を予防又は治療するための化合物を同定するための方法。
【請求項６１】
上記変異は、野生型の上記タンパク質における第７６位のグルタミン酸塩の、グリシン、リシン及びグルタミンからなる群より選択されるグルタミン酸塩以外のアミノ酸への置換である、請求項６０に記載の方法。
【請求項６２】
上記同定工程は、上記標的Ｒａｓタンパク質の発現又は活性の阻害物質の同定を含む、請求項６０に記載の方法。
【請求項６３】
上記工程は、推定される調節化合物の存在下おける、上記標的Ｒａｓタンパク質の翻訳又は活性の検出、及び推定される調節化合物の存在下における、上記標的Ｒａｓタンパク質をコードする遺伝子の発現の検出から選択される検出をする、請求項６２に記載の方法。
【請求項６４】
ａ）宿主細胞を推定される調節化合物に接触させる接触工程であって、上記宿主細胞が上記標的Ｒａｓタンパク質又はその生物学的活性断片を発現している工程、及び
ｂ）上記推定される調節化合物が上記標的Ｒａｓタンパク質又はその生物学的活性断片のＧＴＰ加水分解を誘発するか否かを検出する検出工程であって、推定される調節化合物が、その不在下と比較して上記標的Ｒａｓタンパク質のＧＴＰ加水分解を誘発するとき、当該化合物が癌の予防又は治療のための化合物の候補であることを示す工程
を包含する、請求項６２に記載の方法。
【請求項６５】
上記宿主細胞は腫瘍細胞株である、請求項６４に記載の方法。
【請求項６６】
標的変異Ｒａｓタンパク質を発現するが、野生型Ｒａｓタンパク質を発現しない細胞におけるＧＴＰ加水分解を誘発する化合物を同定する同定工程を包含し、上記標的変異Ｒａｓタンパク質は、野生型Ｒａｓタンパク質に関する第７６位の位置のアミノ酸に変異を含

む、癌を予防又は治療するための化合物を同定するための方法。
【請求項６７】
上記推定される調節化合物は、アプタマー、ｓｉＲＮＡ分子、アンチセンス核酸分子、リボザイム、抗体若しくはその抗原結合断片、立体配座アンタゴニスト及び低分子インヒビターからなる群より選択される、請求項６０～６６のいずれか１項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は概して、本発明者らによりヒトＲａｓにおいて新たに見出された変異の発見に関する。
【背景技術】
【０００２】
〔発明の背景〕
腫瘍形成又は結果として新たな異常成長を招く、急速な細胞増殖の過程は、深刻で時として生命が脅かされ得る多くの病気の特徴を示している。典型的に、細胞及び組織の腫瘍成長は、正常な細胞増殖よりもより巨大として特徴づけられ、この細胞は、扇動因子（例えば、腫瘍プロモーター、発癌物質、ウイルス）がもはや存在していないとしても成長し続ける。細胞性成長は、構造編成及び／又は正常組織との連携の欠如が見られる傾向にあり、たいてい良性又は悪性であり得る組織の塊（例えば、腫瘍）を形成する。
【０００３】
Ｒａｓ変異は、ヒト、マウス、ラット及びハムスターの肺腺癌において一般的である。事実、ｒａｓプロト癌遺伝子ファミリーにおける変異は、ヒト癌及び実験用動物の腫瘍における、最も一般的な癌遺伝子関連変異である。現実に、上記ｒａｓ遺伝子ファミリーの癌遺伝子において、腫瘍細胞の表現型に関連づけられ得るいくつかの異なる変異があることが知られている。Ｒａｓタンパク質における第１２位のアミノ酸をコードするコドンにおける変異が、膵臓癌の７８％、結腸直腸癌の３４％、非小細胞肺腺癌の４０％、及び卵巣癌の２４％において発見されている。第１３位、第５９位及び第６１位のアミノ酸におけるＲａｓ変異もまた、様々な種の癌において発見されている（例えば、Ｌｕら、ＣａｎｃｅｒＲｅｓ．２００４Ａｕｇ１；６４（１５）：５０８４－８；Ａｂｒａｍｓら、Ｓｅｍ Ｏｎｃｏｌ１９９６ ２３，１１８－１３４；Ｆｒｉｄａｙ及びＡｄｊｅｉ、Ｂｉｏｃｈｉｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ａｃｔａ ２００５１７５６，１２７－１４４を参照のこと）。Ｒａｓ癌遺伝子産物経路を介する異常信号は、非制御細胞増殖及び腫瘍形成において重要な役割をふるまう。１２、１３及び６１番目のコドンにおけるこれらの良く同定された変異は、構造性のＲａｓ活性化の原因となる。
【先行技術文献】
【非特許文献】
【０００４】
【非特許文献１】Ｌｕら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２００４ Ａｕｇ１；６４（１５）：５０８４－８；Ａｂｒａｍｓら、Ｓｅｍ Ｏｎｃｏｌ１９９６ ２３，１１８－１３４；Ｆｒｉｄａｙ及びＡｄｊｅｉ、Ｂｉｏｃｈｉｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ａｃｔａ ２００５１７５６，１２７－１４４
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００５】
悪性細胞成長、又は悪性腫瘍は、世界中の主要な死亡原因であり、腫瘍疾患のための効果的な治療の進歩が、調査の大部分の対象である。癌の治療及び予防のための様々な革新的なアプローチが提案されているが、多くの癌が高い死亡率の原因となり続け、かつ治療が困難であり得るか、従来の治療に比較的反応しない。それゆえに、さらなる癌危険因子の同定及び癌の早期診断及び治療方法が、当該分野において引き続き必要である。
【課題を解決するための手段】

【０００６】
本発明の一実施形態は、変異Ｒａｓタンパク質のうちの少なくとも５個の隣接するアミノ酸を含むアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む、単離された核酸分子に関する。このアミノ酸配列は、野生型Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓタンパク質に関して、第７６位の位置のアミノ酸を含み、第７６位の位置のアミノ酸は、野生型タンパク質と比較して変異している。ある局面において、第７６位の位置のアミノ酸は、グルタミン酸塩が、グリシン、リシン及びグルタミンからなる群より選択されるグルタミン酸塩以外のアミノ酸残基に変異している。ある局面において、このグルタミン酸塩以外のアミノ酸残基がグリシンである。ある局面において、上記アミノ酸配列は、配列番号３、５、７、９、１１、又は１３の第７６位におけるグルタミン酸塩のグルタミン酸塩以外のアミノ酸への置換によって、上記配列番号３、５、７、９、１１、又は１３のいずれか１つと異なっている。ある局面において、アミノ酸配列はさらに、変異Ｒａｓタンパク質の少なくとも５個の隣接するアミノ酸残基を含み、当該アミノ酸配列は、Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ、又はＨ－ｒａｓの野生型タンパク質の第１２位、第１３位、第５９位及び第６１位からなる群より選択される位置のアミノ酸を含み、さらに、当該位置のアミノ酸は、上記野生型タンパク質と比較して変異している。
【０００７】
この実施形態のある局面において、アミノ酸配列はさらに、変異Ｒａｓタンパク質の少なくとも５個の隣接するアミノ酸残基を含み、当該アミノ酸配列は、Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ、又はＨ－ｒａｓの野生型タンパク質の第１２位の位置のアミノ酸を含み、さらに、当該第１２位の位置のアミノ酸は、上記野生型タンパク質と比較して変異している。ある局面において、第１２位又は第１３位の位置のアミノ酸が、グリシンからグリシン以外のアミノ酸残基に変異している。ある局面において、上記グリシン以外のアミノ酸残基が、バリン、システイン、アスパラギン酸塩、アルギニン、セリン及びアラニンからなる群より選択される。
【０００８】
この実施形態のある局面において、核酸配列は、２個以上のドメインを含む融合タンパク質をコードし、上記ドメインの１個が、第７６位の位置に変異を含む変異Ｒａｓタンパク質の少なくとも５個のアミノ酸を含み、さらに他の各ドメインは免疫原からなる。ある局面において、上記免疫原は腫瘍抗原である。ある局面において、上記腫瘍抗原は、野生型Ｒａｓアミノ酸配列に関連して少なくとも１個の変異を含む、Ｒａｓタンパク質又はその免疫原性フラグメントである。ある局面において、上記腫瘍抗原は、上記野生型Ｒａｓタンパク質に関する第１２位又は第１３位の位置を含むＲａｓタンパク質又はその免疫原性フラグメントであり、上記第１２位又は第１３位の位置のアミノ酸は、グリシン残基からグリシン以外の残基に変異している。他の局面において、上記腫瘍抗原は、（ａ）Ｒａｓタンパク質の第８位～第１６位の位置のアミノ酸残基を少なくとも含み、上記野生型Ｒａｓタンパク質に関して第１２位の位置の上記アミノ酸残基が変異したペプチド；（ｂ）Ｒａｓタンパク質の第９位～第１７位の位置のアミノ酸残基を少なくとも含み、上記野生型Ｒａｓタンパク質に関して第１３位の位置の上記アミノ酸残基が変異したペプチド；（ｃ）Ｒａｓタンパク質の第５５位～第６３位の位置のアミノ酸残基を少なくとも含み、上記野生型Ｒａｓタンパク質に関して第５９位の位置の上記アミノ酸残基が変異したペプチド；（ｄ）Ｒａｓタンパク質の第５７位～第６５位の位置のアミノ酸残基を少なくとも含み、上記野生型Ｒａｓタンパク質に関して第６１位の位置の上記アミノ酸残基が変異したペプチド；（ｅ）Ｒａｓタンパク質の第６９位～第７７位の位置のアミノ酸残基を少なくとも含み、上記野生型Ｒａｓタンパク質に関して第７３位の位置の上記アミノ酸残基が変異したペプチド；（ｆ）Ｒａｓタンパク質の第７０位～第７８位の位置のアミノ酸残基を少なくとも含み、上記野生型Ｒａｓタンパク質に関して第７４位の位置の上記アミノ酸残基が変異したペプチド；（ｇ）Ｒａｓタンパク質の第７１位～第７９位の位置のアミノ酸残基を少なくとも含み、上記野生型Ｒａｓタンパク質に関して第７５位の位置の上記アミノ酸残基が変異したペプチド；（ｈ）Ｒａｓタンパク質の第７３位～第８１位の位置のア

ミノ酸残基を少なくとも含み、上記野生型Ｒａｓタンパク質に関して第７７位の位置の上記アミノ酸残基が変異したペプチド；及び（ｉ）Ｒａｓタンパク質の第７４位～第８２位の位置のアミノ酸残基を少なくとも含み、上記野生型Ｒａｓタンパク質に関して第７８位の位置の上記アミノ酸残基が変異したペプチドからなる群より選択される。

【０００９】

本実施形態のある局面において、上記核酸配列は、配列番号１４に示すアミノ酸配列を含む融合タンパク質をコードしている。他の局面において、上記核酸配列は、配列番号１５に示すアミノ酸配列を含む融合タンパク質をコードしている。

【００１０】

本発明の他の実施形態は、Ｒａｓ（Ｈ－Ｒａｓ、Ｎ－Ｒａｓ又はＫ－Ｒａｓ）をコードする核酸配列の、少なくとも５つの隣接するアミノ酸を含む単離された核酸分子に関し、当該Ｒａｓにおいて、Ｒａｓアミノ酸配列の、第７３位の位置のプロリン（Ｐ７３）、第７４位の位置のスレオニン（Ｔ７４）、第７５位の位置のグリシン（Ｇ７５）、第７７位の位置のグリシン（Ｇ７７）、及び／又は第７８位の位置のフェニルアラニン（Ｆ７８）が変異している。また、これらの変異のいすれか１つ以上を含むＲａｓのいずれかの断片をコードする核酸分子も本発明に包含され、当該核酸分子は、いずれかのスクリーニング用途、診断用途又は治療用途に有用である。好ましくは、これらの位置のいずれか１つ以上におけるアミノ酸は、Ｒａｓの野生型配列においてこの位置に存在するアミノ酸と異なるアミノ酸によって置換されている。

【００１１】

他の実施形態において、本発明は、第５９、６１、７３、７４、７５、７６、７７又は７８位の位置（又はその一部）のいずれか１つ以上の変異を含むＲａｓタンパク質（Ｈ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＫ－ｒａｓ）であって、Ｒａｓにおいて異なる位置において１つ以上の追加変異を含むＲａｓタンパク質をコードする核酸配列を含む、単離された核酸分子を提供する。変異の好ましい組合せは、第５９、６１、７３、７４、７５、７６、７７又は７８位の位置の１つ以上の変異と、Ｇ１２変異及び／又はＧ１３変異との組み合わせである。他の実施形態において、本発明は異なる核酸分子の組合せを提供する。この核酸分子の少なくとも１個は、第５９、６１、７３、７４、７５、７６、７７又は７８位から選択される位置（及び好ましくは第７３～７８位の位置のいずれか１つから選択される位置）において、１つ以上の変異を含むＲａｓ（又はその一部）であり、１個以上のさらなる核酸分子は、特に限定されないが、Ｇ１２における変異及びＧ１３における変異を含む１つ以上のさらなる変異を含んでいる。

【００１２】

本発明の一実施形態において、上述した核酸分子のいずれかは、オリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーであり得る。

本発明の他の実施形態は、少なくとも１つの発現制御配列に作動可能に連結された、上述したいずれかの核酸分子を含む組み換え核酸分子に関する。

【００１３】

本発明のさらに他の実施形態は、上述したいずれかの組み換え核酸分子を用いてトランスフェクトした組み換え細胞に関する。ある局面において、請求項２０の組み換え細胞において、細胞が酵母である。

【００１４】

本発明の他の実施形態は、上記同定した核酸分子のいずれかの単離された核酸分子によってコードされた、単離されたタンパク質又はペプチドに関する。一実施形態において、単離されたタンパク質又はペプチドは、融合タンパク質の一部である。

【００１５】

本発明の他の実施形態は、上述した核酸配列のいずれかに完全に相補的な、単離された核酸分子に関する。

本発明のさらに他の実施形態は、上述した核酸分子のいずれかを含むワクチンに関する。

【００１６】
本発明の他の実施形態は、上述したタンパク質又はペプチドのいずれかを含むワクチンに関する。ある局面において、ワクチンは酵母運搬体をさらに含む。他の局面において、酵母運搬体は、タンパク質又はペプチドを組み換え的に発現する。ある局面において、ワクチンは樹状細胞をさらに含み、樹状細胞は細胞内に酵母運搬体及びタンパク質又はペプチドを搭載している。
【００１７】
本発明のさらに他の実施形態は、（ａ）酵母運搬体及び（ｂ）変異Ｒａｓタンパク質又はその断片を含む融合タンパク質、を含むワクチンに関する。上記タンパク質又はその断片は、野生型Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓタンパク質に関して第７６位の位置のアミノ酸を含み、第７６位の位置のアミノ酸は野生型と比較して変異しており、上記融合タンパク質の発現は、Ｃｕｐ１プロモータに制御されている。融合タンパク質は酵母運搬体によって発現される。ある局面において、融合タンパク質は、第２の変異Ｒａｓタンパク質又はその断片をさらに備え、第２の変異Ｒａｓタンパク質又はその断片は、野生型Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓタンパク質に関して第１２位の位置のアミノ酸を含み、第１２位の位置のアミノ酸は野生型タンパク質と比較して変異している。
【００１８】
ある局面において、融合タンパク質は、フレーム単位で融合した以下のタンパク質又は断片を備えている：ｉ）Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓの野生型タンパク質に関して第１２位の位置のアミノ酸を含み、上記第１２位の位置のグリシンがシステインに置換されている、変異Ｒａｓタンパク質又はその断片；ｉｉ）Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓの野生型タンパク質に関して第６１位の位置のアミノ酸を含み、上記第６１位の位置のグルタミンがアルギニンに置換されている、変異Ｒａｓタンパク質又はその断片；ｉｉｉ）Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓの野生型タンパク質に関して第１２位の位置のアミノ酸を含み、上記第１２位の位置のグリシンがアスパラギン酸塩に置換されている、変異Ｒａｓタンパク質又はその断片；ｉｖ）Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓの野生型タンパク質に関して第１２位の位置のアミノ酸を含み、上記第１２位の位置のグリシンがバリンに置換されている、変異Ｒａｓタンパク質又はその断片；ｖ）Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓの野生型タンパク質に関して第１２位の位置のアミノ酸を含み、上記第１２位の位置のグリシンがアルギニンに置換されている、変異Ｒａｓタンパク質又はその断片；及びｖｉ）Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓの野生型タンパク質に関して第７６位の位置のアミノ酸を含み、上記第７６位の位置のグルタミン酸塩がグリシンに置換されている、変異Ｒａｓタンパク質又はその断片。
【００１９】
ある局面において、融合タンパク質は、フレーム単位で融合した以下のタンパク質又は断片を含んでいる；ｉ）Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓの野生型タンパク質に関して第１２位の位置のアミノ酸を含み、上記第１２位の位置のグリシンがアルギニンに置換されている、変異Ｒａｓタンパク質又はその断片；ｉｉ）Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓの野生型タンパク質に関して第７６位の位置のアミノ酸を含み、上記第７６位の位置のグルタミン酸塩がグリシンに置換されている、変異Ｒａｓタンパク質又はその断片。
【００２０】
ある局面において、融合タンパク質は、配列番号１４に示すアミノ酸配列を含む。他の局面において、融合タンパク質は、配列番号１５に示すアミノ酸配列を含む。
本発明のさらに他の実施形態は、上述したＲａｓタンパク質又はペプチドのいずれか１つに選択的に結合する抗体又はその抗原結合断片に関する。
【００２１】
本発明の他の実施形態は、上述したＲａｓタンパク質又はペプチドのいずれか１つに選択的に結合するアプタマーに関する。
本発明のさらに他の実施形態は、上述した核酸分子のいずれかによって転写されたＲＮ

Ａ、又は上述した変異Ｒａｓタンパク質のいずれかをコードするｒａｓ遺伝子によって転写されたＲＮＡの選択的な切断を触媒するｓｉＲＮＡに関し、特に変異Ｒａｓタンパク質は、Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓの野生型アミノ酸配列に関して少なくとも第７６位の位置の変異によって、上記野生型アミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列含んでいる。

【００２２】

本発明の他の実施形態は、上述した核酸分子、又は上述した変異Ｒａｓタンパク質のいずれかをコードするｒａｓ遺伝子の不活性化を選択的に触媒するリボザイムに関し、特に変異Ｒａｓタンパク質は、Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓの野生型アミノ酸配列に関して少なくとも第７６位の位置の変異によって、上記野生型アミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列含んでいる。

【００２３】

本発明のさらに他の実施形態は、上述した核酸分子又は上述した変異Ｒａｓタンパク質のいずれかをコードするｒａｓ遺伝子のいずれかに、非常に高いストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ発現を抑制する、アンチセンス核酸分子であって、上記変異Ｒａｓタンパク質は、Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓの野生型アミノ酸配列に関して少なくとも第７６位の位置の変異によって、上記野生型アミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含んでいる。

【００２４】

本発明の他の実施形態は、癌の予防又は治療のための組成物の調製における、上述した核酸分子のいずれか、又は上述したタンパク質若しくはペプチドのいずれかの使用に関する。

【００２５】

本発明の他の実施形態は、癌の予防又は治療のための医薬の調整における、上述したワクチンのいずれかの使用に関する。

本発明の他の実施形態は、癌の予防又は治療のための医薬の調整における、上述したアプタマーのいずれか、上述したｓｉＲＮＡのいずれか、上述したリボザイムのいずれか、又は上述したアンチセンス核酸分子のいずれかの使用に関する。

【００２６】

本発明のさらに他の実施形態は、癌を予防又は治療するための方法に関し、癌を有する又は癌が進行する危険性のある動物に、上述したワクチンのいずれかを投与する工程を包含している。

【００２７】

本発明の他の実施形態は、癌を予防又は治療するための方法に関し、癌を有する又は癌が進行する危険性のある動物に、上述したアプタマーのいずれか、上述したｓｉＲＮＡのいずれか、上述したリボザイムのいずれか、又は上述したアンチセンス核酸分子のいずれかを投与する工程を包含している。

【００２８】

本発明の他の実施形態は、癌を予防又は治療するための方法に関し、癌を有する又は癌が進行する危険性のある動物に、変異Ｒａｓタンパク質の発現を抑制する化合物を投与する工程を包含し、上記変異Ｒａｓタンパク質は、Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓの野生型のアミノ酸配列に関して第７６位において少なくとも変異することによって、上記野生型のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含んでいる。

【００２９】

本発明のさらに他の実施形態は、癌を予防又は治療するための方法に関し、癌を有する又は癌が進行する危険性のある動物に、変異ＲａｓタンパクのＧＴＰ加水分解を先導する又は誘発する化合物を投与する工程を包含し、上記変異Ｒａｓタンパク質は、Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓの野生型のアミノ酸配列に関して第７６位において少なくとも変異することによって、上記野生型のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含んでいる。

【００３０】
本発明の他の実施形態は、診断する患者からの試験サンプルにおけるＲａｓタンパク質の発現若しくは活性、又は上記Ｒａｓタンパク質をコードする核酸配列を検出する工程を包含し、上記Ｒａｓタンパク質は上記野生型Ｒａｓアミノ酸配列に関して第７６位の位置に変異を含んでいる、腫瘍を診断するための方法に関する。試験サンプル中における変異Ｒａｓタンパク質又は上記Ｒａｓタンパク質をコードする核酸配列の検出が、試験サンプル中における癌細胞の存在又はその可能性を示す。ある局面において、Ｒａｓタンパク質は、野生型タンパク質における第７６位の位置のグルタミン酸塩のグリシンへの置換を含む。ある局面において、上記方法はさらに、Ｒａｓタンパク質が、野生型Ｒａｓアミノ酸配列に関して第１２位の位置のアミノ酸配列にも変異を含むか否かを検出する工程を含む。第７６位及び第１２位の位置におけるアミノ酸の変異の検出は、試験サンプル中における腫瘍細胞の存在又はその可能性を示し、さらにこれらの位置の１個のみが変異した又はいずれも変異していないＲａｓタンパク質が潜む腫瘍細胞と比較して、上記患者においてより悪性の腫瘍であることを示す。ある局面において、検出する工程は、試験サンプル中におけるＲａｓ変異をコードする核酸配列の検出を包含する。ある局面において、検出する工程は、変異をコードするゲノムＤＮＡテンプレートのＰＣＲ増幅、又は変異をコードするＤＮＡ配列のｉｎｓｉｔｕ ＰＣＲ増幅を含んでいる。ある局面において、検出する工程は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、逆転写酵素－ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）、ｉｎｓｉｔｕハイブリダイゼーション、ノーザンブロット、配列分析、遺伝子マイクロアレイ分析、及びレポーター遺伝子の検出からなる群より選択される方法により行われる。ある局面において、試験サンプルから単離された核酸配列を、上記変異Ｒａｓタンパク質をコードする核酸配列に選択的に結合するプライマー又はプローブに接触させ、かつ上記変異Ｒａｓタンパク質をコードする核酸配列が上記プライマー又はプローブに結合するか否かを検出することによって、変異Ｒａｓタンパク質をコードする核酸配列のレベルを決定する。ある局面において、試験サンプルを、上記変異Ｒａｓタンパク質に特異的に選択的に結合する抗体若しくはその断片又はアプタマーに接触させ、かつ上記抗体若しくはその断片又は上記アプタマーが変異Ｒａｓタンパク質に結合するか否かを検出することによって、上記変異Ｒａｓタンパク質のレベルを決定する。ある局面において、試験サンプルは癌を診断する患者からのものであり、当該試験サンプルをネガティブコントロールと比較する。ある局面において、試験サンプルは基板上に固定されている。ある局面において、上記方法は、患者において癌を診断するために用いられる。ある局面において、上記方法は、患者において癌の予後を決定するために用いられる。他の局面において、上記方法は、治療上の処置のための患者の感受性を決定するために用いられる。

【００３１】
本発明の他の実施形態は、本発明の診断方法において用いるためのキットに関する。キットは、試験サンプル中において、本発明に係るＲａｓ（タンパク質）又はｒａｓ（核酸）変異の存在又は非存在を検出するために有用ないずれかの試薬を備えていることが好ましく、また、オリゴヌクレオチドプローブ、ＰＣＲプライマー、又はバイオマーカー（例えば、変異したｒａｓ遺伝子、ＲＮＡ、ｃＤＮＡ又はこれらにコードされるタンパク質）に結合する抗体、ペプチドに結合する抗原、若しくはアプタマーを含んでいることが好ましい。キットは、また、本明細書において想定される診断方法を行うために必要ないずれかの試薬を備えていてもよい。キットは、また、上述したＲａｓ変異のような他の癌のバイオマーカー、又は本明細書に記載したＲａｓ変異に関連しない要因若しくは寄与を有する癌をも含む癌診断のための他のいずれかの適した目的物、を検出するための試薬を備えていてもよい。

【００３２】
本発明のさらに他の実施形態は、癌を予防又は治療するための化合物を同定するための方法に関し、標的Ｒａｓタンパク質又は標的Ｒａｓタンパク質をコードする核酸分子の阻害物質を同定する工程を包含している。上記標的Ｒａｓタンパク質は、野生型Ｒａｓタンパク質に関連する第７６位の位置のアミノ酸に変異を含んでいる。ある局面において、変

異は、上記野生型タンパク質における第７６位の位置における、グルタミン酸塩の、グリシン、リシン及びグルタミンからなる群より選択されるグルタミン酸塩以外のアミノ酸への置換である。ある局面において、同定する工程は、標的Ｒａｓタンパク質の発現又は活性の阻害物質の同定を含む。ある局面において、検出する工程は、推定される調節化合物の存在下おける、上記標的Ｒａｓタンパク質の翻訳又は活性の検出、及び推定される調節化合物の存在下における、上記標的Ｒａｓタンパク質をコードする遺伝子の発現の検出から選択される。ある局面において、上記方法は、ａ）宿主細胞を推定される調節化合物に接触させる接触工程であって、上記宿主細胞が上記標的Ｒａｓタンパク質又はその生物学的活性断片を発現している工程、及びｂ）上記推定される調節化合物が上記標的Ｒａｓタンパク質又はその生物学的活性断片のＧＴＰ加水分解を誘発するか否かを検出する検出工程であって、推定される調節化合物が、その不在下と比較して上記標的Ｒａｓタンパク質のＧＴＰ加水分解を誘発するとき、当該化合物が癌の予防又は治療のための化合物の候補であることを示す工程を包含している。ある局面において、宿主細胞は腫瘍細胞株である。

【００３３】

本発明の他の実施形態は、癌を予防又は治療するための化合物を同定するための方法に関し、標的変異Ｒａｓタンパク質を発現するが、野生型Ｒａｓタンパク質を発現しない細胞におけるＧＴＰ加水分解を誘発する化合物を同定する同定工程を包含し、上記標的変異Ｒａｓタンパク質は、野生型Ｒａｓタンパク質に関する第７６位の位置のアミノ酸に変異を含んでいる。

【００３４】

上述した同定する方法のいずれかのある局面において、推定される調節化合物は、アプタマー、ｓｉＲＮＡ分子、アンチセンス核酸分子、リボザイム、抗体若しくはその抗原結合断片、立体配座アンタゴニスト及び低分子インヒビターからなる群より選択される。

【図面の簡単な説明】

【００３５】

【図１】直腸結腸癌、膵臓癌又は非小細胞肺腺癌患者からの遺伝子型腫瘍において発見されたＲａｓ変異のリストを示すグラフである。

【図２Ａ】軟寒天におけるコロニー形成のネガティブ例（トランスフェクトされていないＢＡＬＢ／３Ｔ３マウス細胞）を示す、細胞成長に関する軟寒天分析のデジタル画像である。癌（“形質転換した”）上皮細胞は軟寒天において成長可能であるが、形質転換されていない細胞は軟寒天において成長しない。

【図２Ｂ】軟寒天におけるコロニー形成のポジティブ例（Ｇ１２Ｖ＋Ｅ７６ＧＲａｓトランスフェクトされたＢＡＬＢ／３Ｔ３マウス細胞クローン）を示す、細胞成長に関する軟寒天分析のデジタル画像である。癌（“形質転換した”）上皮細胞は軟寒天において成長可能であるが、形質転換されていない細胞は軟寒天において成長しない。

【図３Ａ】Ｂａｌｂ／ｃヌードマウスにおいて、コドン１２及びコドン７６の両方にＲａｓ変異を有する腫瘍の成長における腫瘍形成の相互作用を証明する、２つの分離した実験結果を示すグラフである。

【図３Ｂ】Ｂａｌｂ／ｃヌードマウスにおいて、コドン１２及びコドン７６の両方にＲａｓ変異を有する腫瘍の成長における腫瘍形成の相互作用を証明する、２つの分離した実験結果を示すグラフである。

【図３Ｃ】図３Ａの調査のさらなる詳細であり、トランスフェクトされていない（野生型）ＢＡＬＢ／３Ｔ３細胞に関して、単一のＥ７６変異トランスフェクトされた細胞の成長を示すものである。

【図４】Ｈ－Ｒａｓのコドン１２変異型（Ｇ１２Ｄ）（左）とＨ－Ｒａｓのコドン６１の変異型（Ｇ６１Ｌ）（右）とを比較した結晶構造を示す概略図である。矢印は、代表的な三次構造における、アミノ酸１２、６１及び７６の推定位置を指している。

【発明を実施するための形態】

【００３６】

〔本発明の詳細な説明〕

本発明は概して、本発明者らによりヒトＲａｓにおいて新たに見出された変異の発見に関する。ヒトＲａｓは、特定の変異の複数の変異体を含み、変異を有する特定の個体において、癌に寄与する又は癌の要因となると考えられる。特に、本発明者らは、ヒトＲａｓ配列（Ｋ－、Ｎ－又はＨ－Ｒａｓ）における７６番目のアミノ酸（例えばコドン７６によってコードされる）における変異が、著しい割合で患者の腫瘍を同定し得ること、及び腫瘍の発癌性を上昇させることを見出した。本発明者らの認識の最もよい点は、この特定のＲａｓ変異が、以前に同定されていなかったことである。本発明はまた、この新たに見出された変異が、特にコドン１２の変異のような、以前から知られていた第２のＲａｓ変異と同時に腫瘍細胞に存在し、これらの変異の組合せは、このような変異を含む腫瘍の発癌性の上昇させるために相互作用することを、本発明者らが見出したことに関する。特に、変異の組合せは、いずれかの変異単独と比較して、腫瘍成長の増大に関して相互作用効果を有することが、ｉｎｖｉｔｒｏ及びｉｎ ｖｉｖｏの両方において証明されている。その結果、本発明は、これらの発見を活用する核酸分子及びタンパク質を提供する。これらの核酸分子及びタンパク質は、詳細を以下に示すように、様々な調査、診断及び処置手段、並びにこれらの発見に基づく使用方法にも同様に活用される。

【００３７】

特に、Ｋ－、Ｎ－及びＨ－ｒａｓ ＤＮＡ配列は、変異Ｒａｓタンパク質を発現する熱殺傷酵母（本明細書でタルモゲン（Ｔａｒｍｏｇｅｎ）と称することもある）の段階１の免疫治療試験の全てにおいて、１４９の対象の腫瘍からのエクソン２及び３を用いた入れ子ＰＣＲ増幅及び直接配列形成によって、腫瘍に関連する変異の存在を特徴づけた。上記腫瘍として、膵臓癌（その６８％にコドン１２、１３又は６１におけるｒａｓ変異が検出された）、直腸結腸癌（その４０％にコドン１２、１３又は６１におけるｒａｓ変異が検出された）、又は非小細胞肺腺癌（ＮＳＣＬＣ）（その９％にコドン１２、１３又は６１におけるｒａｓ変異が検出された）を有するものを用いた。コドン７６における新規なｒａｓ変異が、３個の全ての癌種からの２４の対象において検出された。これらの対象のうち、２２の対象はＥ７６Ｇ変異であり、他の１の対象腫瘍にはＥ７６Ｋ変異が潜んでおり、さらに他の１の対象腫瘍にはＥ７６Ｑの変異が潜んでいた。Ｅ７６と以前から知られているコドン１２又は１３における変異との二重の組合せは、８の対象腫瘍において同定された。

【００３８】

より具体的には、表１に示すように（実施例を参照のこと）、３つの全てのＲａｓ遺伝子（エクソン２及び３）において全配列情報のために得た、３３の肺腫瘍のうちの５（～１５％）、８５の直腸結腸腫瘍のうちの１２（～１４％）、３１の膵臓腫瘍のうちの７（～２２．５％）において、ヒトＲａｓ配列における第７６位の位置のアミノ酸配列（例えば、コドン７６によってコードされた）に変異が発現した（ＲａｓＥ７６変異）。肺直腸結腸腫瘍の１つは、Ｋ－及びＨ－ｒａｓの両方において第７６位の位置のアミノ酸に変異を有していた。直腸結腸腫瘍の場合、１２の第７６位のアミノ酸変異のうちの１０が、グルタミン酸塩からグリシンへの変異であり（Ｅ７６Ｇ）、他の１の第７６位のアミノ酸変異が、グルタミン酸塩からリシンへの変異（Ｅ７６Ｋ）であり、他の１の第７６位のアミノ酸変異が、グルタミン酸塩からグルタミンへの変異であった（Ｅ７６Ｑ）。肺腫瘍及び膵臓腫瘍におけるＥ７６変異は全て、Ｅ７６Ｇ変異であった。概して、この段階１において調査した腫瘍における第７６位の位置のＲａｓアミノ酸における変異の発生は、第１２位の位置のＲａｓアミノ酸変異の発生についで２番目に多かった（図１参照のこと）。同様の腫瘍サンプルの組み合せにおける、従来公知の第１２、１３及び６１位の位置のアミノ酸のＲａｓ変異の発生頻度を、表２に示す（実施例１参照のこと）。Ｅ７６変異は主として、Ｋ－ｒａｓ又はＨ－ｒａｓのエクソン３遺伝子において発生するが、Ｅ７６Ｋ変異はＮ－ｒａｓ遺伝子のエクソン３において発生する。また、上述したように、Ｅ７６と、従来から知られているコドン１２又は１３における変異の二重の組合せは、８の腫瘍において同定された。同時に、これらのデータは、Ｒａｓ遺伝子のコドン７６における変異が

、これらの個体において、癌に寄与する又は癌の原因となることを示した。

【００３９】

本発明者らによるさらなる調査は、Ｂａｌ３Ｔ３細胞のネズミＫ－ｒａｓにおけるコドン７６Ｒａｓ変異の発現が、ｉｎｖｉｔｒｏでのこれらの細胞による軟寒天におけるコロニー形成を確かに増加させることを証明している。特に、ＲａｓＥ７６Ｇ及びＥ７６Ｋ変異は、非臨床調査において、形質転換であることが示唆される。特に所定のコドン７６及び１２の変異の組合せは、腫瘍成長相互作用を結果として引き起こす（例えば、変異の組合せが、これらの二重変異を有するＲａｓを含む腫瘍の発癌性を著しく上昇させるように相互作用する）。さらに、様々な変異Ｋ－ｒａｓ遺伝子をＢＡＬＢ／ｃヌードマウスに注入したとき、二重のＧ１２－Ｅ７６Ｒａｓ変異（特にこの実験においてはＧ１２Ｖ－Ｅ７６Ｇ変異）が、いずれの単一変異も有さない腫瘍細胞と比較して、細胞成長の顕著な促進を引き起こした。これらを見出したことにより、本発明者らは、学説に縛られることなく、Ｅ７６変異がＲａｓ癌タンパク質の活性化を引き起こし得ると確信する。

【００４０】

従来より知られているコドン１２又はコドン６１における変異はそれぞれ、ＧＴＰから放出されるγ－リン酸塩を遮り、ＧＴＰ加水分解を引き起こすためのＲａｓ－ＧＡＰタンパク質のＲａｓへの結合を阻害する。Ｒａｓの公知の結晶構造における、第７６位のアミノ酸の位置を、本発明者らが調査したとき、この残基は、スイッチ２（Ｓｗｉｔｃｈ２）又はループ４（Ｌｏｏｐ ４）として知られているループの端部に位置している（図４参照のこと）。図４を参照すると、タンパク質三次構造において、第１２、１３、６１及び７６位のアミノ酸の推定位置を表示した（例えば、Ｒａｓ結晶構造内のアミノ酸位置は、ＲＳＳＢプロテインデータバンク（ＰＤＢ）又はＦｒａｎｋｅｎ，ＳＭら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ１９９３，３２：８４１１－２０、において複数の構造が見られる）。この概略図は、野生型（Ｇ１２）配列のドメイン（右）と比較して、Ｈ－Ｒａｓにおいてコドン１２が変異した（Ｇ１２Ｄ）ことによるＲａｓタンパク質結晶構造（左）の変化を表示する。加えて、Ｈ－Ｒａｓのコドン６１変異型を有するドメイン（右）の変化した構造が、野生型配列のドメイン（左）との比較によって明確である。ループ４に近接する端部には、動物及びヒトの癌においてＲａｓ癌タンパク質を活性化するとして、本発明よりも前に変異が定義されていた、第６１位のアミノ酸が潜んでいる（例えば、ＬｕらのＣａｎｃｅｒＲｅｓ．２００４ Ａｕｇ １；６４（１５）：５０８４－８参照のこと；また、多数の臨床研究も参照のこと；さらに、実施例１に記載の最新の試験においても、２人の直腸結腸癌患者がＲａｓコドン６１に変異を有していた）。Ｒａｓタンパク質におけるこのループは、Ｒａｓを不活性ＧＤＰ結合型に変換するために、活性化Ｒａｓタンパク質に結合するＧＴＰの加水分解を誘発するＧＴＰａｓｅ活性化タンパク質（Ｒａｓ－ＧＡＰｓ）への結合を含んでいる。ＧＴＰ加水分解を誘発するための無力化は、Ｒａｓタンパク質を活性状態に維持し（ＧＴＰ結合）、それゆえに細胞増殖のためのシグナルが構成的に送られる。このため、コドン６１における変異は、相互作用するタンパク質が活性状態を失うことを阻害する。コドン１２における変異は、終止リン酸塩の放出を妨害するので、タンパク質は活性状態のままである。それゆえに、活性状態は、上流の活性化物質から増殖シグナルを送るため、又は変異したＲａｓタンパク質の場合、構成的な活性化シグナルを伝達するために、下流のエフェクタータンパク質に結びつくことが可能な、Ｒａｓタンパク質（ＧＴＰ結合を有する）の立体配座である。

【００４１】

重要なスイッチ２／ループ４（ＧＴＰ結合）ドメインの他の“要所”における第７６位のアミノ酸の位置は、このアミノ酸の変異が同様にＲａｓの機能を干渉するという本発明者らの意見に矛盾しない。例えば、グルタミン酸塩からグリシンへの変異（ＲａｓＥ７６Ｇ変異）は、例えば、Ｒａｓ配列をグリシン－グルタミン酸塩－グリシン（コドン７４～７６の１文字コードＧＥＧ）から、グリシン－グリシン－グリシン（コドン７４～７６の１文字コードＧＧＧ）に変化させるだろう。アルファヘリックス構造へのグリシンの導入は、アルファヘリックスループ構造の維持を生化学的に阻害することが知られている。そ

れゆえに、ＧＥＧからＧＧＧへの変化が、ループ４／スイッチ２のアルファヘリックス構造を崩壊させることが予想され、ＧＴＰ加水分解を促進するために必要な立体配座の変化を妨害するだろう。同様に、第７６位のアミノ酸におけるグルタミン酸塩からリシンへの変化、又はグルタミン酸塩からグルタミンへの変化（それぞれＥ７６Ｋ又はＥ７６Ｑ）は、アミノ酸の変化を修正するだろう。また、グルタミン酸塩の負の電荷が、分子内又は分子間タンパク質－タンパク質相互作用にとって重要であるならば、タンパク質の構造及び機能が崩壊する可能性もある。それゆえに、ヒト腫瘍の多くの部分がＲａｓＥ７６変異を有しているという本発明者らによる所見は、Ｒａｓ構造及び機能研究によって説明することができる。結果的に、ヒト腫瘍におけるコドン７６のｒａｓ変異の同定は、癌治療の新しい標的を表す。

【００４２】

これらの所見は、Ｅ７６に関連する要所領域における目的の変異が、Ｐ７３、Ｔ７４、Ｇ７５、Ｅ７６、Ｇ７７、及びＦ７８のアミノ酸における変異もまた含んでおり、かつこれらの位置の変異がＲａｓＧＴＰ加水分解において、上述したＥ７６変異としての細胞増殖（腫瘍成長）と同様の効果を有するだろうという、本明細書におけるさらなる提案に本発明者らに導いている。結果的に、コドン７３、７４、７５、７７及び７８における変異もまた、癌治療の新しい標的を表す。

【００４３】

本発明者らの成果はまた、二重の変異を有する腫瘍が、攻撃的な成長特性をより示しやすいことを示している。それゆえに、患者腫瘍におけるコドン１２及び７６の二重のｒａｓ変異の遺伝子型は、本明細書に記載のデータに示すように、増進した悪性表現型の予後になると考えられる。したがって、コドン７６のｒａｓ変異を含む変異の組合せの同定は、癌治療のさらに他の新しい標的を示す。さらに、実施例１における本発明者らのデータから、ＲａｓのＡ５９又はＱ６１における変異もまた、Ｇ１２又はＧ１３変異に結合することを見出し得る。したがって、本発明者らは、本明細書において、Ｇ１２又はＧ１３における変異（終止リン酸塩の放出の阻害）の、Ａ５９、Ｑ６１若しくはＥ７６のいずれか１つ以上、又は確かに、Ｅ７６（例えば、Ｐ７３、Ｔ７４、Ｇ７５、Ｅ７６、Ｇ７７、Ｆ７８）としての同様の要所領域における他のアミノ酸のいずれか１つとの、他の組合せはまた、ＲａｓＧＴＰ加水分解を抑制することによって細胞増殖のシグナリングを悪化させ、それにより、転移可能性が上昇した、より攻撃的な腫瘍表現型を引き起こす。このことは、Ｇ１２及びＥ７６における変異の組合せに関して提供したデータによって示すように、ＧＴＰａｓｅ活性のシグナルの無力化（スイッチ２／ループ４領域のいずれかの側における第５９、６１、７３～７８位の位置の変異の効果）を伴う分裂したＧＴＰの放出の可能性を減少させる（第１２／１３位の位置の変異の効果）組合せが、重要な指令によって細胞増殖シグナリングを悪化させる、という本発明者らの所見に基づいている。本発明者らのデータは、同じＤＮＡ分子において生じる変異の組合せが、より攻撃的な表現型を導き、かつ悪性の転移を可能にし得ることを示しているが、この表現型は、同じＤＮＡ分子（同じ遺伝子）における２つの変異、及び／又はＲａｓ対立遺伝子の両方において別々に生じる変異を介して生じ得る。したがって、本発明は、第１２又は１３位の位置の変異と、第５９、６１、７３、７４、７５、７６、７７又は７８位の位置の変異とのいずれかの組合せを有する核酸分子を含み、本発明の特定の実施形態では、第１２又は１３位の位置の間と、第５９、６１又は７６の位置との組合せを伴う。これらの組合せを含むタンパク質又はペプチド、並びに核酸分子及びタンパク質の使用（及びこれに関連する技術）は、以下により詳細に記載するように、全て本発明に包含される。

【００４４】

それゆえに、本発明の一実施形態は、Ｒａｓ（Ｈ－Ｒａｓ、Ｎ－Ｒａｓ又はＫ－Ｒａｓ）をコードする核酸配列を含む、単離された核酸分子に関し、ＲａｓアミノＲ酸配列の第７６位の位置のグルタミン酸塩（Ｅ７６）が変異している。また本発明は、第７６位の位置の変異を含むＲａｓのいずれかの断片をコードする核酸分子を包含し、核酸分子は、スクリーニング用途、診断用途又は治療用途のいずれかにおいて有用である。好ましくは、第

７６位の位置のアミノ酸は、他のアミノ酸（グルタミン酸以外の、又は“非グルタミン酸アミノ酸”）によって置換される。このアミノ酸による置換は、特に限定されないが、グリシン置換、リシン置換又はグルタミン置換を含む。他の実施形態において、本発明は、Ｅ７６変異、及びＲａｓにおける異なる位置に１以上のさらなる変異を含むＲａｓ（Ｈ－Ｒａｓ、Ｎ－Ｒａｓ又はＫ－Ｒａｓ）（又はその一部）をコードする核酸分子を含む、単離された核酸分子を提供する。上述したように本発明のこの特徴はこの組合せに限定されないが、変異の好ましい組合せはＥ７６変異とＧ１２変異との組合せである。他の実施形態において、本発明は、異なる核酸分子の組合せを提供し、その少なくとも１つは、Ｅ７６変異を含むＲａｓ（又はその一部）をコードし、他の１つ以上のさらなる核酸分子は、これに限定されないがＧ１２における変異、Ｇ１３における変異、Ａ５９における変異、及び／又はＱ６１における変異を含む、１つ以上のさらなる変異を含む。第７６位の位置の変異単独、又はそのようなさらなる変異との結合を含むＲａｓタンパク質又はペプチドをコードする核酸分子は、例えば、調査若しくは診断技術のためのプローブ若しくはプライマーとして、診断若しくは治療試薬としてのアンチセンス分子若しくはｓｉＲＮＡ分子（以下に示す）の準備のため、並びに／又は調査、診断及び／若しくは治療試薬として使用するためのＲａｓタンパク質及びペプチドをコードしているために有用である。これらを以下でより詳細に説明する。

【００４５】

本発明の他の実施形態は、Ｒａｓ（Ｈ－Ｒａｓ、Ｎ－Ｒａｓ又はＫ－Ｒａｓ）をコードする核酸配列を含む、単離された核酸分子に関し、ＲａｓのＲａｓアミノ酸配列における、第７３位の位置のプロリン（Ｐ７３）、第７４位の位置のスレオニン（Ｔ７４）、第７５位の位置のグリシン（Ｇ７５）、第７７位の位置のグリシン（Ｇ７７）、及び／又は第７８位の位置のフェニルアラニン（Ｆ７８）が変異している。これらの変異のいずれか１つ以上を含むＲａｓのいずれかの断片をコードする核酸分子もまた、本発明に包含され、核酸分子は、スクリーニング用途、診断用途又は治療用途のいずれかにおいて有用である。好ましくは、これらの位置のいずれか１つ以上におけるアミノ酸が、Ｒａｓの野生型配列のこの位置において生じるものと異なるアミノ酸に置換されている。

【００４６】

他の実施形態において、本発明は、第５９、６１、７３、７４、７５、７６、７７又は７８位のいずれか１つ以上の位置の変異、及びＲａｓにおける異なる位置における１つ以上のさらなる変異を含む、Ｒａｓタンパク質（Ｈ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ又はＫ－ｒａｓ）（又はその一部）をコードする核酸配列を含む、単離された核酸分子を提供する。変異の好ましい組合せは、Ｇ１２変異及び／又はＧ１３変異と、第５９、６１、７３、７４、７５、７６、７７又は７８位の位置の変異のいずれか１つ以上との組合せである。他の実施形態において、本発明は、異なる核酸分子、少なくとも１つの、第５９、６１、７３、７４、７５、７６、７７又は７８位の位置から選択される（好ましくは第７３～７８位の位置のいずれか１つから選択される）いずれか１つ以上の位置の変異を含むＲａｓ（又はその一部）をコードするもの、及び特に限定されないが、Ｇ１２における変異及びＧ１３における変異を含む、１つ以上のさらなる変異を含む１つ以上のさらなる核酸分子、の組合せを提供する。

【００４７】

上述した変異及びその組合せのいずれかを含むＲａｓタンパク質又はペプチドをコードする核酸分子は、例えば、調査若しくは診断技術のためのプローブ若しくはプライマーとして、診断若しくは治療試薬としてのアンチセンス分子若しくはｓｉＲＮＡ分子（以下に示す）の準備のため、並びに／又は調査、診断及び／若しくは治療試薬としての使用としてのＲａｓタンパク質及びペプチドをコードするために、有用である。これらは全て、以下でより詳細に説明する。

【００４８】

本発明はさらに、上述した核酸分子のいずれかによってコードされた、第７６位の位置の変異（又は、第７３、７４、７５、７６、７７又は７８位の位置における変異のいずれ

か１つ以上）単独、又は他の変異との組合せを含むＲａｓタンパク質のいずれかの断片を含む、タンパク質を含む。このタンパク質は、調査用途、診断用途、又は治療用途において有用である。

【００４９】

第７３、７４、７５、７６、７７若しくは７８位の位置における変異、又は上述したＲａｓ変異の組み合わせのいずれか、の使用と同様に、ＲａｓＥ７６変異の使用は、多様な治療、診断及び治療ツールを包含するために、さらに拡張され得る。この使用の拡張は、この特定の変異及びその組合せを有するＲａｓタンパク質に選択的に結合する抗体の発展；この特定の変異及びその組合せを有するＲａｓタンパク質に選択的に結合するアプタマーの発展；この特定の変異及びその組合せを有するＲａｓの発現の抑制のための診断試薬又は治療ツールとして有用な、ｓｉＲＮＡ又はアンチセンス核酸配列の発展；ＧＴＰ加水分解を誘発する、又はそうでなくても、この点についてこれらの変異Ｒａｓタンパク質の不足又は活動過多を補完する立体配座アンタゴニストを含む、治療分子の発展；及び／又はトランスジェニック動物及びこれらの変異又はその組合せを発現する細胞株を含む動物モデルの発展を含む。

【００５０】

本発明の他の実施形態は、Ｒａｓ　Ｅ７６変異、又は第７３、７４、７５、７７若しくは７８位の位置における変異、若しくは上述したＲａｓ変異の組合せのいずれかの、癌の診断又は予後分析におけるマーカーとしての使用に関する。例えば、生物学的サンプルを、癌又は進行する癌の危険性を試験する患者から得ることができ、また、遺伝子、ＲＮＡ又はタンパク質のいずれかのレベルにおいて、Ｅ７６変異（又は第７３、７４、７５、７７若しくは７８位の位置における変異）を有するＲａｓの発現を分析することができる。この変異を有するＲａｓを発現する患者は、この変異を有さないヒトと比較して、癌を有する危険性が高いと予測される、又はむしろ癌を有すると診断される。さらに第２のＲａｓ変異に加えて、第５９、６１、７３、７４、７５、７６、７７又は７８位の位置のいずれか１つにおける変異、及び特にＧ１２又はＧ１３変異（特定の標的にあるＥ７６及びＧ１２における変異の組合せを伴う）を有するＲａｓを発現する患者は、Ｒａｓにおいてこのような変異の組合せを有さないヒトと比較して、癌を有する危険性がさらにより高いと予測される、より攻撃的な癌を有すると診断される、又はむしろ癌を有すると判断される。加えて、Ｒａｓの第７３～７８位の位置の変異（及び特にＥ７６変異）、及びこれらの変異又は第５９若しくは６１位の位置の変異と、他の変異（例えば、Ｇ１２変異又はＧ１３変異）との組合せのいずれかの存在又は不在は、患者の癌治療の決定又は患者の治療の克服を予測するために用いられ得る。例えば、ＲａｓＥ７６Ｇ変異を有する患者は、Ｒａｓ　Ｅ７６変異の存在に基づく特定の治療組成物（ＧＴＰ加水分解に影響を及ぼす組成物の選択による）を用いて、特定の方法において治療することができる。確かに、以下に記載する本発明の実施形態は、この特定の変異又は第７３～７８位の位置の変異若しくはここに記載した変異の組合せの同定に基づく、免疫治療のアプローチを導く。Ｅ７６変異とＧ１２変異のような他の変異との組合せを有する患者は、特に攻撃的な腫瘍を有すること及び／又は発生した部位からの初期腫瘍の転移を促進し得ることが予測でき、それに応じて、Ｅ７６障害又はこの変異の組合せに基づく免疫治療アプローチを含むような治療が可能である。Ｇ１２又はＧ１３変異とスイッチ２／ループ４領域における変異との他の組合せは、上述したように、特に攻撃的な腫瘍を示しているとも予測される。本発明のさらに他の実施形態は、患者における癌の治療のための治療アプローチの標的としての、ＲａｓＥ７６変異（又は第７３、７４、７５、７７若しくは７８位の位置の変異、又はここに示したＲａｓ変異の組合せのいずれか）の使用に関する。このような治療アプローチには、化学療法アプローチ及び免疫治療アプローチが含まれ得るが、これに限定されない。例えば、上述したように、ＲａｓＥ７６変異の作用の提案したメカニズムに基づくと、例えばＲａｓタンパク質からのＧＴＰの加水分解を可能にし、又はそうでなければ、ＧＴＰ加水分解を誘発するためのＲａｓの無力化を補償するような、化学療法ストラテジーを設計又は提案することができる。好ましくは、野生型、すなわち変異していないＲａｓタンパク

質（以下により詳細に説明する）のＧＴＰ加水分解に影響を与えることなく、変異Ｒａｓタンパク質のＧＴＰ加水分解を調節することが可能な化合物を設計する。例として、様々な合成分子、アプタマー、又は立体配座アンタゴニストは、活性Ｒａｓタンパク質のＧＴＰ加水分解を誘発するためにここに提供された情報の使用を発展させることができる。免疫療法アプローチにおいて、ＲａｓＥ７６変異（又は第７３～７８位の位置における他の変異）は、この変異したＲａｓを発現する腫瘍細胞に対する免疫反応を刺激するための、変異Ｒａｓ抗原の生産又は供給において使用される。変異したＲａｓタンパク質若しくはペプチド、又はこれをコードする核酸は、例えば、腫瘍細胞においてＲａｓタンパク質の発現又は活性化を加減すると予測される、新規な小分子又はペプチド薬を同定するための分析における標的として用いることができる。本実施形態の好ましい局面を以下に示す。

【００５１】

本発明の他の実施形態は、癌に対して動物を防御するための、予防若しくは治療ワクチン又は組成物、及びその使用方法に関する。ワクチン又は組成物は、上述したＥ７６変異を含むＲａｓの１つ以上の免疫原性部位（又は第７３、７４、７５、７７又は７８位の位置における変異を含むＲａｓの１つ以上の免疫原性部位）を含む抗原を含むことができる。この変異は単独、若しくは他の変異を含むＲａｓの他の免疫原性部位との組合せ、治療若しくは予防するための腫瘍に関連する他の免疫原との組合せであることができる。ワクチン又は組成物は、また、上述したＲａｓ変異の組合せのいずれかを含むＲａｓの１つ以上の免疫原部位を、単独又は治療若しくは予防するための腫瘍に関連する他の免疫原と組合せて含む、抗原もまた含むことができる。アジュバント、キャリア又は他の運搬体のいずれかを含む、このような抗原を運搬するための薬学的に許容される運搬体のいずれかを、ワクチン又は組成物に包含させてもよい。ある好ましい実施形態において、運搬体は、以下に詳細に説明する酵母運搬体である。Ｒａｓ抗原は、ＲａｓＥ７６変異（第７３、７４、７５、７７若しくは７８位の位置における変異、又は上述したＲａｓ変異の組合せのいずれか）を有するいずれかの癌の治療のための組成物において提供され得、また、マルチエピトープの一分子、及び／又は様々な癌の治療のための生産物に基づく複数の抗原として提供され得、ＲａｓＥ７６変異（又は、第７３、７４、７５、７７若しくは７８位の位置における変異、又は上述したＲａｓ変異の組合せのいずれか）を有する全ての癌を含み得る。上述したように、他のＲａｓ抗原及び／又は他の癌抗原若しくはその免疫原性部位を、ワクチン又は組成物に包含させてもよい。

【００５２】

（一般的な技術）

本発明の実践においては、特に示さない限り、分子生物学（組み換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学、核酸化学、及び免疫学において、当該技術分野においてよく知られた従来の技術を採用する。このような技術は、Ｍｅｔｈｏｄｓｏｆ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１９４，Ｇｕｔｈｒｉｅら、ｅｄｓ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９０）；Ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ ａｃｔｉｖｉｔｉｅｓ ｏｆ ｙｅａｓｔｓ，Ｓｋｉｎｎｅｒら、ｅｄｓ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９８０）；Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ ｙｅａｓｔ ｇｅｎｅｔｉｃｓ：ａ ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｃｏｕｒｓｅ ｍａｎｕａｌ，Ｒｏｓｅら、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９０）；Ｔｈｅ Ｙｅａｓｔ Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ：Ｃｅｌｌ Ｃｙｃｌｅ ａｎｄ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｐｒｉｎｇｌｅら、ｅｄｓ．，ＣｏｌｄＳｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９７）；Ｔｈｅ Ｙｅａｓｔ Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ：Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ，Ｊｏｎｅｓら、ｅｄｓ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９３）；Ｔｈｅ Ｙｅａｓｔ Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ：Ｇｅｎｏｍｅ Ｄｙｎａｍｉｃｓ，ＰｒｏｔｅｉｎＳｙｎｔｈｅｓｉｓ，ａｎｄ Ｅｎｅｒｇｅｔｉｃｓ，Ｂｒｏａｃｈら、ｅｄｓ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９２）；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，ｓｅｃｏｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ（Ｓ

ambrookら、１９８９）ａｎｄＭｏｌｅｃｕｌａｒＣｌｏｎｉｎｇ：ＡＬａｂｏｒａｔｏｒｙＭａｎｕａｌ，ｔｈｉｒｄｅｄｉｔｉｏｎ（Ｓａｍｂｒｏｏｋａｎｄ Ｒｕｓｓｅｌ，２００１），（ｊｏｉｎｔｌｙｒｅｆｅｒｒｅｄｔｏｈｅｒｅｉｎａｓ“Ｓａｍｂｒｏｏｋ”）；ＣｕｒｒｅｎｔＰｒｏｔｏｃｏｌｓｉｎＭｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌら、ｅｄｓ．，１９８７，ｉｎｃｌｕｄｉｎｇｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔｓｔｈｒｏｕｇｈ２００１）；ＰＣＲ：ＴｈｅＰｏｌｙｍｅｒａｓｅＣｈａｉｎＲｅａｃｔｉｏｎ，（Ｍｕｌｌｉｓら、ｅｄｓ．，１９９４）；Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄＬａｎｅ（１９８８）Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，ＡＬａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，ＣｏｌｄＳｐｒｉｎｇＨａｒｂｏｒＰｕｂｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；Ｈａｒｌｏｗａｎｄ Ｌａｎｅ（１９９９）ＵｓｉｎｇＡｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ ＬａｂｏｒａｔｏｒｙＭａｎｕａｌ Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ ＬａｂｏｒａｔｏｒｙＰｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ（ｊｏｉｎｔｌｙ ｒｅｆｅｒｒｅｄ ｔｏ ｈｅｒｅｉｎ ａｓ“Ｈａｒｌｏｗａｎｄ Ｌａｎｅ”），Ｂｅａｕｃａｇｅら、ｅｄｓ．，ＣｕｒｒｅｎｔＰｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ ＣｈｅｍｉｓｔｒｙＪｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，２０００）；Ｃａｓａｒｅｔｔ ａｎｄ Ｄｏｕｌｌ’ｓ Ｔｏｘｉｃｏｌｏｇｙ Ｔｈｅ Ｂａｓｉｃ Ｓｃｉｅｎｃｅｏｆ Ｐｏｉｓｏｎｓ，Ｃ．Ｋｌａａｓｓｅｎ，ｅｄ．，６ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ（２００１），ａｎｄＶａｃｃｉｎｅｓ，Ｓ．Ｐｌｏｔｋｉｎ及びＷ．Ｏｒｅｎｓｔｅｉｎ，ｅｄｓ．，３ｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ（１９９９）のような文献において完全に説明されている。

【００５３】

（一般的な定義）

本明細書において一般的に言及する“Ｒａｓ変異”は、特定しない限り、ｒａｓ遺伝子、又はｒａｓ遺伝子から得られる若しくはｒａｓ遺伝子由来の核酸（例えば、ＲＮＡ、ＤＮＡ）の核酸配列における変異に関し、同様に、そのＲａｓタンパク質又はペプチドのアミノ酸配列における変異に関する。Ｒａｓの核酸配列又はアミノ酸配列の特定の位置における変異に関しては、変異が発生するコドン又はアミノ酸の位置を参照することによって示すことが可能であり、このような参照は交換可能に使用できる（例えば、“コドン７６”、“第７６位の位置”又は“Ｅ７６”による参照は全て、Ｒａｓの第７６位のアミノ酸、又は第７６位の位置における実際のアミノ酸残基（グルタミン酸塩）をコードするｒａｓ核酸配列におけるコドンに関して用いられ、変異は核酸又はアミノ酸配列のいずれかにおいて示される）。

【００５４】

本発明にしたがって単離された核酸分子は、（例えば、ヒトの操作を受けて）その自然の状態から除去された核酸分子であり、その自然の状態とは、自然界において発見される核酸分子におけるゲノム又は染色体である。したがって、“単離された”は、核酸分子の精製の程度を反映している必要はなく、自然界において発見される核酸分子における完全なゲノム又は完全な染色体を含んでいないことを示している。加えて、単離された核酸分子は、腫瘍サンプルから精製した核酸分子のライブラリのような、核酸分子のライブラリではない。単離された核酸分子は、遺伝子を含むことができる。遺伝子を含む単離された核酸分子は、このような遺伝子を含む染色体の断片ではなく、むしろこの遺伝子に関連するコード領域及び調節領域を含み、同じ染色体において自然に発見されるさらなる遺伝子は含まない。単離された核酸分子はまた、自然界における特定の核酸配列の端部には通常付加されていない、さらなる核酸分子（例えば、異種配列）が端部（例えば、配列の５’及び／又は３’末端）に付加された特定の核酸配列を含んでいてもよい。単離された核酸分子は、ＤＮＡ、ＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）、又はＤＮＡ若しくはＲＮＡのいずれかの誘導体（例えば、ｃＤＮＡ、ｓｉＲＮＡ）を含むことができる。用語“核酸分子”は、基本的には、物理的な核酸分子に関し、また、用語“核酸配列”は、基本的には、核酸分子におけるヌクレオチドの配列に関するが、２つの用語は、特にタンパク質又はタンパク質のドメイン若しくは一部をコードすることが可能な、核酸分子又は核酸配列に関して置換

可能に用いられる。

【００５５】

本発明の核酸分子の最小サイズは、本発明の核酸分子の相補配列と安定したハイブリッドを形成することが可能な（適度な、高い又は非常に高いストリンジェントな条件下において）、プローブ又はオリゴヌクレオチドプライマーを形成するために十分な大きさ、又は免疫原性エピトープとして提供されるアミノ酸配列をコードするのに十分な大きさであり、抗体又はペプチドに結合する抗原の生成に用いられるのに十分であり、自然界においてコードされるタンパク質（例えばＲａｓ）若しくは変異タンパク質（例えばＲａｓ変異）又はその断片の生物学的活性を有する。したがって、このようなタンパク質をコードする核酸分子の大きさは、核酸組成物及びホモロジー比率、又はそれ自体のハイブリダイゼーション条件（例えば、温度、塩濃度及びホルムアミド濃度）と同様に、核酸分子と相補的な配列との間の同一性に依存することができる。オリゴヌクレオチドプライマー又はプローブとして用いられる核酸分子の最小サイズは、典型的には、核酸分子がＧＣリッチである場合、長さが少なくとも約１２～１５ヌクレオチドであり、核酸分子がＡＴリッチである場合、長さが少なくとも約１５～１８塩基である。本発明の核酸分子の最大サイズは、実践の制限以外には特に限定されず、核酸分子は、上述した発明のいずれかの実施形態における利用に十分な配列を含むことができる。

【００５６】

本発明の単離された核酸分子は、組み換えＤＮＡ技術（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）増幅、クローニング）又は化学合成を用いて生成することができる。単離された核酸分子は自然の核酸分子及びそのホモログを含み、限定されないが、自然の対立遺伝子変異体、及びその修飾によって望ましい効果が提供されるような方法において、ヌクレオチドを挿入、欠失、置換及び／又は転化することによって修飾した核酸分子を含む（例えば、本明細書に示すように、Ｅ７６Ｇ変異のＲａｓアミノ酸配列への導入）。

【００５７】

核酸分子ホモログは、当該技術分野において公知の多数の方法を用いて生成することができる（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、ＭｏｌｅｃｕｌａｒＣｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，ＣｏｌｄＳｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｓ Ｐｒｅｓｓ（１９８９）参照のこと）。例えば、核酸分子は、部位特異的変異、変異を引き起こすための核酸分子の化学処理、核酸断片の制限酵素切断、核酸断片のライゲーション、ＰＣＲ増幅及び／又は核酸配列の選択された領域の突然変異誘発、オリゴヌクレオチド混合物の合成、並びに核酸分子及びその組合せの混合物の“構築”のための混合グループのライゲーションのような、伝統的な突然変異誘発技術及び組み換えＤＮＡ技術を含む様々な技術を用いて修飾することができるが、これに限定されない。核酸分子ホモログは、修飾された核酸の混合物から、核酸がコードするタンパク質の機能によってスクリーニングする、及び／又は野生型遺伝子とハイブリダイズすることによって、選択することができる。オリゴヌクレオチドプローブ、又はプローブは、典型的には、長さが約８ヌクレオチドから数百ヌクレオチドのサイズ範囲の核酸分子である。このような分子は、典型的には、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下において標的核酸配列とハイブリダイズすることによって、サンプル中の標的核酸配列を同定するために用いられる。ハイブリダイゼーション条件の詳細は、上述している。

【００５８】

ＰＣＲプライマーもまた、核酸配列であるが、ＰＣＲプライマーは、典型的には、ポリメラーゼ連鎖反応において用いられる、かなり短い長さのオリゴヌクレオチドである。ＰＣＲプライマー及びハイブリダイゼーションプローブは、標的配列からの配列情報を用いて、当業者いよって直ちに構築及び生産される（例えば、上述したＳａｍｂｒｏｏｋら、上述したＧｌｉｃｋらの文献を参照のこと）。

【００５９】

アプタマーは、高い親和性及び特性を有する、予測される特定の標的分子に結合する可能性の点において、ランダム化した組合せ核酸ライブラリから選択した合成核酸（たいて

いＲＮＡであるが、ＤＮＡも含まれる）の短いストランドである。アプタマーは、定義された三次元構造が予測され、構造における微差を有する化合物間を識別することができる。

【００６０】

ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）は、遺伝子サイレンシングを介した遺伝子の不活性化の方法であり、“ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）”と称される。例えば、ＦｉｒｅらのＮａｔｕｒｅ３９１：８０６～８１１（１９９８）及び米国特許６，５０６，５５９参照のこと。ＲＮＡ干渉は、ＲＮＡポリヌクレオチドが、内因性の細胞処理を通して、当該ＲＮＡの配列に対応する配列の遺伝子の発現を特異的に抑制するように作用するとき生じる事象に関する。標的遺伝子のサイレンシングは、宿主動物の二本鎖（ｄｓ）ＲＮＡによるｍＲＮＡの劣化において生じ、ＲＮＡａｓｅＩＩＩエンドヌクレアーゼ消化を介して生じる場合もある。消化の結果、長さ（又はサイズ）が約２１～２３ヌクレオチド（又は塩基）の分子となるが、分子サイズは３０塩基と同様の大きさになってもよい。これらの短いＲＮＡの種類（短い干渉ＲＮＡ又はｓｉＲＮＡ）は、おそらく、ＲＮＡ誘導サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ）と称されるＲＮＡヌクレアーゼ複合体を介して、対応するＲＮＡメッセージ及び転写の低下を媒介する。ＲＩＳＣは、小さいｄｓＲＮＡが、塩基対相互作用を通して、相補的なｍＲＮＡを認識するのに役立つ。ｓｉＲＮＡとその基質との相互作用の後、ｍＲＮＡは、おそらくＲＩＳＣに存在する酵素によって、劣化の対象となる。この型のメカニズムは、ウイルス感染、トランスポゾンのジャンプ、及び同様の現象の抑制において、生体にとって有益であると考えられ、内因性遺伝子の発現を調節すると考えられる。ＲＮＡｉ活性は、他の生体に共通して、植物、昆虫、線虫及び脊椎動物において、これまで立証されている。一般的な背景情報として、例えば、Ｓｃｈｕｔｚら、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ３４４（１）：１５１－７（２００６）；Ｌｅｏｎａｒｄら、Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．１３（６）：５３２－４０（２００６）；Ｃｏｌｂｅｒｅ－Ｇａｒａｐｉｎら、Ｍｉｃｒｏｂｅｓ Ｉｎｆｅｃｔ．７（４）：７６７－７５（２００５）；Ｗａｌｌ，Ｔｈｅｒｉｏｇｅｎｏｌｏｇｙ ５７（１）：１８９－２０１（２００２）；Ｅｌ－Ｂａｓｈｉｒら、Ｎａｔｕｒｅ ４１１：４９４－４９８（２００１）；Ｆｉｒｅ，Ａら、Ｓｃｉｅｎｃｅ３９１：８０６－８１１（１９９８）；Ｇｉｔｌｉｎら、Ｎａｔｕｒｅ ４１８：４３０－４３４（２００２）；Ｇｉｔｌｉｎら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７９：１０２７－１０３５（２００５）；Ｋａｈａｎａら、Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．８５，３２１３－３２１７（２００４）；Ｋｒｏｎｋｅら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７８：３４３６－３４４６（２００４）；Ｌｅｏｎａｒｄら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７９：１６４５－１６５４（２００５）；及びＹｏｋｏｔａら、ＥＭＢＯＲｅｐ．４：６０２－６０８（２００３）を参照のこと。

【００６１】

リボザイムは、生物学的な触媒を行い得る（例えば、共有結合を切断する又は形成することによって）ＲＮＡ断片である。より具体的には、リボザイムは、標的ＲＮＡの一部に結合することによって機能し、特定の切断部位におけるリン酸ジエステル中心を切断することによって標的ＲＮＡを不活性化するアンチセンスＲＮＡ分子である。このような核酸ベースの物質を、宿主細胞又は組織に導入することが可能であり、変異Ｒａｓタンパク質の発現及び／又は機能を抑制するために用いられ得る。

【００６２】

本発明によれば、組み換え核酸分子は、組み換えベクター及び目的とする核酸配列を含んでいる。組み換えベクターは、核酸分子から設計され（例えば、人工的な生成）、選択した核酸配列操作するため及びこのような核酸を宿主細胞に導入するためのツールとして用いられる。組み換えベクターは、それゆえに、クローニング、スクリーニング、及び／又は選択した核酸配列の操作において使用するのにも適しており、選択した核酸配列を宿主細胞中に発現させる及び／又は運搬して、組み換え細胞を形成する。このようなベクターは、典型的には、自然界において、クローニング又は運搬された核酸配列に隣接して発見されない核酸配列のような、異種核酸配列を包含する。ベクターはさらに、自然界において本発明の核酸分子に隣接して発見される、又は本発明の核酸分子の発現に有益である

調節核酸配列（例えば、プロモータ、非翻訳領域）を含むことができる（詳細を以下で議論する）。ベクターは、ＲＮＡ又はＤＮＡのいずれか、原核細胞又は真核細胞のいずれかであることができ、典型的にはプラスミドである。ベクターは、染色体外要素（例えば、プラスミド）として維持される、又は組み換え生物（例えば、微生物又は植物）の染色体として統合されることができる。完全なベクターは、宿主細胞内の位置にとどまることが可能であり、又はある条件下において、プラスミドＤＮＡは、本発明の核酸分子を残して消滅し得る。統合された核酸分子は、染色体プロモータの制御下、生来の若しくはプラスミドプロモータの制御下、又はいくつかのプロモータの組合せの制御下にあることが可能である。核酸分子の単一の又は複数の複製が、染色体に統合され得る。本発明の組み換えベクターは、少なくとも１つの選択可能マーカーを含むことができる。

【００６３】

一実施形態において、本発明の組み換え核酸分子において使用される組み換えベクターは、発現ベクターである。本明細書で使用する場合、用語“発現ベクター”は、コードされた産物（例えば、目的とするタンパク質）の生成に適したベクターに関して用いられる。この実施形態において、生産する産物をコードする核酸配列を、組み換え核酸分子を生成するための組み換えベクターに導入する。組み換え宿主細胞における、核酸配列の転写及び翻訳が可能なように、生産するタンパク質をコードする核酸配列を、ベクター内において調節配列に作動可能に連結するように、ベクター内に導入する。

【００６４】

他の実施形態において、本発明の組み換え核酸配列において用いられる組み換えベクターは、標的ベクターである。本明細書で使用する場合、用語“標的ベクター”は、特定の核酸分子を組み換え宿主細胞に運搬するために用いられるベクターに関して使用され、この核酸分子は、内因性遺伝子又は宿主細胞内の遺伝子の一部を欠失、不活性化又は置換するために用いられ得る（例えば、標的遺伝子の破壊又はノックアウト技術）。このようなベクターは、当該技術分野のある局面において、“ノックアウト”ベクターとしても知られているかもしれない。この実施形態のある局面において、ベクターの一部、より典型的にはベクターに挿入された核酸分子（例えば挿入物）は、宿主細胞における標的遺伝子（例えば、欠失又は不活性化の標的となる遺伝子）の核酸配列の相同物核酸分子を有する。ベクターに挿入する核酸配列は、標的遺伝子と挿入物とがホモログ組み換えを行うことが可能なように、標的遺伝子に結び付けて設計する。これにより、内因性標的遺伝子は、欠失、不活性化、減弱（内因性標的遺伝子の少なくとも一部は、変異又は欠失することによって）、又は置換される。

【００６５】

典型的には、組み換え核酸分子は、１つ以上の発現制御配列に作動可能に連結された本発明の核酸分子を少なくとも１つ含んでいる。本発明によれば、用語“作動可能に連結”は、宿主細胞にトランスフェクト（例えば、形質転換、形質導入、トランスフェクト、接合、又は誘導）したときに分子が発現できるように、核酸分子を発現制御配列（例えば、転写制御配列及び／又は翻訳制御配列）に連結することに関する。転写制御配列は、転写の開始、伸長又は終結を制御する配列である。特に重要な転写制御配列は、プロモータ、エンハンサ、オペレータ、及びリプレッサ配列のような、転写の開始を制御する配列である。適した転写制御配列は、組み換え核酸分子が導入された宿主細胞又は生物において機能し得る、いずれかの転写制御配列を含む。

【００６６】

本発明の組み換え核酸分子は、また、複製の始点である翻訳制御配列のような、さらなる調節配列及び組み換え細胞と相性の良い他の調節配列を含むこともできる。一実施形態において、本発明の組み換え分子は、宿主細胞の染色体に統合された分子を含み、発現したタンパク質を、タンパク質を生成する細胞から分泌させることを可能にする、分泌シグナル（例えば、シグナルセグメント核酸配列）も含んでいてもよい。適したシグナルセグメントは、発現するタンパク質に自然に結びつくシグナルセグメント、又は本発明に係るタンパク質を直接分泌させることが可能な異種シグナルセグメントのいずれかを含む。他

の実施形態において、本発明の組み換え分子は、発現したタンパク質を宿主細胞の膜に運搬し、かつ当該膜に挿入することを可能にする、リーダー配列を含む。適したリーダー配列は、タンパク質に自然に結びつくリーダー配列、又は細胞の膜にタンパク質を直接運搬及び挿入することが可能な異種リーダー配列のいずれか含む。

【００６７】

本発明によれば、用語“トランスフェクション”は、外因性核酸分子（例えば、組み換え核酸分子）を細胞に挿入することが可能な、いずれかの方法に関して用いられる。用語“形質転換”は、この用語を、バクテリア及び酵母のような微生物細胞、又は植物への核酸分子の導入に関して使用する場合、用語“トランスフェクション”と交換可能に使用することができる。微生物及び植物系統において、用語“形質転換”は、微生物又は植物によって外因性核酸が獲得する遺伝的変化を示すために用いられ、基本的に用語“トランスフェクション”と同義である。しかしながら、動物細胞において、形質転換は、例えば、細胞が癌化した後の培地中における細胞の成長特性の変化に関する第２の意味を取得している。それゆえに、混乱をさけるため、用語“トランスフェクション”は、好ましくは動物細胞への外因性核酸の導入、及び微生物細胞又は植物細胞の形質転換に関して使用し、細胞への外因性の核酸の導入に関係する用語の範囲において使用される。それゆえに、トランスフェクション技術には、形質転換、粒子射撃、拡散、能動輸送、槽内音波処理、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、吸着、感染、及び原形質融合が含まれるが、これに限定されない。

【００６８】

本明細書で使用する場合、ハイブリダイゼーション条件は、同様の核酸分子を同定するために核酸分子を用いる場合の、標準的なハイブリダイゼーション条件に関する。このような標準的な条件は、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、ＭｏｌｅｃｕｌａｒＣｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｓ Ｐｒｅｓｓ，１９８９に記載されている。Ｓａｍｂｒｏｏｋらの同書の全てを、ここに参考として組み込む（特に、ページ９．３１－９．６２を参照のこと）。加えて、核酸のミスマッチの変化度を許容するハイブリダイゼーションを達成するための、適切なハイブリダイゼーション及び洗浄条件を算出するための式が、Ｍｅｉｎｋｏｔｈら、１９８４，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１３８，２６７－２８４に記載されている。Ｍｅｉｎｋｏｔｈらの同書の全てを、ここに参考として組み込む。

【００６９】

低ストリンジェントなハイブリダイゼーション及び洗浄条件は、本明細書においては、ハイブリダイゼーション反応において、プローブとして用いる核酸分子と少なくとも約７０％同一の核酸配列を有する核酸分子の単離を可能にする条件に関する（例えば、ヌクレオチドの約３０％以下のミスマッチを許容する条件）。中ストリンジェントなハイブリダイゼーション及び洗浄条件は、本明細書においては、ハイブリダイゼーション反応において、プローブとして用いる核酸分子と少なくとも約８０％同一の核酸配列を有する核酸分子の単離を可能にする条件に関する（例えば、ヌクレオチドの約２０％以下のミスマッチを許容する条件）。高ストリンジェントなハイブリダイゼーション及び洗浄条件は、本明細書においては、ハイブリダイゼーション反応において、プローブとして用いる核酸分子と少なくとも約９０％同一の核酸配列を有する核酸分子の単離を可能にする条件に関する（例えば、ヌクレオチドの約１０％以下のミスマッチを許容する条件）。非常に高いストリンジェントなハイブリダイゼーション及び洗浄条件は、本明細書においては、ハイブリダイゼーション反応において、プローブとして用いる核酸分子と少なくとも約９５％同一の核酸配列を有する核酸分子の単離を可能にする条件に関する（例えば、ヌクレオチドの約５％以下のミスマッチを許容する条件）。当該技術分野における通常の知識を有するものは、これらのヌクレオチドミスマッチの特定のレベルを達成するための、適切なハイブリダイゼーション及び洗浄条件を算出するために、Ｍｅｉｎｋｏｔｈらの同書における式を使用することができる。このような条件は、ＤＮＡ：ＲＮＡ又はＤＮＡ：ＤＮＡハイブリッドが形成されたか否かに、非常に依存する。ＤＮＡ：ＤＮＡハイブリッドのために算

出された融解温度は、ＤＮＡ：ＲＮＡハイブリッドの融解温度よりも１０℃低い。特定の実施形態において、ＤＮＡ：ＤＮＡハイブリッドのためのストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、イオン強度が６ＸＳＳＣ（０．９Ｍ Na^+）におけるハイブリダイゼーションを含み、このハイブリダイゼーション条件は、適切な洗浄条件において、温度は、約２０℃～約３５℃（低ストリンジェント）、より好ましくは、約２８℃～約４０℃（よりストリンジェント）、さらにより好ましくは、約３５℃～約４５℃（さらによりストリンジェント）である。特定の実施形態において、ＤＮＡ：ＲＮＡハイブリッドのためのストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、イオン強度が６ＸＳＳＣ（０．９Ｍ Na^+）におけるハイブリダイゼーションを含み、このハイブリダイゼーション条件は、同様にストリンジェントな洗浄条件において、温度は、約３０℃～約４５℃、より好ましくは、約３８℃～約５０℃、さらに好ましくは、約４５℃～約５５℃である。これらの値は、約１００ヌクレオチドよりも大きい分子であって、０％ホルムアミド及びＧ＋Ｃの含有比率が約４０％である分子の融解温度の計算に基づいている。あるいは、T_mは、上述したＳａｍｂｒｏｏｋらのページ９．３１から９．６２に記載のように、実験に基づいて算出することができる。一般に、洗浄条件は、できるだけストリンジェントにするべきであり、選択したハイブリダイゼーション条件に適した条件にするべきである。例えば、ハイブリダイゼーション条件は、塩条件、及び特定のハイブリッドの算出したT_mよりも約２０℃～２５℃低い温度条件の組合せを含むことが可能であり、洗浄条件は典型的には、塩条件、及び特定のハイブリッドの算出したT_mよりも約１２℃～２０℃低い温度条件の組合せを含んでいる。ＤＮＡ：ＤＮＡハイブリッドに用いるに適したハイブリダイゼーション条件の一例は、約４２℃、６ＸＳＳＣ（５０％ホルムアミド）における２～２４時間のハイブリダイゼーション含み、その後、約２ＸＳＳＣにおいて、室温での１回以上の洗浄を含む洗浄工程を行い、その後、より高い温度で、かつより低いイオン強度でのさらなる洗浄を行う（例えば、約０．１Ｘ～０．５ＸＳＳＣにおいて、約３７℃で少なくとも１回の洗浄の後、約０．１Ｘ～０．５Ｘ ＳＳＣにおいて、約６８℃で少なくとも１回の洗浄を行う）。

【００７０】

本発明における単離されたタンパク質又はペプチドへの言及は、全長タンパク質、融合タンパク質、若しくはいずれかのフラグメント、ドメイン、立体配座エピトープ、又はそのようなタンパク質のホモログを含む。より具体的には、本発明に係る単離されたタンパク質は、その自然環境から取り除かれたタンパク質（ポリペプチド又はペプチドを含む）であり（例えば、ヒトの操作を受けている）、精製タンパク質、部分的精製タンパク質、組み換え的に生成したタンパク質、及び合成的に生成したタンパク質が、例えば含まれる。したがって、“単離された”は、タンパク質が精製された程度を反映していない。

【００７１】

本明細書で使用する場合、用語“ホモログ”は、１以上の、軽微な修飾又はタンパク質若しくはペプチドに自然に生じた変異によって、自然に生じたタンパク質又はペプチド（例えば、“プロトタイプ”又は”野生型”タンパク質）とは異なるタンパク質又はペプチドであるが、全体としては、基本的なタンパク質及び自然に生じる型の側鎖構造を維持しているタンパク質又はペプチドに関して用いられる（例えば、このようなホモログは、野生型タンパク質に関連するものとして識別可能である）。このような変化は、１若しくは数個のアミノ酸側鎖における変化；欠失（例えば、タンパク質又はペプチドの不完全版）、挿入及び／若しくは置換を含む、１若しくは数個のアミノ酸の変化；１若しくは数個の原子の立体化学的な変化；並びに／又はメチル化、ファルネシル化、ゲラニルゲラニル化、グリコシル化、カルボキシメチル化、リン酸化、アセチル化、ミリストイル化、プレニル化、パルミチン酸化、及び／若しくはアミノ化が含まれるがこれに限定されない、より小さい誘導体化であるがこれに限定されない。ホモログは、タンパク質のアゴニスト又はタンパク質のアンタゴニストを含むことができる。ホモログは、自然に生じるタンパク質又はペプチドと比較して、増強された特性、減弱された特性、変化した特性、又は実質的に同様の特性を有することが可能である。ホモログは、合成的に生成したホモログ、与え

られたタンパク質又はドメインの自然に生じた対立変異体、又は参照配列が由来する生物以外の生物からのホモログ配列を含むことができることを言及する。ホモログは、自然に生じる対立変異体又は変異体の結果であることができる。ホモログは、当該技術分野において公知のタンパク質を生成するための技術を用いて生成することができる。この技術には、単離したものへの直接修飾、又は自然に生じたタンパク質の合成、直接タンパク質合成、又は使用するタンパク質をコードする核酸配列の修飾が含まれるが、これに限定されず、例えば、古典的な又は組み換えＤＮＡ技術、ランダム又は標的突然変異生成がある。

【００７２】

与えられたタンパク質のホモログは、参照するタンパク質のアミノ酸配列に対して、少なくとも約４５％同一、少なくとも約５０％同一、少なくとも約５５％同一、少なくとも約６０％同一、少なくとも約６５％同一、少なくとも約７０％同一、少なくとも約７５％同一、少なくとも約８０％同一、少なくとも約８５％同一、少なくとも約９０％同一、少なくとも約９５％同一、少なくとも約９５％同一、少なくとも約９６％同一、少なくとも約９７％同一、少なくとも約９８％同一、少なくとも約９９％同一（又は、整数増分で４５％～９９％の間のいずれかの比率で同一）のアミノ酸配列を含む、当該アミノ酸配列から実質的になる、又は当該アミノ酸配列からなることが好ましい。一実施形態において、ホモログは、参照するタンパク質の自然に生じるアミノ酸配列に対して、１００％未満同一、約９９％未満同一、約９８％未満同一、約９７％未満同一、約９６％未満同一、約９５％未満同一、以下同様に１％増分で約７０％までの比率未満で同一のアミノ酸配列を含む、当該アミノ酸配列から実質的になる、又は当該アミノ酸配列からなる。

【００７３】

本明細書で使用する場合、特定しない限り、同一性比率（％）への言及は、以下の（１）～（３）を用いて行ったホモロジー評価に関する：（１）アミノ酸検索のためのｂｌａｓｔｐ、核酸検索のためのｂｌａｓｔｎを、標準的な初期パラメータと共に使用したＢＬＡＳＴ２．０Ｂａｓｉｃ ＢＬＡＳＴホモロジー検索を用いて、クエリー配列を、デフォルトで低複雑領域としてフィルターする（Ａｌｔｓｃｈｕｌ，Ｓ．Ｆ．，Ｍａｄｄｅｎ，Ｔ．Ｌ．，Ｓｃｈａａｆｆｅｒ，Ａ．Ａ．，Ｚｈａｎｇ，Ｊ．，Ｚｈａｎｇ，Ｚ．，Ｍｉｌｌｅｒ，Ｗ．＆Ｌｉｐｍａｎ，Ｄ．Ｊ．（１９９７）“ＧａｐｐｅｄＢＬＡＳＴ ａｎｄ ＰＳＩ－ＢＬＡＳＴ：ａ ｎｅｗ ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎ ｄａｔａｂａｓｅ ｓｅａｒｃｈ ｐｒｏｇｒａｍｓ．”ＮｕｃｌｅｉｃＡｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２，に記載されており、この文献の全てを参照として本明細書に組み込む）；（２）ＢＬＡＳＴ２アライメント（以下に示すパラメータを用いた）を用いる；及び／又は（３）標準初期パラメーターを用いたＰＳＩ－ＢＬＡＳＴ用いる。ＢＬＡＳＴ２．０Ｂａｓｉｃ ＢＬＡＳＴとＢＬＡＳＴ２との間には、標準パラメータにおいて多少異なっているため、２つの特定の配列が、ＢＬＡＳＴ２プログラムを用いれば、有意なホモロジーを有すると認識されるが、一方の配列をクエリー配列として用いて、ＢＬＡＳＴ２．０Ｂａｓｉｃ ＢＬＡＳＴにおいて行った検索が、トップマッチにおいて他方の配列と同一ではないと判断されるかもしれない。加えて、ＰＳＩ－ＢＬＡＳＴは、“特性”検索の簡単に使用できるバージョンを自動的に提供し、配列のホモログを観察するための感度のよい方法である。このプログラムは、ギャップＢＬＡＳＴデータベース検索を最初に行う。ＰＳＩ－ＢＬＡＳＴプログラムは、位置特異的スコアマトリックスを構築するために戻される、いずれかの有意なアライメントからの情報を用い、次の回のデータベース検索のためのクエリー配列と入れ替える。それゆえに、同一性の比率は、これらのプログラムのいずれか１つを用いて決定できることを理解する。

【００７４】

２つの特定の配列は、ＢＬＡＳＴ２配列を用いて、Ｔａｔｕｓｏｖａ及びＭａｄｄｅｎ，（１９９９），“Ｂｌａｓｔ ２ ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ－ａ ｎｅｗ ｔｏｏｌ ｆｏｒ ｃｏｍｐａｒｉｎｇ ｐｒｏｔｅｉｎ ａｎｄ ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ”，ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｌｅｔｔ．１７４：２４７－２５０に記載されているように、互いに並べることができる。この文献の全てを、参照として本明細書に組み込む。ア

ライメントの結果へのギャップの導入（削除及び挿入）を許容する、２つの配列間におけるギャップＢＬＡＳＴ検索（ＢＬＡＳＴ２．０）を行うために、ＢＬＡＳＴ２．０アルゴリズムを用いてｂｌａｓｔｐ又はｂｌａｓｔｎにおいて、ＢＬＡＳＴ２配列アライメントを行った。ここで、明確化の目的で、ＢＬＡＳＴ２配列アライメントを、以下の標準初期パラメーターを用いて行った。

【００７５】

For blastn, using 0 BLOSUM62 matrix:
Reward for match = 1
Penalty for mismatch = -2
Open gap (5) and extension gap (2) penalties
gap x_dropoff (50) expect (10) word size (11) filter (on)
For blastp, using 0 BLOSUM62 matrix:
Open gap (11) and extension gap (1) penalties
Gap x_dropoff (50) expect (10) word size (3) filter (on).

本発明によれば、用語“修飾”及び“変異”は、交換可能に使用することが可能であり、特に、本明細書に記載のタンパク質又はペプチド（又は核酸配列）の初期アミノ酸配列の修飾／変異に関する。用語“修飾”はまた、タンパク質若しくはペプチドの翻訳後修飾を示すため、又は、例えば、タンパク質若しくはペプチドと他の化合物との複合、若しくは例えばグリセロホスファチジルイノシトール（ＧＰＩ）アンカーを用いたタンパク質の連結にも用いることができる。このような修飾は、例えば修飾が自然に生じる野生型タンパク質又はペプチドの翻訳後修飾とは異なる場合、変異であるとみなすことができる。

【００７６】

同類置換は、典型的には、以下のグループの置換を含む：グリシン及びアラニン；バリン、イソロイシン及びロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン及びグルタミン；セリン及びスレオニン；リシン及びアルギニン；並びにフェニルアラニン及びチロシン。また、保存された疎水性又は親水性に基づいて置換されてもよく（Ｋｙｔｅ及びＤｏｏｌｉｔｔｌｅ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５７：１０５（１９８２））、又は同様のペプチドの、二次構造、若しくは三次構造あるいは四次構造を想定する能力に基づいて置換されてもよい（Ｃｈｏｕ及びＦａｓｍａｎ，Ａｄｖ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．４７：４５（１９７８））。

【００７７】

用語“抗原”の本明細書における一般的な使用は、自然に生じた又は合成により導いたタンパク質のいずれかの部分（ペプチド、部分タンパク質、全長タンパク質）、融合タンパク質若しくはキメラタンパク質、細胞性組成物（全細胞、細胞溶解物若しくは崩壊した細胞）、生物（全生物、溶解物若しくは崩壊した細胞）、炭水化物（癌細胞に発現したもののような）、又は他の分子若しくはそのいずれかの部分に関する。抗原は、抗原が投与された個体の細胞及び組織内において遭遇する、同一又は同様の抗原に対する抗原特異的免疫反応（例えば、体液性及び／又は細胞性免疫反応）を導く。

【００７８】

免疫反応の刺激に関するとき、用語“抗原”は、用語“免疫原”と交換可能に用いることができる。本明細書において用いる場合、免疫原は、体液性及び／又は細胞性免疫反応（例えば抗原性）を導く抗原を示し、免疫原の動物への投与（例えば本発明のワクチンを介した）は、動物の組織内において遭遇する同一又は同様の抗原に対する抗原特異的免疫反応を高める。

【００７９】

“免疫寛容体”は、抗原に対する免疫反応を減少又は変化させ、投与型、投与量又は投与経路において提供される抗原を示すために用いられ、好ましくは、免疫寛容体若しくは細胞に発現若しくは存在する免疫寛容体のようなものとの接触に応答して、実質的に無反応、アネルギー、他の不活性化、又は免疫システム細胞の削除する。

【００８０】

“ワクチン化抗原”は、免疫原又は免疫寛容体であることができるが、生物学的反応が、ワクチン化抗原に対して導出される（免疫反応の導出、耐性）、ワクチン（予防又は治療）として用いる抗原である。与えられた抗原の“免疫原性ドメイン”は、抗原のいずれかの部分、断片又はエピトープ（例えばペプチド断片、サブユニット、抗体エピトープ又は他の立体配座エピトープ）であることができ、動物に投与したときに免疫原として作用する少なくとも１つのエピトープを含む。例えば、単一のタンパク質が複数の異なる免疫原ドメインを含むことができる。免疫原ドメインは、体液性免疫反応の場合のように、タンパク質内において線状の配列である必要はない。

【００８１】

エピトープは、本明細書において、与えられた抗原内の、免疫反応を誘発するのに十分な単一の免疫原性部位として、又は与えられた抗原内の、免疫反応を抑制、欠失、又は不活性化するのに十分な単一の免疫寛容部位として定義される。Ｔ細胞エピトープが、大きさ及び組成においてＢ細胞エピトープとは異なり、ＣｌａｓｓＩＭＨＣ経路を介して存在するエピトープは、ＣｌａｓｓＩＩ ＭＨＣ経路を介して存在するエピトープとは異なっていることを、当業者は理解する。エピトープは、線状配列又は立体配座エピトープ（保存された結合領域）であり得る。抗原は、単一のエピトープと同じほど小さいか、単一のエピトープよりも大きく、複数のエピトープを含み得る。したがって、抗原の大きさは、約５～１２アミノ酸（例えばペプチド）と同じほど小さく、マルチマー及び融合タンパク質、キメラタンパク質、全細胞、全微生物、又はその一部（例えば、全細胞の溶解物又は微生物の抽出物）を含む、全長タンパク質、と同じくらい大きい。

【００８２】

“ワクチン接種”又は“予防接種”は、抗原単独又はアジュバントと共に投与した結果としての、抗原又は免疫原又はその免疫寛容原部分に対する免疫反応の導出（誘導）に関する。ワクチン接種は、好ましくは防御又は治療効果の結果となり、これにより後の抗原（又は抗原の源）への暴露が、抗原（又は源）に対して、動物において病気又は病状を低減又は予防する免疫反応を導出する。ワクチン接種の概念は、当該分野においてよく知られている。本発明の組成物（ワクチン）の投与により導出された免疫反応は、組成物を投与していない場合と比較して、免疫反応（例えば、細胞性免疫反応、体液性免疫、サイトカイン生成）のいずれかの面における検出可能ないずれかの変化を有し得る。

【００８３】

タルモゲン（Ｔａｒｍｏｇｅｎ）（標的分子免疫原）は、一般に、１つ以上の異種抗原を細胞外、細胞内、又は細胞外と細胞内との両方に発現する酵母運搬体に関連する。タルモゲンは、一般的に、技術的に記載されている。例えば、米国特許番号５，８３０，４６３を参照のこと。

【００８４】

本発明によれば、“異種アミノ酸”は、自然界において、定義されたアミノ酸配列に隣接して発見されない（例えば、自然界において、すなわちｉｎｖｉｖｏで発見されない）アミノ酸の配列、又は定義されたアミノ酸配列の機能に関連しないアミノ酸配列であり、又は、与えられたアミノ酸が由来する生物のための標準的なコドンの使用方法を用いて、自然に発生する配列におけるこのようなヌクレオチドを翻訳することができる場合、遺伝子において発生する、定義されたアミノ酸配列をコードする自然に生じる核酸配列に隣接した核酸によってコードされていない、アミノ酸配列である。それゆえに、抗原に対して異種である少なくとも２つのアミノ酸残基が、抗原に隣接して自然に発見されない２つのアミノ酸残基のいずれかである。

【００８５】

本発明によれば、本発明の酵母運搬体に関連した、異種融合タンパク質を含む“異種”タンパク質又は“異種”抗原の言及は、タンパク質又は抗原が、酵母によって自然に発現されるタンパク質又は抗原ではないタンパク質又は抗原を意味するが、融合タンパク質は、酵母配列、又は酵母によって自然に発現されるタンパク質（例えば、本明細書に記載のＡｇａタンパク質）若しくはその一部を含んでいてもよい。例えば、腫瘍細胞Ｒａｓタン

パク質及び酵母Ａｇａタンパク質は、このような融合タンパク質は酵母によって自然に発現されないので、本発明の目的のための酵母媒体に関する異種タンパク質であるとみなされる。

【００８６】

本明細書中に記載のアミノ酸配列のいずれかは、少なくとも１つの、及び最大約２０のさらなる異種アミノ酸であって、特定されたアミノ酸配列のＣ末端及び／又はＮ末端のいずれかに隣接した異種アミノ酸から生成することができる。結果として得られたタンパク質又はペプチドは、特定されたアミノ酸配列から“本質的に成る”として参照され得る。異種アミノ酸配列は、特定のアミノ酸配列に隣接して自然に発見されない（例えば、自然界において、すなわちｉｎｖｉｖｏで発見されない）アミノ酸の配列、又は特定のアミノ酸配列の機能に関連していないアミノ酸の配列、又は、与えられたアミノ酸が由来する生物のための標準的なコドンの使用方法を用いて、自然に発生する配列におけるこのようなヌクレオチドを翻訳することができる場合、遺伝子において発生する、定義されたアミノ酸配列をコードする自然に生じる核酸配列に隣接した核酸によってコードされていない、アミノ酸の配列である。同様に、用語“本質的に成る”は、核酸配列に関して用いられる場合、特定されたアミノ酸配列をコードする核酸配列に関し、当該核酸配列は特定のアミノ酸配列をコードする核酸配列の５’及び／又は３’末端のいずれかにおいて、少なくとも１つの及び最大で約６０と同じくらい多いさらなる異種ヌクレオチドからによって隣接される。異種ヌクレオチドは、自然の遺伝子において発生する特定のアミノ酸配列をコードする核酸配列に隣接して自然に発見されない（例えば、自然界において、すなわちｉｎｖｉｖｏで発見されない）、又はタンパク質にいずれかのさらなる機能を与える、若しくは特定のアミノ酸配列を有するタンパク質の機能を変化させるタンパク質をコードしていない。本発明によれば、用語“選択的に結合する”は、本発明の抗体、抗原結合断片、又は結合パートナーの、特定のタンパク質に対する優先的な結合可能性に関する。より具体的には、用語“選択的に結合する”は、あるタンパク質の他（例えば、抗体、その断片又は抗原に対する結合パートナー）への特異的な結合に関し、標準的な分析方法（免疫測定）により測定したその結合レベルは、統計的には、分析のためのバックグラウンドコントロールよりも非常に高い。例えば、免疫測定を行うとき、コントロールは、典型的には、抗体又は抗原結合断片を単独で含む（例えば、抗原が不在の）反応ウエル／チューブを含み、抗原が不在のときの抗体又はその抗原結合断片による反応量（例えば、ウエルに対する非特異的結合）が、バックグラウンドとみなされる。結合は、酵素免疫測定（例えば、ＥＬＩＳＡ、免疫ブロット測定等）を含む当該技術分野において標準的な様々な方法を用いて測定することができる。用語“病気”は、動物の通常の健康状態からのいずれかの逸脱に関し、逸脱（例えば、感染、遺伝子変異、遺伝的欠陥等）が発生しているが、症状はまだ現れていないときの状態と同様に、病気の症状が存在する状態を含む。

【００８７】

“個体”は、脊椎動物であり、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトである。哺乳動物には、家畜、競技動物、ペット、霊長類、マウス及びラットが含まれるが、これに限定されない。用語“個体”は、用語“動物”、“対象”又は“患者”と交換可能に使用される。

【００８８】

本発明の局面に関する以下の説明は、コドン７６において同定されたＲａｓ変異及び／又はコドン７６における変異を含むＲａｓ変異の組合せに関して、特に記載しているが、以下の本発明の全ての局面は、７３、７４、７５、７７又は７８の位置のいずれか１つ以上における変異を有するＲａｓに対しても適用されることが可能である。このようなＲａｓ変異の組合せは、上述したＲａｓ変異の組合せのいずれかを含み、特に、５９、６１、７３、７４、７５、７６、７７及び／又は７８位置における変異と、１２及び／又は１３の位置の変異との組合せのいずれかを含む。

【００８９】

（本発明の核酸分子及びタンパク質）

本発明によれば、本発明の様々な局面において有用なＲａｓタンパク質、又はＲａｓをコードする核酸分子は、野生型若しくは変異型のＲａｓタンパク質、一つ以上のその部分（例えば、任意の研究、診断、スクリーニング若しくは治療方法において有用なドメイン若しくはその部分）、そのようなタンパク質若しくはその部分（例えば、任意の研究、診断、スクリーニング若しくは治療方法において有用なドメイン若しくはその部分）をコードする核酸（「センス」）分子、又は、上記ドメイン若しくはタンパク質にハイブリダイズする、核酸の（「アンチセンス」）鎖を含み得る。本発明は、特に、変異Ｒａｓタンパク質及びそのようなタンパク質又はそのフラグメントをコードする核酸分子であって、変異Ｒａｓタンパク質又はそのフラグメントのアミノ酸配列が、７６位を含み、７６位において変異が生じており、特に、当該位置において生来存在するグルタミン酸塩が、グルタミン酸塩でないアミノ酸によって置き換えられているものに関する。本発明では、「グルタミン酸塩でない」アミノ酸とは、タンパク質において一般に存在する当業者において周知な他の２０のアミノ酸の何れかによる置換を指す。特に好ましい実施形態において、グルタミン酸塩でないアミノ酸は、グリシン（Ｅ７６Ｇ）、リジン（Ｅ７６Ｋ）、又はグルタミン（Ｅ７６Ｑ）であるが、当該位置における、任意の他のグルタミン酸塩でないアミノ酸による置換も明らかに本発明に包含される。

【００９０】

Ｒａｓをコードする核酸分子は、Ｋ－Ｒａｓ、Ｎ－Ｒａｓ又はＨ－Ｒａｓ遺伝子から選択されるＲａｓ遺伝子の全体又は部分を含むか、そこから派生し得る。一つの局面において、Ｒａｓをコードする核酸分子は、７６位に単一変異を有するＲａｓタンパク質をコードする。他の局面において、Ｒａｓをコードする核酸分子は、７６位における変異に加えて一つ以上の変異（これに限定するものではないが、野生型のＫ－、Ｈ－又はＮ－Ｒａｓタンパク質における１２位、１３位、５９位及び／又は６１位の変異が挙げられる）を有するＲａｓタンパク質をコードする。他の実施形態において、他の様々なＲａｓの変異体及びそのような変異体をコードする核酸分子は、本発明において有用であり（野生型Ｒａｓアミノ酸配列の１２位、１３位、５９位及び／又は６１位の変異を有するＲａｓ変異体を含む）、分離されたＥ７６タンパク質若しくはＲａｓのペプチド変異体、又は、そのような変異体をコードする分離された核酸分子と組合わせることができる。いくつかの実施形態において、Ｒａｓをコードする核酸分子は、７３位、７４位、７５位、７７位又は７８位に単一変異を有するＲａｓタンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、Ｒａｓをコードする核酸分子は、１２位、１３位、５９位、６１位、７３位、７４位、７５位、７６位、７７位又は７８位の変異の二つ以上の任意の組み合わせを有するＲａｓタンパク質をコードし、１２位又は１３位の少なくとも一つの変異と、５９位、６１位、７３位、７４位、７５位、７６位、７７位、又は７８位の少なくとも一つの変異との組み合わせが好ましい。なお、上記位置は全て、野生型のＫ－、Ｈ－又はＮ－Ｒａｓタンパク質の位置に相当するものである。

【００９１】

他の局面において、本発明において有用なＲａｓタンパク質（本発明において有用な、Ｒａｓタンパク質をコードする核酸分子によってコードされ得る）は、Ｒａｓタンパク質の、これに限定するものではないが、少なくとも、５から１７の間、５から５０の間、又はそれ以上（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）の連続したアミノ酸残基であり、野生型のＲａｓアミノ酸配列の１２位、１３位、５９位、６１位、７３位、７４位、７５位、７６位、７７位又は７８位のアミノ酸を含み、野生型のＲａｓ配列に対して、１２位、１３位、５９位、６１位、７３位、７４位、７５位、７６位、７７位又は７８位のアミノ酸が、好ましくは野生型又は非腫瘍型のＲａｓの該当位置に存在するアミノ酸以外のアミノ酸による置換により変異しているフラグメントを含む。典型的には、Ｒａｓタンパク質は、野生型又は変異型のＲａｓタンパク質の全量の最大長を有しており、本明細書における配列

番号２から１３の場合、最大長は１８８から１８９から１９３であるが、Ｒａｓタンパク質の最大長はこれらに限定されない。

【００９２】

一実施形態において、Ｒａｓタンパク質の好ましいフラグメントは、天然のＲａｓアミノ酸配列（野生型配列又は細胞の非腫瘍型のＲａｓに関連する配列）の約５から９の間のアミノ酸であって、１２位、１３位、５９位、６１位、７３位、７４位、７５位、７６位、７７位又は７８位の変異に隣接するもの（例えば、その両側に５アミノ酸がそれぞれ隣接する７６位のアミノ酸を含み、７６位のアミノ酸は、野生型又は非腫瘍型のＲａｓに対して変異している、Ｒａｓの１１アミノ酸のフラグメント；その両側に８アミノ酸がそれぞれ隣接する７６位のアミノ酸を含み、７６位のアミノ酸は、野生型のＲａｓに対して変異している、Ｒａｓの１７アミノ酸のフラグメント）が挙げられる。一実施形態において、本発明において有用なＲａｓタンパク質は、少なくとも５個連続したアミノ酸、少なくとも１０個連続したアミノ酸、少なくとも１５個連続したアミノ酸、少なくとも２０個連続したアミノ酸、少なくとも２５個連続したアミノ酸、少なくとも３０個連続したアミノ酸、少なくとも３５個連続したアミノ酸、少なくとも４０個連続したアミノ酸、少なくとも５０個連続したアミノ酸、少なくとも６０個連続したアミノ酸、少なくとも７５個連続したアミノ酸、少なくとも１００個連続したアミノ酸、少なくとも１２５個連続したアミノ酸、少なくとも１５０個連続したアミノ酸、又は、少なくとも１７５個連続したアミノ酸であって、Ｒａｓタンパク質の全長までの、任意の中間サイズの少なくとも５アミノ酸以上のすべての長さ（５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、…３９、４０、４１、…４６、４７、４８…等）のＲａｓのフラグメントを含むフラグメントである。同一又は異なる長さと、同一又は異なる変異とを有するそのようなフラグメントのいくつかは、一実施形態において、単一のキメラタンパク質へと組合わせることができる。そのようなタンパク質の例は、実施例に記載されている。

【００９３】

好ましくは、変異Ｒａｓタンパク質又はペプチドをコードする、核酸分子のフラグメントは、同一の変異を有するＲａｓ核酸分子（例えば、Ｒａｓ遺伝子又はＲａｓＲＮＡ分子）の同定又は増幅に用いるプライマー又はプローブとして働くために十分な長さである。Ｒａｓタンパク質又はペプチドのフラグメントは、少なくともＴ細胞エピトープ（クラスＩ又はクラスＩＩＭＨＣの存在下で）又は抗体のエピトープとして働くために十分な長さを有していることが好ましいが、いくつかの実施形態では、他の機能的価値を有するＲａｓタンパク質、例えば、ＧＴＰに関連するＲａｓタンパク質、遺伝子発現、細胞増殖及び／又は運動に関連する細胞シグナルを誘導するＲａｓタンパク質、試験における標的として働くＲａｓタンパク質、が有用である。以上のように、フラグメント（核酸又はタンパク質）は、特定の変異に隣接する十分な大きさの自然に存在するＲａｓヌクレオチド又はアミノ酸配列をそれぞれ含んでおり、任意の研究、診断、スクリーニング又は本明細書に記載の治療用組成、方法若しくは使用において、又はこれらを目的として有用である。

【００９４】

本明細書において、野生型Ｒａｓタンパク質についての位置への言及は、哺乳類の野生型Ｒａｓタンパク質、又は、少なくとも、ヒト若しくはマウスにおけるＫ－Ｒａｓ、Ｈ－Ｒａｓ若しくはＮ－Ｒａｓについて言及するものである。上記で言及した位置は、また、任意のヒト又はマウスのＫ－Ｒａｓ、Ｈ－Ｒａｓ又はＮ－Ｒａｓの配列に対応するものである。なぜなら、タンパク質の当該領域におけるヒト及びマウスのアミノ酸配列は同一であり、当該領域においてＫ－Ｒａｓ、Ｈ－Ｒａｓ及びＮ－Ｒａｓは同一であるからである。他の動物種において異なるであろうアミノ酸配列について、当業者は、例えば、ヒト又はマウスの配列との単純なアラインメントによって、対応する配列上の位置を容易に決定することができるであろう。そのようなフラグメントは、少なくとも約５個のＲａｓタンパク質の連続したアミノ酸残基からＲａｓタンパク質の全長まで、全ての数字の上昇幅での（例えば、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６,１７、

１８、１９、２０…４５、４６、４７等）任意の長さであり得る。

【００９５】

Ｒａｓファミリーの様々なメンバーのヌクレオチド及びアミノ酸配列は、周知である。配列番号２は、ヒトＫ－Ｒａｓをコードする核酸配列である（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＮＭ_０３３３６０としても知られている）。配列番号２は、本明細書において配列番号３に示されるヒトＫ－Ｒａｓをコードする。配列番号４は、マウスＫ－Ｒａｓをコードする核酸配列である（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＮＭ_０２１２８４としても知られている）。配列番号４は、本明細書において配列番号５に示されるマウスＫ－Ｒａｓをコードする。配列番号６は、ヒトＨ－Ｒａｓをコードする核酸配列である（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＮＭ_００５３４３としても知られている）。配列番号６は、本明細書において配列番号７に示されるヒトＨ－Ｒａｓをコードする。配列番号８は、マウスＨ－Ｒａｓをコードする核酸配列である（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＮＭ_００８２８４としても知られている）。配列番号８は、本明細書において配列番号９に示されるマウスＨ－Ｒａｓをコードする。配列番号１０は、ヒトＮ－Ｒａｓをコードする核酸配列である（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＮＭ_００２５２４としても知られている）。配列番号１０は、本明細書において配列番号１１に示されるヒトＮ－Ｒａｓをコードする。配列番号１２は、マウスＮ－Ｒａｓをコードする核酸配列である（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＮＭ_０１０９３７としても知られている）。配列番号１２は、本明細書において配列番号１３に示されるマウスＮ－Ｒａｓをコードする。配列番号２から１３は、「野生型」のＲａｓ配列を表す。

【００９６】

上述したように、Ｒａｓは、いくつかの変異が特定の位置に生じ、一以上の癌のタイプの伸展に関連していることが知られている腫瘍遺伝子の例である。本発明は、これまで知られておらず、記述されていなかったＲａｓの新規な変異とともに、当該変異を、既に知られている変異との組み合わせが協働して、そのような組み合わせの変異を有する腫瘍の発癌性を顕著に増加させることを見出したことを報告する。従って、本発明に有用な、この変異が生じた残基及び他の、ある種の癌において変異することが知られている特定の残基を含む、又は、主にそれらからなる、又は、それらからなる融合タンパク質（詳細は後述する）を構築することができる。上記融合タンパク質では、その部位又はタンパク質におけるいくつか又は全ての公知の変異をカバーするために、各ドメインが、その部位において異なる変異を有し、及び／又は異なる部位において変異を有し得る。例えば、Ｒａｓについて、少なくとも４アミノ酸が７６位のいずれかの側にあり（ただし、４アミノ酸に限定されるものではなく、より短い又は長い隣接するアミノ酸も含まれる）、７６位を含む、二つ以上の免疫原性のドメインを提供することができる。上記各ドメインは、変異していないＲａｓタンパク質の７６位において自然に存在するグルタミン酸塩において異なる置換が行われている。上記位置における置換の一つは、好ましくは、グリシンによる置換、リジンによる置換、又はグルタミンによる置換である。一例において、タンパク質又はペプチドは、野生型のＲａｓアミノ酸配列の少なくとも５から９個連続したアミノ酸残基であり、Ｒａｓタンパク質の全長までの全ての数字の上昇幅での任意の長さの、野生型のＲａｓアミノ酸配列の１２位、１３位、５９位、６１位、７３位、７４位、７５位、７６位、７７位又は７８位のアミノ酸を含み、野生型のＲａｓ配列に対して、１２位、１３位、５９位、６１位、７３位、７４位、７５位、７６位、７７位又は７８位のアミノ酸が変異しているフラグメントを含む。好ましくは、タンパク質又はペプチドは、少なくとも７６位の変異を含み、より好ましくは、変異は、自然にその位置に存在するグルタミン酸塩のグリシン、リジン又はグルタミンへの置換である。

【００９７】

一つの局面において、本発明において有用な融合タンパク質構築物は、少なくとも一つの、フレーム内において他の変異した腫瘍抗原と融合したペプチドからなり、当該ペプチドは、（ａ）配列番号３の少なくとも４位から２０位又は少なくとも８位から１６位を含むペプチド（又は、間にあるもしくはより大きい任意のサイズのペプチド）であって、配

列番号３における１２位のアミノ酸残基が、配列番号３に対して変異しているペプチド；（ｂ）配列番号３の少なくとも５位から２１位又は少なくとも９位から１７位を含むペプチド（又は、間にあるもしくはより大きい任意のサイズのペプチド）であって、配列番号３における１３位のアミノ酸残基が、配列番号３に対して変異しているペプチド；（ｃ）配列番号３の少なくとも５１位から６７位又は少なくとも５５位から６３位を含むペプチド（又は、間にあるもしくはより大きい任意のサイズのペプチド）であって、配列番号３における５９位のアミノ酸残基が、配列番号３に対して変異しているペプチド；（ｄ）配列番号３の少なくとも５３位から６９位又は少なくとも５７位から６５位を含むペプチド（又は、間にあるもしくはより大きい任意のサイズのペプチド）であって、配列番号３における６１位のアミノ酸残基が、配列番号３に対して変異しているペプチド；（ｅ）配列番号３の少なくとも６５位から８１位又は少なくとも６９位から７７位を含むペプチド（又は、間にあるもしくはより大きい任意のサイズのペプチド）であって、配列番号３における７３位のアミノ酸残基が、配列番号３に対して変異しているペプチド；（ｆ）配列番号３の少なくとも６６位から８２位又は少なくとも７０位から７８位を含むペプチド（又は、間にあるもしくはより大きい任意のサイズのペプチド）であって、配列番号３における７４位のアミノ酸残基が、配列番号３に対して変異しているペプチド；（ｇ）配列番号３の少なくとも６７位から８３位又は少なくとも７１位から７９位を含むペプチド（又は、間にあるもしくはより大きい任意のサイズのペプチド）であって、配列番号３における７５位のアミノ酸残基が、配列番号３に対して変異しているペプチド；（ｈ）配列番号３の少なくとも６９位から８４位又は少なくとも７３位から８１位を含むペプチド（又は、間にあるもしくはより大きい任意のサイズのペプチド）であって、配列番号３における７７位のアミノ酸残基が、配列番号３に対して変異しているペプチド；（ｉ）配列番号３の少なくとも７０位から８５位又は少なくとも７４位から８２位を含むペプチド（又は、間にあるもしくはより大きい任意のサイズのペプチド）であって、配列番号３における７８位のアミノ酸残基が、配列番号３に対して変異しているペプチド；及び／又は、最も好ましい実施形態の（ｊ）配列番号３の少なくとも６８位から８４位又は少なくとも７２位から８０位を含むペプチド（又は、間にあるもしくはより大きい任意のサイズのペプチド）であって、配列番号３における７６位のアミノ酸残基が、配列番号３に対して変異しているペプチド、からなる群より選択される。なお、これらの位置はまた、配列番号５、７、９、１１又は１３にも対応する。なぜなら、タンパク質の当該領域におけるヒト及びマウスのアミノ酸配列は同一であり、当該領域においてＫ－Ｒａｓ、Ｈ－Ｒａｓ及びＮ－Ｒａｓは同一であるからである。上述したフラグメントは例示であり、フラグメントはこれに限定されず、少なくとも約５アミノ酸の長さを有し、所望の変異を有し、有用であるか、又は、本明細書に記載のように、研究、診断、スクリーニング若しくは治療方法において有用な核酸分子によってコードされているものであればよい。

【００９８】

一実施形態において、本発明において有用な融合タンパク質構築物は、本明細書において配列番号１４に示される融合タンパク質を含んでいる。他の実施形態において、本発明において有用な融合タンパク質構築物は、本明細書において配列番号１５に示される融合タンパク質を含んでいる。

【００９９】

以上のように、本発明は、本明細書に記載の、任意のＲａｓタンパク質又はそのフラグメントをコードするか、それにハイブリダイズするか、それをコードする核酸分子の相補体である任意の核酸分子を含み、本明細書に記載の、任意の融合タンパク質をコードする核酸分子を含む。本発明は又、公知の方法を用いて調製し得る、発明の核酸配列に基づいたアンチセンスＲＮＡ及びＤＮＡ分子、発明の核酸配列に基づいたリボザイム、発明の核酸配列に基づいたＲＮＡｉ、及び／又は本発明のＲａｓタンパク質の立体構造に基づいたアプタマーを含む。これらは、固相ホスホラミダイド化学合成のような、公知の、ポリヌクレオチドの化学合成技術を含む。代替可能に、ＲＮＡ分子は、アンチセンスＲＮＡ分子をコードするＤＮＡ配列のインビトロ又はインビボでの転写により生成され得る。そのよ

うなＤＮＡ配列は、Ｔ７又はＳＰ６ポリメラーゼプロモーターのような好適なＲＮＡポリメラーゼプロモーターが組み込まれた様々な種類のベクターに組み込まれ得る。用いられたプロモーターに応じて、恒常的に又は誘導されてアンチセンスＲＮＡを合成するアンチセンスｃＤＮＡ構築物は、安定的に宿主細胞に導入することができる。そのような核酸ベースの因子は、宿主細胞又は組織に導入され得、変異Ｒａｓタンパク質の発現及び／又は機能を抑制するために用いられ得る。

【０１００】

本発明の他の実施形態は、組換えベクター及びｒａｓ遺伝子由来の、及び／又は、本明細書に記載のＲａｓタンパク質若しくはペプチド若しくはそのフラグメントをコードする核酸配列を含む、組換え核酸分子を含む。典型的には、組換え核酸分子は、一つ以上の発現調節配列に機能し得るように結合された少なくとも一つの本発明の核酸分子を含んでいる。本発明において用いられ得る様々なタイプの組換えベクターは上述されている。

【０１０１】

本発明の一つ以上の組換え分子は、コードする産物（例えば、変異Ｒａｓタンパク質又はその部分）を製造するために用いられ得る。一実施形態において、コードされた産物は、本明細書に記載の核酸分子をタンパク質の製造に効果的な条件下にて発現させることにより製造される。コードされたタンパク質を製造する好ましい方法は、宿主細胞を一つ以上の組換え分子によって感染させ、組換え細胞を作ることによる。感染のために好適な宿主細胞は、これに限定されないが、任意の、感染可能な、細菌、真菌（例えば、酵母）、昆虫、植物又は動物細胞であり得る。宿主細胞は、未感染の細胞であってもよいし、既に少なくとも一つの他の組換え核酸分子によって感染されていてもよい。

【０１０２】

本発明の一実施形態において、好ましい宿主細胞は酵母細胞である。本発明の酵母運搬体に変形された核酸分子は、一つ以上のタンパク質、及び／又は一つ以上のその部分をコードする核酸分子を含み得る。そのような核酸分子は、部分的又は全体的なコード領域、調節領域、又はそれらの組み合わせを含み得る。酵母株の一つの優位性は、その多数の核酸分子を保持し、多数の異種タンパク質を製造することができる能力である。本発明の酵母運搬体によって製造される好ましい数の抗原は、酵母運搬体によって合理的に製造され得る任意の数の抗原の数であり、典型的には、少なくとも約１から少なくとも５かそれ以上の範囲であり、約２から約５化合物がより好ましい。好ましい酵母宿主は、後述する。

【０１０３】

組換えＤＮＡ技術を用いることにより、例えば、宿主内の核酸分子のコピー数、それら核酸分子の転写効率、得られる転写産物の翻訳効率、及び翻訳後修飾の効率を操作することで、感染された核酸分子の発現の調節を改善し得ることは、当業者にとって明白だろう。加えて、プロモーター配列が、生来のプロモーターに比べて発現のレベルを向上させるために遺伝的に改変され得る。核酸分子の発現を調節するために有用な組換え技術は、これに限定されないが、一つ以上の宿主細胞の染色体への核酸分子の組み込み、プラスミドへのベクター安定化配列の付加、転写調節シグナル（例えば、プロモーター、オペレーター、エンハンサー）の置換又は改変、翻訳調節シグナル（例えば、リボソーム結合部位、コザック配列、シャイン－ダルガノ配列）の置換又は改変、宿主細胞のコドン用法に沿った核酸分子の改変、及び転写産物を不安定化させる配列の削除が挙げられる。

【０１０４】

（融合タンパク質）

上述したように、本発明の様々な実施形態において使用するための、少なくとも一つの７６位（又は、７３位、７４位、７５位、７７位、７８位若しくはこれらの任意の組み合わせにおける変異した残基）（上述したように、７６位は、野生型の哺乳類、特にヒト又はマウスのＲａｓアミノ酸配列に対応する言及である）の変異された残基を含むＲａｓペプチド又はタンパク質を含み、且つ、他のある種の癌において変異していることが知られている残基の変異を有するＲａｓペプチド又はタンパク質を含んでいる融合タンパク質のような融合タンパク質を構築することができる。他の癌抗原及び癌に関連する他のタンパ

ク質の様々な変異体を含むＲａｓ以外の抗原又はその部分は、上記のような融合タンパク質に含まれ得る。また、上記のような融合タンパク質をコードする核酸分子もまた本発明に包含される。

【０１０５】

一つの局面において、異なるＲａｓタンパク質及びペプチド並びに／又は上述した他のタンパク質及びペプチドの組み合わせを含む、本発明のＲａｓベースのタンパク質及びペプチドは、酵母運搬体内における異種タンパク質の発現を安定化し、且つ／又は、発現された異種タンパク質の翻訳後修飾を阻止するために設計された融合タンパク質に含まれ得る。そのような融合タンパク質は、概ね、本明細書にそのまま参考として援用されるＰＣＴ公開公報ＷＯ２００４／０５８１５７Ａ２に記載されている。これらの融合タンパク質は、最も典型的には、酵母運搬体（例えば、生きた原型を保った酵母、酵母のスフェロプラストであり、任意に、酵母の細胞質体、酵母のゴースト、酵母膜抽出物若しくはそれらの画分に加工され得る）により組換えタンパク質として発現されるが、本発明の一実施形態では、一つ以上の融合タンパク質が、酵母運搬体に取り込まれるか、又は後述するように、本発明において有用なワクチン又は組成物を形成するために酵母運搬体と複合体化若しくは混合され得る。

【０１０６】

本発明に有用な融合タンパク質の１つは、（ａ）少なくとも１つの、本明細書に記載のような７６位の変異を含む、Ｒａｓ抗原（ペプチド又はタンパク質であり得る）；及び（ｂ）合成ペプチドを含む融合タンパク質である。一実施形態において、本発明において有用な融合タンパク質は、本明細書において配列番号１４に示される融合タンパク質を含む。他の実施形態において、本発明において有用な融合タンパク質は、本明細書において配列番号１５に示される融合タンパク質を含む。

【０１０７】

１つの実施形態において、合成ペプチドは、抗原のＮ末端と連結され、当該ペプチドは、当該抗原とは異種の少なくとも２つのアミノ酸残基から構成される（ここで、当該ペプチドは、酵母運搬体における融合タンパク質の発現を安定化するか、又は発現された融合タンパク質の翻訳後修飾を妨げる）。合成ペプチド及び抗原のＮ末端部分はともに、以下の条件：（１）融合タンパク質の１位における残基がメチオニンである（すなわち、合成ペプチドにおける最初のアミノ酸がメチオニンである）；（２）融合ペプチドの２位におけるアミノ酸残基がグリシン又はプロリンではない（すなわち、合成ペプチドにおける２番目のアミノ酸が、グリシン又はプロリンではない）；（３）融合タンパク質の２から６位におけるアミノ酸残基が１つとしてメチオニンではない（すなわち、合成ペプチドか又はタンパク質の一部である２から６位のアミノ酸は、合成ペプチドが６アミノ酸よりも短い場合に、メチオニンを含まない）；及び（４）融合タンパク質の２から６位におけるアミノ酸が、１つとしてリジン又はアルギニンではない（すなわち、合成ペプチドか又はタンパク質の一部である２から６位のアミノ酸は、合成ペプチドが５アミノ酸よりも短い場合に、リジン又はアルギニンを含まない）を有する融合タンパク質を形成する。合成ペプチドが２アミノ酸ほどの長さであり得るが、より好ましくは２から６アミノ酸（３、４、５アミノ酸が挙げられる）であり得、６アミノ酸よりも長くて、すべての整数において約２００アミノ酸、３００アミノ酸、４００アミノ酸、５００アミノ酸又はそれ以上までであり得る。

【０１０８】

１つの実施形態において、融合タンパク質は、$M-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6$というアミノ酸配列を備える（ここで、Ｍはメチオニンであり；ここで、X_2は、グリシン、プロリン、リジン又はアルギニンを除くあらゆるアミノ酸であり；ここで、X_3は、メチオニン、リジン又はアルギニンを除くあらゆるアミノ酸であり；ここで、X_4は、メチオニン、リジン又はアルギニンを除くあらゆるアミノ酸であり；ここで、X_5は、メチオニン、リジン又はアルギニンを除くあらゆるアミノ酸であり；かつここで、X_6は、メチオニン、リジン又はアルギニンを除くあらゆるアミノ酸である）。１つの実施形態において

、X_6残基はプロリンである。酵母細胞における抗原の発現の安定性を向上、及び／又は酵母におけるタンパク質の翻訳後修飾を妨げる例示的な合成配列としては、配列Ｍ－Ａ－Ｄ－Ｅ－Ａ－Ｐ（配列番号１）が挙げられる。ＭＡＤＥＡＰ配列は、抗原の他に、他の抗原とともに使用され得る。発現産物の増強された安定性に加えて、この融合相手は、構築物におけるワクチン接種抗原に対する免疫反応に対して負の影響を与えないと思われる。その他に、合成融合ペプチドは、選択因子（例えば、抗原）によって認識され得るエピトープを提供するために設計され得る。

【０１０９】

本発明の他の実施形態において、本発明に使用される合成ペプチドの翻訳開始部位をコードする核酸は、コザックの翻訳配列の法則に従って、Ａ－Ｃ－Ｃ－Ａ－Ｔ－Ｇ－Ｇである（ここで、この配列におけるＡＴＧは、転写開始部位であり、かつＭ－Ａ－Ｄ－Ｅ－Ａ－Ｐ（配列番号１）のメチオニンをコードする）。本明細書に記載されるような本発明の種々の実施形態がまた、組み合わせられ得ることは、理解されるべきである。例えば、本発明の１つの局面において、合成ペプチドがＭ－Ａ－Ｄ－Ｅ－Ａ－Ｐ（配列番号１）である場合に、このペプチドに関する開始部位をコードする核酸は、Ａ－Ｃ－Ｃ－Ａ－Ｔ－Ｇ－Ｇであり得る。本発明の実施形態の様々な他の組み合わせは、当業者にとって明らかであろう。

【０１１０】

本発明の１つの局面において、酵母運搬体は、抗原が、部分的に又は全体的に、酵母運搬体の表面上に、発現されるか又は発現された抗原産物の送達若しくは移動によって提供されるかする（細胞外に発現する）ように操作される。本発明のこの局面を達成する方法の１つは、酵母運搬体の表面上に１つ以上の抗原を位置させるためのスペーサアーム（ｓｐａｃｅｒａｒｍ）を用いることである。スペーサアームを用いる方法の１つは、酵母細胞壁の抗原を標的化するタンパク質との、関心のある抗原の融合タンパク質を作り出すことである。例えば、使用され得るタンパク質の１つは、抗原が酵母の表面上に位置されるように、抗原の酵母細胞壁に対する標的化を可能にする酵母タンパク質（例えば、細胞壁タンパク質２（ｃｗｐ２）、Ａｇａ２、Ｐｉｒ４又はＦｌｏ１タンパク質）である。酵母タンパク質以外のタンパク質がスペーサアーム（しかし、あらゆるスペーサアームタンパク質に関して、スペーサアームタンパク質よりむしろ、標的抗原に対して導かれる免疫原性反応を有することが最も所望される）用に使用され得る。従って、他のタンパク質がスペーサアーム用に使用される場合に、使用されるスペーサアームタンパク質は、その結果、標的抗原に対する免疫反応が圧倒されるほどに、スペーサアームタンパク質そのものに対して大きな免疫反応を生成すべきではない。当業者は、標的抗原に対する免疫反応と比べて、スペーサアームに対する免疫反応を小さくすることを目指すべきである。

【０１１１】

標的抗原を配置して酵母表面にさらさせる他の方法は、シグナル配列（例えば、グリコシルホスファチジルイノシトール（ＧＰＩ））を用いて、酵母細胞壁に対して固着させることである。代替可能に、配置は、抗原が、細胞壁に対して結合されるタンパク質（例えば、ｃｗｐ）と結合するように、関心のある抗原を小胞体（ＥＲ）への移動を介して、分泌経路に標的化するシグナル配列を付けることによって達成され得る。

【０１１２】

１つの局面において、スペーサアームタンパク質は、酵母タンパク質である。酵母タンパク質は、酵母タンパク質の約２から約８００のアミノ酸から構成され得る。１つの実施形態において、酵母タンパク質は、約１０から７００のアミノ酸である。本発明の他の実施形態において、酵母タンパク質は、約４０から６００アミノ酸である。本発明の他の実施形態は、少なくとも２５０アミノ酸、少なくとも３００アミノ酸、少なくとも３５０アミノ酸、少なくとも４００アミノ酸、少なくとも４５０アミノ酸、少なくとも５００アミノ酸、少なくとも５５０アミノ酸、少なくとも６００アミノ酸、少なくとも６５０アミノ酸である酵母タンパク質を包含する。１つの実施形態において、酵母タンパク質は、少なくとも４５０アミノ酸の長さである。

【０１１３】
他の実施形態において、酵母タンパク質は、酵母運搬体における融合タンパク質の発現を安定化する、発現された融合タンパク質の翻訳後修飾を妨げ、及び／又は酵母における特定の区画に対して融合タンパク質を標的化する（例えば、酵母細胞表面に発現されること）。酵母分泌経路への送達に関して、使用するための酵母タンパク質としては、Ａｇａ（Ａｇａ１及び／又はＡｇａ２が挙げられるが、これらに限定されない）；ＳＵＣ２（酵母転化酵素）；アルファ因子シグナルリーダー配列；ＣＰＹ；細胞壁における局在及び保持に関するＣｗｐ２ｐ；娘細胞形成の初期において母細胞芽における局在に関するＢＵＤ遺伝子；Ｆｌｏ１ｐ；Ｐｉｒ２ｐ；及びＰｉｒ４ｐが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１１４】
本発明の他の局面において、他の配列が使用されて、酵母運搬体の他の部分に（例えば、細胞基質又はミトコンドリアに）標的化され得、保持され得、及び／又は安定化され得る。以上のあらゆる実施形態に対して使用され得る好適な酵母タンパク質の例としては、ＳＥＣ７；グルコース及び細胞基質局在における抑制性の発現に関するホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼＰＣＫ１、ホスホグリセロキナーゼ ＰＧＫ及びトリオースリン酸イソメラーゼＴＰＩ遺伝子産物；熱処理に対する細胞の曝露によって発現が誘導され、かつタンパク質がより熱安定になる、熱ショックタンパク質ＳＳＡ１、ＳＳＡ３、ＳＳＡ４、ＳＳＣ１；ミトコンドリアへの取り込みに関する、ミトコンドリアタンパク質ＣＹＣ１；ＡＣＴ１が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１１５】
（抗体及び抗原結合ペプチド）
本発明の一実施形態は、本明細書に記載のＥ７６変異（これに限定するものではないが、Ｅ７６Ｇ変異、Ｅ７６Ｋ変異、及び／又はＥ７６Ｑ変異が挙げられる。）を有するＲａｓタンパク質又はペプチドに選択的に結合する抗体又は抗原結合ペプチドに関する。本発明の他の実施形態は、７３位、７４位、７５位、７７位、若しくは７８位の任意の一つ以上の位置において変異を有するＲａｓタンパク質、又は、上述したＲａｓの変異の任意の組み合わせ、特に、１２位及び／若しくは１３位の変異と、５９位、６１位、７３位、７４位、７５位、７６位、７７位及び／もしくは７８位の変異との任意の組み合わせを有するＲａｓに選択的に結合する抗体又は抗原結合ペプチドに関する。抗体は、イムノグロブリンドメインを含むものとして特徴づけされ、このように、抗体は、タンパク質のイムノグロブリンスーパーファミリーのメンバーである。本発明の抗体は、ポリクローナル及びモノクローナル抗体、二価及び一価の抗体、二重特異的又は多重特異的抗体、そのような抗体を含む血清、様々な程度に精製された抗体、抗体全体の任意の機能的な等価物を含む。本発明の単離された抗体は、抗体を含有する血清、又は様々な程度に精製された抗体を含む。本発明の抗体全体は、ポリクローナル又はモノクローナルであり得る。代替可能に、抗体全体の機能的な等価物、例えば、一つ以上の抗体ドメインが切り詰められているか欠損した抗原結合性フラグメント（例えば、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’又はＦ（ａｂ）$_2$フラグメント）、単鎖抗体又は一以上のエピトープに結合し得る抗体（例えば、二受特異的抗体）又は一以上の異なる抗原に結合し得る抗体（例えば、二重特異的又は多重特異的抗体）を含む、遺伝学的に改変された抗体又はその抗原結合性フラグメントも又、本発明において用いられ得る。

【０１１６】
本発明の遺伝学的に改変された抗体は、抗体の可変及び／又は定常領域をコードするＤＮＡの操作及び再発現を含む標準的な組換えＤＮＡ技術によって製造されたものを含む。具体的な例としては、抗体のＶＨ及び／又はＶＬドメインが抗体の残部とは異なる由来であるキメラ抗体、少なくとも一つのＣＤＲ配列及び任意に少なくとも一つの可変領域フレームワークアミノ酸が一つの源に由来し、可変領域の残部及び定常領域（必要に応じて）が異なる源に由来する、ＣＤＲグラフト（ＣＤＲｇｒａｆｔｅｄ）抗体が挙げられる。キメラ抗体及びＣＤＲグラフト抗体の構築は、例えば、欧州特許出願ＥＰ－Ａ０１９４２７

６、ＥＰ－Ａ０２３９４００、ＥＰ－Ａ０４５１２１６及びＥＰ－Ａ０４６０６１７に記載されている。

【０１１７】

一般に、抗体の製造において、好適な実験動物、例えば、これに限定されるものではないが、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、ギアナピッグ、マウス、ラット又はニワトリが、所望の抗体に対応する抗原に曝露される。典型的には、動物は、動物に注入される有効量の抗原によって免疫される。有効量の抗原とは、動物による抗体の生産を誘導するために必要な量を指す。動物の免疫系は、所定の時間後に反応可能となる。免疫過程は、免疫系が抗原に対する抗体を生産するのが認められるまで繰り返され得る。抗原に特異的なポリクローナル抗体を取得するために、所望の抗体を含んでいる血清が動物から採集される（又は、ニワトリの場合、抗体は、卵から採集され得る）。このような血清は、試薬として有用である。ポリクローナル抗体は、例えば、血清を硫安により処理することにより、血清（又は卵）からさらに精製され得る。

【０１１８】

モノクローナル抗体は、Ｋｏｈｌｅｒ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ（Ｎａｔｕｒｅ２５６:４９５－４９７，１９７５）の方法論により製造され得る。例えば、Ｂリンパ球は、免疫された動物の脾臓（又は任意の適切な組織）から回収され、続いて、適切な培養液下で持続的に成長するハイブリドーマ細胞の集団を得るためにミエローマ細胞と融合される。ハイブリドーマによって生産される抗体が所望の抗原に結合する能力を試験することにより、所望の抗体を生産するハイブリドーマが選択される。

【０１１９】

本発明はまた、いくつかの場合において結合パートナー（ｂｉｎｄｉｎｇｐａｒｔｎｅｒ）と呼ばれる、本発明の変異Ｒａｓタンパク質に特異的に結合し、必要に応じて活性化又は抑制するように設計された、抗体でないポリペプチドも範囲内である。上述したようなリガンド特異性を有する当該ポリペプチドの設計例は、本明細書にそのまま参考として援用されるＢｅｓｔｅｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９６:１８９８－１９０３，１９９９において与えられる。

【０１２０】

（小分子、立体構造的拮抗剤及びその他の化合物）

本発明は、小分子化合物（例えば、本発明者らによって見出された変異Ｒａｓを用いた創薬の産物）、例えば、立体構造的拮抗剤又はＧＴＰ加水分解の活性化剤も又含む。一実施形態において、そのような化合物は、変異Ｒａｓタンパク質と相互作用し、ＧＴＰ加水分解を引き起こし得るＲａｓ－ＧＡＰを模倣した、又は改変された形態であり得る。他の実施形態において、そのような化合物は、直接Ｒａｓ－ＧＡＰと相互作用して、内在性のＲａｓ－ＧＡＰタンパク質を、本明細書において記載したようなＲａｓ変異体についてＧＴＰ加水分解を引き起こさせるように適合させ得る。好ましくは、そのような化合物は、野生型（変異していない、又は発癌性でない）ＲａｓのＧＴＰ加水分解を引き起こさず、それゆえ、当該化合物は、腫瘍特異的化合物として有用である。

【０１２１】

そのような薬剤は、例えば、分子多様性（ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｄｉｖｅｒｓｉｔｙ）戦略（大規模な化学的に多様な分子ライブラリーの迅速な構築を可能とする関連する戦略との組み合わせ）、天然若しくは合成の化合物のライブラリー、特に、化学的若しくは組み合わせの（ｃｏｍｂｉｎａｔｏｒｉａｌ）ライブラリー（即ち、同一の成分を有するが、配列又はサイズにおいて異なる化合物のライブラリー）、又は推論的薬剤設計（ｒａｔｉｏｎａｌｄｒｕｇ ｄｅｓｉｇｎ）から取得することができる。例として、本明細書にそのまま参考として援用されるＭａｕｌｉｋｅｔ ａｌ．，１９９７，ＭｏｌｅｃｕｌａｒＢｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ａｎｄ Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ，Ｗｉｌｅｙ－Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃを参照のこと。候補化合物は、まず、薬剤設計方法により同定され、ＧＴＰ加水分解を調節するか、本明細書において記載の変異Ｒａｓタンパク質の立体構造的拮抗剤として働く能力によってスクリーニン

グされ得る。
【０１２２】
分子多様性戦略では、生物学的、酵素学的及び／又は化学的な手法を用いて、例えば、ペプチド、オリゴヌクレオチド、炭水化物、及び／又は合成有機分子からの大規模な化合物ライブラリーが合成される。
【０１２３】
分子多様性戦略を伸展させる重要なパラメーターは、サブユニットの多様性、分子サイズ及びライブラリーの多様性が挙げられる。このようなライブラリーをスクリーニングすることの主な目標は、組み合わせ的な選択を順次適用して、所望の目的に対して高親和性のリガンドを得、主たる分子を、ランダム又は方向付けされた設計戦略により最適化することである。分子多様性の手法は、上記Ｍａｕｌｉｋらの論文に詳細に記載されている。
【０１２４】
推論的薬剤設計手法では、調節複合体の三次元構造が、例えば核磁気共鳴（ＮＭＲ）又はＸ線結晶解析によって解析され得る。そして、この三次元構造は、有り得る複合体の構造を予見するために用いられ得る。例えば、コンピューターモデリングにより、あり得る調節剤が予見される。予見された複合体の構造は、例えば分子多様性手法により得られた主たる分子の最適化に用いられ得る。加えて、予見された複合体構造は、例えば化学合成、組換えＤＮＡ技術、又は天然資源（例えば、植物、動物、細菌及び真菌）からのミメトープ（ｍｉｍｅｔｏｐｅ）の単離により、製造され得る。
【０１２５】
他の様々な構造ベースの薬剤設計方法が上記Ｍａｕｌｉｋら（１９９７）に記載されている。Ｍａｕｌｉｋらは、例えば、ユーザーが、適切に選択されたフラグメントからなるフラグメントライブラリーから新規分子を作り出す過程を方向付けする、方向付けされた設計手法；ユーザーが、遺伝的又は他のアルゴリズムを用いてフラグメント及びその組み合わせをランダムに変異させるとともに、候補リガンドの親和性を評価する選択基準を適用する、ランダム設計；及び、ユーザーが、三次元受容体構造と小フラグメントプローブの間の相互作用エネルギーを算出し、好ましいプローブ部位を結合させる、グリッドベース手法を記載している。
【０１２６】
（組成物及びワクチン）
上述したように、本発明の一実施形態は、変異Ｒａｓタンパク質、それをコードする核酸分子、又は任意の治療用核酸（例えば、アプタマー、リボザイム、ＲＮＡｉ）又は上述したペプチド若しくは小分子（例えば、立体構造的拮抗剤、ＧＴＰ加水分解の活性化剤）を含む組成物又はワクチンに関する。本発明は、本明細書において記載の変異Ｒａｓタンパク質が、「従来の」組成物若しくはワクチン又は酵母ベースのワクチン（米国特許５，８３０，４６３号及び７，０８３，７８７号並びに米国特許出願公報２００４－０１５６８５８　Ａ１及び２００６－０１１０７５５Ａ１に記載）と組合わせて用いられる実施形態を含む。何れのタイプの組成物又はワクチンも、本明細書に記載の任意の変異Ｒａｓタンパク質（例えば、７６位の変異、好ましくは、Ｅ７６Ｇ、Ｅ７６Ｋ若しくはＥ７６Ｑ変異又はＲａｓＥ７６変異にＧ１２変異のような他の変異との組み合わせを有するＲａｓタンパク質又はペプチド）に加えて、薬学的に受容可能な担体を含み得る。本明細書において使用されるときに、薬学的に受容可能な担体は、本発明の方法において有用な変異Ｒａｓタンパク質を、適切なインビボ又はエクソビボの部位に送達するために好適なあらゆる物質又は運搬体を指す。当該担体としては、免疫賦活剤、賦形剤、又は送達運搬体若しくは担体のあらゆる他の種類が挙げられる。
【０１２７】
本発明では、免疫賦活剤剤は、典型的に、特定の抗原に対する動物の免疫反応を一般に増強する物質である。好適な免疫賦活剤としては、フロインドのアジュバント（Ｆｒｅｕｎｄ'ｓ　ａｄｊｕｖａｎｔ）；他の細胞壁組成物；アルミニウムに基づく塩；カルシウムに基づく塩；シリカ；ポリヌクレオチド；変性毒素；血清タンパク質；ウイルス被覆タン

パク質；他の細菌由来調整物；ガンマインターフェロン；ブロック共重合体免疫賦活剤（例えば、ハンターのタイターマックス免疫賦活剤（Ｈｕｎｔｅｒ's Ｔｉｔｅｒｍａｘ ａｄｊｕｖａｎｔ）（ＣｙｔＲｘ（商標）、Ｉｎｃ．Ｎｏｒｃｒｏｓｓ，ＧＡ））；リビ（Ｒｉｂｉ）免疫賦活剤（Ｒｉｂｉ ＩｍｍｕｎｏＣｈｅｍ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｈａｍｉｌｔｏｎ，ＭＴから入手可能である）；ならびにサポニン及びそれらの誘導体（例えば、クイル（Ｑｕｉｌ）Ａ（Ｓｕｐｅｒｆｏｓ Ｂｉｏｓｅｃｔｏｒ Ａ／Ｓ，Ｄｅｎｍａｒｋ）から入手可能である）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１２８】

担体は、典型的に、処理された動物における治療組成物の半減期を増強する化合物である。好適な担体としては、多量体化徐放性調合物、生物分解性植込錠、リポソーム、油、エステル、及びグリコールが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１２９】

また、ワクチンを含む本発明の治療用組成物は、１つ以上の薬学的に受容可能な賦形剤を含み得る。本明細書において使用されるときに、薬学的に受容可能な賦形剤は、本発明の方法に有用な治療用組成物を、適切なインビボ又はエクソビボの部位に送達するために好適なあらゆる物質を指す。好ましい薬学的に受容可能な賦形剤は、身体における標的細胞、標的組織又は標的部位に組成物が到達したときに、化合物が標的部位における免疫反応を誘引可能である（ここで、標的部位が全身であり得ることに注意されたい）形態に、組成物（又は、いくつかの実施形態において、酵母運搬体若しくは酵母運搬体を含む樹状細胞）を維持可能である。本発明の好ましい賦形剤としては、ワクチンを輸送するが、特にある部位に対してワクチンを標的化しない賦形剤又は調合物（また、本明細書において非標的化担体と呼ぶ）が挙げられる。薬学的に受容可能な賦形剤の例としては、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー溶液、デキストロース溶液、血清含有溶液、ハンクス液、他の水性の生理学的平衡溶液、油、エステル及びグリコールが挙げられるが、これらに限定されない。水性担体は、例えば、化学的安定性及び等張性を増強することによって、受給者の生理学的条件に近づけるために要求される、好適な補助物質を含むことができる。また、補助物質は、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、並びに、リン酸緩衝液、トリス緩衝液及び重炭酸イオン緩衝液を製造するために用いられる他の物質が挙げられる。補助物質はまた、チメロサール、ｍ－又はｏ－クレゾール、ホルマリン及びベンゾールアルコールのような防腐剤を含み得る。

【０１３０】

本発明の治療用組成物又はワクチンの一成分は、動物にワクチン接種するための少なくとも一つの抗原と含んでおり、特に、一つの抗原は、本明細書において記載のような、７６位に変異を有するＲａｓタンパク質の少なくとも部分を含んでいる。組成物又はワクチンは、一つ、二つ、いくつか、又は複数の抗原を含み得、所望の抗原の少なくとも一つ以上の免疫原性のドメインを含み得る。本発明では、この組成物又はワクチンにおいて使用するために好適な抗原は、同一の抗原からの二つ以上の免疫原性のドメイン若しくはエピトープ、同一の細胞、組織若しくは個体からの二つ以上の抗原、免疫原性のドメイン若しくはエピトープ、異なる細胞、組織若しくは個体からの二つ以上の異なる抗原、免疫原性のドメイン若しくはエピトープを含み得る。好ましくは、抗原は、酵母株に対して異種である（即ち、遺伝学的又は生物学的な操作なしに、酵母株が自然に作り出すタンパク質ではない）。従来のワクチン若しくは組成物において、又は本発明の酵母運搬体とともに用いるための好適な変異Ｒａｓタンパク質及び好適な融合タンパク質は、上述されている。

【０１３１】

本発明の１つの実施形態において、組成物又はワクチンは、生物学的反応修飾因子化合物、又は、当該修飾因子を（当該修飾因子をコードする核酸分子を用いたトランスフェクションによって）産生する能力を含み得るが、当該修飾因子は、酵母運搬体が用いられたとき（後述）の、本発明に係る強い免疫反応を達成するために必ずしも必要ではない。生物学的反応修飾因子は、免疫修飾化合物と呼ばれ得る免疫反応を修飾可能な化合物である

。ある種の生物学的修飾因子は、予防的な免疫反応を刺激可能であるが、他の修飾因子は、体液性免疫反応を抑制可能である。ある種の生物学的免疫修飾因子は、細胞性免疫反応を優先的に増強するが、他の修飾因子は、体液性免疫反応を優先的に増強する（すなわち、体液性免疫と比べて細胞性免疫の増強された水準である免疫反応を刺激可能であり、又は逆もまた同様である）。体液性免疫反応と細胞性免疫反応とを識別するだけでなく、免疫反応の刺激又は抑制を測定するための当業者に公知の多くの技術がある。

【０１３２】

好適な生物学的修飾因子としては、サイトカイン、ホルモン、脂質の誘導体、小分子薬物及び他の成長修飾因子（例えば、これらに限定されないが、インターロイキン２（ＩＬ－２）、インターロイキン ４（ＩＬ－４）、インターロイキン１０（ＩＬ－１０）、インターロイキン １２（ＩＬ－１２）、インタフェロンガンマ（ＩＦＮ－ガンマ）、インシュリン様成長因子 Ｉ（ＩＧＦ－Ｉ）、トランスフォーミング成長因子ベータ（ＴＧＦ－β）ステロイド、プロスタグランジン及びロイコトリエン）が挙げられる。好適な他の生物学的反応修飾因子としては、抗ＣＴＬＡ－４抗体（例えば、アネルギー性のＴ細胞放出するため）；Ｔ細胞同時刺激因子（例えば、抗ＣＤ１３７、抗ＣＤ２８、抗ＣＤ４０）；アレムツズマブ（ａｌｅｍｔｕｚｕｍａｂ）（例えば、キャンパス（ＣａｍＰａｔｈ）（登録商標））、デニロイキンジフチトックス（ｄｅｎｉｌｅｕｋｉｎ ｄｉｆｔｉｔｏｘ）（例えば、オンタック（ＯＮＴＡＫ）（登録商標））、抗ＣＤ－４、抗ＣＤ－２５、抗ＰＤ－１、抗ＰＤ－Ｌ１、抗ＰＤ－Ｌ２又はＦＯＸＰ３を遮断する因子（例えば、ＣＤ４陽性／ＣＤ２５陽性調節性Ｔ細胞の活性化／殺害を阻害するため）；Ｆｌｔ３リガンド、イミキモド（ｉｍｉｑｕｉｍｏｄ）（アルダラ（Ａｌｄａｒａ）（商標））、ＧＭ－ＣＳＦ、サルグラモスチム（ｓａｒｇｒａｍｏｓｔｉｍ）（ロイキン（Ｌｅｕｋｉｎｅ）（登録商標））、トール様受容体（Ｔｏｌｌ－ｌｉｋｅｒｅｃｅｐｔｏｒ）（ＴＬＲ）－７ アゴニスト、又はＴＬＲ－９アゴニスト（例えば、樹状細胞、マクロファージ及び他の専門の抗原提示細胞の、数を増やすか、又は活性化状態を増強する因子）が挙げられるが、これらに限定されない。当該生物学的反応修飾因子は、当該技術において公知であり、かつ公然に利用可能である。

【０１３３】

（酵母ベースワクチン又は組成物）

本発明の一局面は、（ａ）酵母運搬体；及び（ｂ）酵母運搬体によって発現される、少なくとも一つの、本明細書に記載の変異Ｒａｓタンパク質若しくはペプチド（例えば、７６位の変異を有するＲａｓタンパク質、又はＥ７６変異及び他のＲａｓ変異、例えばＧ１２変異を有するタンパク質若しくはタンパク質の組み合わせ）、多重のエピトープ又は抗原、又は本明細書に記載の融合タンパク質を含む、組成物又は酵母ベースのワクチンに関する。上述したように、Ｅ７６変異に加えて、７３位、７４位、７５位、７７位若しくは７８位の任意の一つ以上の位置における変異、又は上述したＲａｓ変異の任意の組み合わせ、特に、１２位及び／若しくは１３位の変異と、５９位、６１位、７３位、７４位、７５位、７６位、７７位及び／もしくは７８位の変異との組み合わせは、本発明の範囲内である。

【０１３４】

本発明では、酵母運搬体は、本発明のワクチン若しくは治療組成物において抗原とともに、又は免疫賦活剤として使用され得る、あらゆる酵母細胞（例えば、完全な又は原型を保った細胞）又はこれらの誘導物（後述を参照すればよい）である。従って、酵母運搬体としては、生きた原型を保った酵母微生物（すなわち、細胞壁を含めてすべての構成要素を有する酵母細胞）、殺した（死んだ）原型を保った酵母微生物、又はこれらの誘導物（酵母のスフェロプラスト（すなわち、細胞壁を欠く酵母細胞）、酵母の細胞質体（すなわち、細胞壁及び核を欠く酵母細胞）、酵母のゴースト（すなわち、細胞壁、核及び細胞質を欠く酵母細胞）、酵母細胞壁調整物、又は亜細胞性酵母膜抽出物若しくはそれらの画分（酵母膜粒子とも呼ばれる。また、以前は亜細胞性酵母粒子と呼ばれた）を含む）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１３５】
酵母のスフェロプラストは、酵母細胞壁の酵素消化によって典型的に産生される。当該方法は、例えば、本明細書にそのまま参考として援用される、Ｆｒａｎｚｕｓｏｆｆｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．１９４，６６２－６７４に記載されている。
【０１３６】
酵母の細胞質体は、酵母細胞の除核によって典型的に産生される。当該方法は、例えば、本明細書にそのまま参考として援用される、Ｃｏｏｎ，１９７８，Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ．Ｍｏｎｏｇｒ．４８，４５－５５に記載されている。
【０１３７】
酵母のゴーストは、透過化処理された、又は溶解させた細胞を封じ直すことによって産生され、かつ必要ではないが、その細胞の細胞小器官の少なくともいくつかを含むことができる。当該方法は、例えば、いずれも本明細書にそのまま参考として援用される、Ｆｒａｎｚｕｓｏｆｆｅｔ ａｌ．，１９８３，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５８，３６０８－３６１４及びＢｕｓｓｅｙ ｅｔ ａｌ．，１９７９，Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ ５５３，１８５－１９６に記載されている。
【０１３８】
酵母膜粒子(亜細胞性酵母膜抽出物又はこれらの画分)は、天然の核又は細胞質を欠く酵母の膜を指す。当該粒子は、あらゆる大きさ(天然の酵母の膜の大きさから、超音波処理又は当業者に公知の他の膜崩壊法に続いて、封じ直しによって産生される微粒子までの範囲の大きさを含む)であり得る。亜細胞性酵母膜抽出物を産生する方法は、例えば、Ｆｒａｎｚｕｓｏｆｆｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．１９４，６６２－６７４に記載されている。また、酵母膜部分を含む酵母膜粒子の画分、酵母膜粒子の調製前に、抗原が組換えによって発現される場合には、さらに関心のある抗原を含む画分を使用することができる。抗原は、膜の内部に、膜のいずれかの表面、又はこれらの組み合わせ（すなわち、抗原が、膜の内部及び外部の両方にあり得る、及び／又は酵母膜粒子の膜にまたがり得る）に運ばれ得る。１つの実施形態において、酵母膜粒子は、膜の表面上にあるか、又は膜内に少なくとも部分的に埋まっている少なくとも１つの所望の抗原を含む原型を保った、崩壊した、又は崩壊しかつ封じ直した酵母膜であり得る組み換え酵母膜粒子である。
【０１３９】
酵母細胞壁調製物の例は、当該酵母細胞壁調製物が、動物に投与されたときに感染性因子に対する所望の（例えば、予防的な）免疫反応を刺激するように、表面上に抗原を支持するか、又は少なくとも部分的に抗原が埋め込まれた単離した酵母細胞壁である。
【０１４０】
あらゆる酵母株は、本発明の酵母運搬体を産生するために使用され得る。酵母は、３つの分類：子嚢菌類、担子菌及び不完全菌類の１つに属する単細胞微生物である。免疫修飾物質としての使用に関する酵母の種類の選択に関する主な検討材料の１つは、酵母の病原性である。１つの実施形態において、酵母は、サッカロマイセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ)といった非病原性の株である。非病原性酵母株の選択は、酵母運搬体が投与される個体に対するあらゆる副作用を最小化のためになされる。しかし、病原性のある酵母は、当該酵母の病原性が当業者に公知のあらゆる手段（例えば、変異株）によって打ち消され得る場合に、使用され得る。病原性あるの酵母、又はこれらの非病原性の変異体は、補助剤として又は生物学的反応の修飾物質として過去に使用されており、かつ本発明に従って使用され得るが、非病原性の酵母が好ましい。
【０１４１】
酵母株の好ましい属としては、サッカロマイセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、カンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）（病原性であり得る）、クリプトコッカス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）、ハンセヌラ（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ）、クルイベロマイセス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）、ピチア（Ｐｉｃｈｉａ）、ロドトルラ（Ｒｈｏｄｏｔｏｒｕｌａ）、ス

キゾサッカトマイセス（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）及びヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）が挙げられ、同時にサッカロマイセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、カンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）、ハンセヌラ（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ）、ピチア（Ｐｉｃｈｉａ）及びスキゾサッカトマイセス（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）が好ましく、かつ同時にサッカロマイセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）が特に好ましい。酵母株の好ましい種としては、サッカロマイセス・セレビシエ（ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、サッカロマイセス・カルスバーゲンシス（ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓｃａｒｌｓｂｅｒｇｅｎｓｉｓ）、カンジダ・アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ ａｌｂｉｃａｎｓ）、カンジダ・ケフィア（Ｃａｎｄｉｄａ ｋｅｆｙｒ）、カンジダトロピカリス（Ｃａｎｄｉｄａｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ）、クリプトコッカス・ラウレンティ（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｌａｕｒｅｎｔｉｉ）、クリプトコッカス・ネオフォマンス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｎｅｏｆｏｒｍａｎｓ）、ハンセヌラ・アノマラ（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ ａｎｏｍａｌａ）、ハンセヌラ・ポリモルファ（Ｈａｎｓｅｎｕｌａｐｏｌｙｍｏｒｐｈａ）、クルイベロマイセス・フラジリス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓｆｒａｇｉｌｉｓ）、クルイベロマイセス・ラクティス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓｌａｃｔｉｓ）、クルイベロマイセス・マルキアヌス・バー・ラクティス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｍａｒｘｉａｎｕｓ ｖａｒ． ｌａｃｔｉｓ）、ピチア・パストリス（Ｐｉｃｈｉａｐａｓｔｏｒｉｓ）、ロドトルラルブラ（Ｒｈｏｄｏｔｏｒｕｌａ ｒｕｂｒａ）、スキゾサッカロマイセス・ポムベ（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓｐｏｍｂｅ）、及びヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）が挙げられる。これらの種が、上述の種の中に含まれることが意図される種々の亜種、類型、亜類型などを含むことは、十分に理解される。より好ましい酵母の種としては、Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、Ｃ．アルビカンス（Ｃ． ａｌｂｉｃａｎｓ）、Ｈ．ポリモルファ（Ｈ． ｐｏｌｙｍｏｒｐｈａ）、Ｐ．パストリス（Ｐ．ｐａｓｔｏｒｉｓ）及びＳ．ポムベ（Ｓ． ｐｏｍｂｅ）が挙げられる。Ｓ．セレビシエ（Ｓ． ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）は、操作が比較的に容易であること、及び食品添加物としての利用に関して「安全であると一般に認識されている（ＧｅｎｅｒａｌｌｙＲｅｃｏｇｎｉｚｅｄ Ａｓ Ｓａｆｅ）」こと、若しくは「ＧＲＡＳ」（ＧＲＡＳ、１９９７年４月１７日にＦＤＡが提出したＲｕｌｅ ６２ＦＲ１８９３８）であることによって、特に好ましい。本発明の１つの実施形態は、特に高いコピー数にプラスミドを複製可能な酵母株（例えば、Ｓ．セレビシエｃｉｒ株（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ ｃｉｒ）である。Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）株は、１つ以上の標的抗原及び／又は抗原融合タンパク質を高水準に発現可能にする発現ベクターを維持可能な当該株の１つである。その他に、発現された標的光源の低下した翻訳後修飾を示す変異（例えば、Ｎ結合型の糖化を延長する酵素における変異）を含む、あらゆる変異酵母株が本発明に使用され得る。

【０１４２】

１つの実施形態において、本発明の好ましい酵母運搬体は、樹状細胞又はマクロファージといった、酵母運搬体及び抗原が送達される細胞種と融合可能であり、従って、酵母運搬体、及び多くの実施形態において抗原の特に効率的な当該細胞種に対する送達をもたらす。本明細書において使用されるときに、標的細胞種との酵母運搬体の融合は、シンシチウム形成を導く、標的細胞種（例えば、樹状細胞又はマクロファージ）の膜との、酵母細胞膜又はこれらの粒子の融合能を指す。本明細書において使用されるときに、シンシチウムは、細胞の融合によってもたらされる細胞質の多核巨細胞の集団である。ウイルス表面タンパク質（ＨＩＶ、インフルエンザウイルス、ポリオウイルス及びアデノウイルスといった免疫不全ウイルスのウイルス表面タンパク質を含む）、及び他の融合誘導因子（例えば、卵子と精子との間における融合に関与する融合誘導因子）の多くは、２つの膜の間（例えば、ウイルスと哺乳類の細胞膜との間、又は哺乳類の膜同士の間）における融合をもたらすことが可能なことが示されている。例えば、表面上にＨＩＶのｇｐ１２０／ｇｐ４１を生じる酵母運搬体は、ＣＤ４陽性Ｔリンパ球と融合可能である。しかし、ここで留意すべきは、酵母運搬体への標的部分の組み込みは、一方ではある状況下において好ましく

あり得るが、必須ではない。細胞外に抗原を発現する酵母運搬体の場合において、これは、本発明の酵母運搬体のさらなる利点であり得る。本発明の酵母運搬体が樹状細胞（これと同様に、他の細胞（例えば、マクロファージ））によって容易に取り込まれることは、以前に示されている。

【０１４３】

本発明では、用語「酵母運搬体－抗原複合体」又は「酵母－抗原複合体」は、抗原との酵母運搬体のあらゆる関連を説明するために、一般的に使用される。当該関連としては、酵母（組み換え酵母）による抗原の発現、酵母への抗原の導入、酵母に対する抗原の物理的な接触、及び例えば、緩衝液又は他の溶液又は調合物における酵母及び抗原の同時の混合が挙げられる。複合体のこれらの種類について、以下に詳細に記載されている。

【０１４４】

１つの実施形態において、酵母運搬体を調製するために使用される酵母細胞は、抗原が酵母細胞によって発現されるように、抗原をコードする異種の核酸分子を用いてトランスフェクションされている。当該酵母は、本明細書において組み換え酵母又は組み換え酵母運搬体とも呼ばれる。酵母細胞は、原形を保った細胞として樹状細胞に取り込まれ得るか、又は酵母細胞は、又は殺され得る酵母細胞か、又は例えば、続いて樹状細胞に取り込まれるあらゆるものである、酵母のスフェロプラスト、細胞質体、ゴースト又は亜細胞性粒子の形成によって導かれ得る。また、酵母のスフェロプラストは、組み換え核酸分子を用いて直接にトランスフェクトされて（例えば、当該スフェロプラストは、完全な酵母から産生され、かつそれからトランスフェクトされて）、抗原を発現する組み換えスフェロプラストを産生し得る。

【０１４５】

１つの局面において、酵母運搬体を調製するために使用される酵母細胞又は酵母のスフェロプラストは、抗原が酵母細胞又は酵母のスフェロプラストによって組み換え的に発現されるように、抗原をコードする組み換え核酸分子を用いてトランスフェクトされる。この局面において、酵母を組み換え的に発現する酵母細胞又は酵母のスフェロプラストが使用されて、酵母の細胞質体、酵母のゴースト、又は酵母の膜粒子若しくは酵母細胞膜粒子、又はこれらの画分を備える酵母運搬体を産生し得る。

【０１４６】

一般的に、酵母運搬体及び抗原は、本明細書に記載のあらゆる技術によって関連され得る。１つの局面において、酵母運搬体は、抗原を細胞内に取り込んだ。他の局面において、抗原は、酵母運搬体と共有結合的に、又は非共有結合的に結合された。さらに他の実施形態において、酵母運搬体及び抗原は、混合によって関連された。他の局面において、及び好ましい実施形態において、抗原は、酵母運搬体によって、又は酵母運搬体が誘導された酵母細胞若しくは酵母のスフェロプラストによって組み換え的に発現される。

【０１４７】

本発明の酵母運搬体における抗原の発現は、当業者に公知の技術を用いて達成される。要約すれば、少なくとも１つの所望の抗原をコードする核酸分子は、宿主酵母細胞に形質転換される場合に、当該核酸分子の保存された、又は調節された発現に影響を与えることを可能にするために、当該核酸分子が転写制御配列と作動可能に連結されるように、発現ベクターに挿入される。１つ以上の抗原をコードする核酸分子は、１つ以上の発現制御配列と作動可能に連結された１つ以上の発現ベクターであり得る。特に重要な発現制御配列は、翻訳開始を制御する配列（例えば、プロモーター及び活性化配列の上流）である。あらゆる好適な酵母プロモーターが、本発明に使用され得、かつ種々の当該プロモーターは、当業者にとって公知である。Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓｃｅｒｅｖｉｓｉａｅにおける発現に好適なプロモーターとしては、以下の酵母タンパク質：アルコールデヒドロゲナーゼＩ（ＡＤＨ１）若しくはＩＩ（ＡＤＨ２）、ＣＵＰ１、ホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）、トリオースリン酸イソメラーゼ（ＴＰＩ）、翻訳伸張因子ＥＦ－１アルファ（ＴＥＦ２）、グリセルアルデヒド３リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＡＰＤＨ；またトリオースリン酸デヒドロゲナーゼに関してＴＤＨ３と呼ばれる）、ガラクトキナーゼ（ＧＡＬ

１）、ガラクトース１リン酸ウリジルトランフェラーゼ（ＧＡＬ７）、ＵＤＰ－ガラクトースエピメラーゼ（ＧＡＬ１０）、チトクロームｃ$_1$（ＣＹＣ１）、Ｓｅｃ７タンパク質（ＳＥＣ７）及び酸性ホスファターゼ（ＰＨＯ５）、これらと同時に、より好ましいハイブリッドプロモーター（例えば、ＡＤＨ２／ＧＡＰＤＨ及びＣＹＣ１／ＧＡＬ１０、及びグルコース濃度が低い（例えば、約０．１から約０．２パーセント）場合に挙げられ得るＡＤＨ２／ＧＡＰＤＨプロモーターだけでなく、さらにより好ましいＣＵＰ１プロモーターとＴＥＦ２と）をコードする遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。同様に、上流活性化配列（ＵＡＳｓ）（エンハンサーとも呼ばれる）の多くは、公知である。Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓｃｅｒｅｖｉｓｉａｅにおける発現にとって好ましい上流活性化配列としては、以下のタンパク質：ＰＣＫ１、ＴＰＩ、ＴＤＨ３、ＣＹＣ１、ＡＤＨ１、ＡＤＨ２、ＳＵＣ２、ＧＡＬ１、ＧＡＬ７及びＧＡＬ１０をコードする遺伝子のＵＡＳだけでなく、ＧＡＬ４遺伝子産物によって活性化されるＵＡＳと同時に、特に好ましくはＡＤＨ２のＵＡＳが挙げられるが、これらに限定されない。ＡＤＨ２のＵＡＳが、ＡＤＲ１遺伝子産物によって活性化されるので、異種遺伝子がＡＤＨ２のＵＡＳに対して作動可能に連結されている場合に、ＡＤＲ１遺伝子を過剰発現させることが好ましい。Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓｃｅｒｅｖｉｓｉａｅにおける発現にとって好ましい転写終結配列としては、α因子、ＧＡＰＤＨ及びＣＹＣ１遺伝子の終結配列が挙げられる。

【０１４８】

メチル要求性の酵母において遺伝子を発現するために好ましい転写制御配列としては、アルコール酸化酵素及び蟻酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の転写制御配列が挙げられる。

【０１４９】

酵母による抗原の細胞外発現に関する最適化の重要性及び方法は、本明細書のここまでにおいて、詳細に論じられている。

本発明に係る酵母細胞への核酸分子のトランスフェクションは、核酸分子が細胞に投与されるあらゆる方法（拡散、能動輸送、バスソニケーション（ｂａｔｈｓｏｎｉｃａｔｉｏｎ）、エレクトロポレーション、微量注入法、リポフェクション、吸着法、及び原形質融合が挙げられるが、これらに限定されない）によって達成され得る。トランスフェクトされた核酸分子は、酵母染色体に組み込まれるか、又は当業者に公知の技術を用いて染色体外ベクターに維持される。当該核酸分子を支持する酵母運搬体の例は、本明細書に詳細に開示されている。また、上記において論じたように、酵母細胞質体、酵母のゴースト、ならびに酵母膜粒子又はは細胞壁調製物は、原型を保った酵母微生物又は酵母スフェロプラストを、所望の核酸分子を用いてトランスフェクトすること、これらにおいて抗原を産生すること、ならびにそれからさらに、当業者に公知の方法を用いて当該微生物又はスフェロプラストを操作して、所望の抗原を含む細胞質体、ゴースト又は亜細胞性酵母膜抽出物又はこれらの画分を産生することによって組み換え的に産生され得る。

【０１５０】

組み換え酵母運搬体の産生及び酵母運搬体による抗原の発現にとって有効な条件としては、酵母株が培養され得る有効な培地が挙げられる。有効な培地は、典型的に、吸収可能な炭水化物源、窒素源及びリン酸源はもちろん、適切な塩、ミネラル、金属及び他の栄養物（例えば、ビタミン及び成長因子）を含む水性の培地である。培地は、複合栄養物を含み得るか、又は決まった最小培地であり得る。本発明の酵母株は、種々の容器（バイオリアクター、三角フラスコ、試験管、マイクロタイターディッシュ、及びペトリ板が挙げられるが、これらに限定されない）において培養され得る。培養は、酵母株にとって適切な温度、ｐＨ及び酸素含有量において実施される。当該培養条件は、当業者の専門的知識（例えば、Ｇｕｔｈｒｉｅｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．），１９９１，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ．１９４，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏを参照すればよい）の範囲内である。

【０１５１】

本発明のある局面において、及び特に、体液性免疫反応の誘導が所望される実施形態に

おいて抗原の十分な表面発現若しくは表面提供を有することが所望される場合において、酵母は、中性ｐＨに維持された培地において培養される。本発明において使用されるときに、用語「中性ｐＨ」は、約ｐＨ５．５から約ｐＨ８、好ましくは約ｐＨ６から約８の範囲のｐＨを指す。当業者は、軽微な変動（例えば、１０分の１又は１００分の１）がｐＨメーターを用いた測定に場合に生じ得ることを十分に理解する。従って、酵母細胞を培養するための中性ｐＨの使用は、酵母細胞が、培地の中にある時間の大部分に渡って中性ｐＨにおいて増殖されることを意味する。好ましくは、酵母は、少なくとも５．５のｐＨ水準に維持された培地（すなわち、培養培地のｐＨが５．５未満に下がることを許容しない）において培養される。酵母の培養における中性ｐＨの利用は、免疫調節用の運搬体として酵母を使用するための所望の特性である種々の生物学的影響を助長する。

【０１５２】

本発明の１つの実施形態において、酵母運搬体における抗原の組み替え的発現の代替手段として、酵母運搬体は、タンパク質抗原若しくはペプチド抗原、又は抗原として作用する炭水化物若しくは他の分子を細胞内に取り込んでいる。続いて、現在、細胞内に抗原を含む酵母運搬体は、患者に投与され得るか、又は担体（例えば、樹状細胞）に取り込まれ得る（以下に記載されている）。本明細書において使用されるときに、ペプチドは、約３０から５０アミノ酸と同等かそれ未満のアミノ酸配列を備え、一方においてタンパク質は、約３０から５０アミノ酸以上のアミノ酸配列を備え；タンパク質は多量体であり得る。抗原として有用なタンパク質又はペプチドは、Ｔ細胞エピトープほどの大きさ（すなわち、５アミノ酸以上の長さ）であり得、かつ複数のエピトープ、タンパク質断片、全長のタンパク質、キメラタンパク質又は融合タンパク質を包含する抗原よりも大きいあらゆる好適な大きさであり得る。ペプチド及びタンパク質は、天然に、又は合成的に誘導体化され得；当該修飾としては、糖化、リン酸化、アセチル化、ミリスチル化、プレニル化、パルミトイル化、アミド化及び／又はグリセロホスファチジルイノシトールの付加が挙げられるが、これらに限定されない。ペプチド及びタンパク質は、当業者にとって公知の技術（例えば、拡散、能動輸送、リポソーム融合、エレクトロポレーション、食作用、凍結融解循環及びバスソニケーション）によって、本発明の酵母運搬体に直接に挿入され得る。ペプチド、タンパク質、炭水化物又は他の分子を直接に取り込み得る酵母運搬体としては、産生の後であるが、樹状細胞への取り込みの前に、抗原を取り込み得るスフェロプラスト、ゴースト又は細胞質体だけでなく原型を保った酵母が挙げられる。代替可能に、原型を保った酵母は、抗原を取り込み得、かつそれからスフェロプラスト、ゴースト、細胞質体、又は亜細胞性粒子それらから調整され得る。あらゆる数の抗原、例えば、微生物の取り込みによって、哺乳類癌細胞又はそれらの一部の取り込みによって提供される、少なくとも１、２、３、４又は数百若しくは数千までのあらゆる整数の抗原が、この実施形態における酵母運搬体に取り込まれ得る。

【０１５３】

本発明の他の実施形態において、抗原は、酵母運搬体と物理的に付着される。酵母運搬体に対する抗原の物理的な付着は、当該技術において好適なあらゆる方法（共有的な及び非共有的な会合方法（例えば、抗体又は他の結合相手を用いることによって、酵母運搬体の外表面に対して抗原を化学的に架橋すること、又は酵母運搬体の外表面に対して抗原を生物学的に連結することが挙げられるが、これらに限定されない）が挙げられるが、これらに限定されない）によって達成され得る。化学的な架橋は、例えばグルタルアルデヒド連結、光親和性標識、カルボジイミドを用いた処理、ジスルフィド結合の架橋を可能にする化学物質、及び当該技術において標準的な他の架橋化学物質を用いた処理を含む方法によって達成され得る。代替可能に、化学物質は、特定の電荷特性を有する抗原とより融合又は結合しやすいように、酵母膜又は細胞壁の組成物の電荷を変える酵母運搬体と接触され得る。また、標的因子（例えば、抗体、結合ペプチド、可溶性受容体、及び他のリガンド）は、融合タンパク質として抗原に取り込まれ得るか、又はそうでなければ、酵母運搬体に対する抗原の結合のために、抗原と会合され得る。

【０１５４】

さらに他の実施形態において、酵母運搬体及び抗原は、より受動的な、非特異的な又は非共有結合的な機序によって、例えば、緩衝液又は他の好適な調合物（例えば、混和物）において酵母運搬体及び抗原を穏やかに混合することによって、互いに会合される。

【０１５５】

１つの実施形態において、酵母運搬体及び抗原は、両方ともが担体（例えば、樹状細胞又はマクロファージ）の細胞内に取り込まれて、本発明の治療組成物又はワクチンを形成する。代替可能に、本発明の抗原（例えば、本発明のＲａｓ融合タンパク質）は、酵母運搬体の非存在下において樹状細胞に取り込まれ得る。

【０１５６】

両方の構成要素の取り込みが達成され得る種々の形態について、以下に詳細に論じられている。本明細書において使用されるときに、用語「取り込んだ」及びこれらの派生物は、構成要素（例えば、酵母運搬体及び／又は抗原）の細胞（例えば、樹状細胞）に対する挿入、導入又は侵入を指す。構成要素を細胞内に取り込むことは、細胞の細胞内区画に対する（例えば、細胞質膜を介して、かつ最低でも細胞質、ファゴソーム、リソソーム、又は細胞のある細胞内空間への）構成要素の挿入又は導入を指す。細胞に構成要素を取り込むことは、構成要素が強制的に細胞に入れる（例えば、エレクトロポレーション）か、又は構成要素がある過程（例えば、食作用）によって細胞に入りやすい環境に（細胞と接触して、又は細胞の近くに）置かれる、あらゆる技術を参照する。取り込み技術としては、拡散、能動輸送、リポソーム融合、エレクトロポレーション、食作用、及びバスソニケーションが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態において、樹状細胞による酵母運搬体及び／又は抗原の取り込みに関する受動的な機序が使用され、当該受動的な機序としては、樹状細胞による酵母運搬体及び／又は抗原の食作用が挙げられる。

【０１５７】

１つの実施形態において、原型を保った酵母は（異種抗原の発現の有無に関係ない）、すりつぶされ得るか、又は酵母細胞壁調製物、酵母膜粒子若しくは酵母断片（すなわち、原型を保っていない）を産生するように処理され得、かつある実施形態において、酵母断片は、免疫反応を増強するための抗原（例えば、ＤＮＡワクチン、タンパク質サブユニットワクチン、殺した病原体又は不活化した病原体）を含む他の組成物とともに提供され得るか、又は投与され得る。例えば、酵素的処理、化学的処理又は物理的力（例えば、機械的なせん断又は超音波処理）は、酵母を、補助剤として使用される部分にまで壊すために使用され得る。

【０１５８】

（本発明の治療方法）

本発明の一実施形態は、本明細書に記載の本発明の変異Ｒａｓタンパク質（例えば、少なくとも第７６番目のコドンの変異、又は、第７６番目のコドンと第１２番目のコドンの変異のような他のをＲａｓ変異との組み合わせを有するＲａｓ）に関係する任意の剤の、薬品、組成物又は癌に対して動物を保護するためのワクチンの調製における使用に関する。上述したように、Ｅ７６変異に加えて、７３位、７４位、７５位、７７位若しくは７８位の任意の一つ以上の位置における変異、又は上述したＲａｓ変異の任意の組み合わせ、特に、１２位及び／若しくは１３位の変異と、５９位、６１位、７３位、７４位、７５位、７６位、７７位及び／もしくは７８位の変異との組み合わせは、本発明の範囲内である。本発明の他の実施形態は、癌を有するか、又は癌を進行させる危険性を有する動物に、本明細書に記載のワクチン又は治療用組成物を投与して動物における癌の少なくとも一つの症状を低減させるか、又は予防する、癌に対して動物を保護する方法に関する。

【０１５９】

一つの局面において、ワクチン又は組成物は、７６位に変異を有する変異Ｒａｓタンパク質若しくはペプチド又は７６位の変異と、１２位の変異のような他のＲａｓ変異とを含む抗原を少なくとも含む抗原を含んでおり、より好ましくは、上述した様々なペプチド、タンパク質、キメラ構築物及び／又は融合タンパク質を含んでいる。ワクチン又は組成物において用い得る他のＲａｓ変異及びそれらの組み合わせは上述している。本発明の方法

において有用な他の治療用組成物は、本発明者らによって同定された変異Ｒａｓタンパク質を標的とし、腫瘍による当該タンパク質の発現を抑制するか、Ｒａｓタンパク質のＧＴＰ加水分解を開始又は亢進させてＧＴＰ加水分解により変異Ｒａｓタンパク質の影響を取り消す又は調整する化合物又は剤を含む。そのような化合物又は剤は、これに限定されるものではないが、様々な抑制性の核酸、例えば、リボザイム、ＲＮＡｉ若しくはアプタマー、並びに／又は様々なペプチド及び合成若しくは小分子化合物（例えば、本発明者らによって見出された変異Ｒａｓを用いた創薬の産物）、例えば、立体構造的拮抗剤又はＧＴＰ加水分解の活性化剤を含み得る。そのような化合物又は剤、及びそれらを同定するための方法は、本明細書の他の部分において記載している。本発明の一つの局面において、全長の変異Ｒａｓ産物（例えば、核酸分子及びタンパク質）は、本発明の治療方法及び使用に関連して、個体に投与されない場合がある；むしろ、そのようなＲａｓ産物のペプチド若しくはフラグメント、又はそのようなＲａｓ産物に関連した他のツール（例えば、アプタマー、ＲＮＡｉ等）が選択される。免疫反応を引き起こすための組成物において、特に、本発明の酵母運搬体による発現において、全長のＲａｓが用いられ得るが、免疫原性の部分及び多重ドメインの融合タンパク質が好ましい。

【０１６０】

ワクチン又は組成物は又、薬学的に許容される担体又は賦形剤を含み、一実施形態（例えば、組成物がワクチンである場合）において、本明細書に記載の酵母運搬体を含む。一つの局面において、ワクチンに含まれる融合タンパク質は、少なくとも二以上の癌抗原を含む。他の局面において、そのような融合タンパク質は、少なくとも一以上の癌抗原の一以上の免疫原性のドメインを含む。

【０１６１】

他の局面において、癌抗原は、これに限定するものではないが、メラノーマ、へん平上皮癌、乳癌、頭頚部癌、甲状腺癌、軟部組織腫瘍、骨腫瘍、睾丸癌、前立腺癌、膵臓癌、卵巣癌、膀胱癌、皮膚癌、脳腫瘍、血管の腫瘍、血管種、マスト細胞種、原発性肝癌癌、肺癌（非小細胞肺癌を含む）、膵臓癌、消化管癌（大腸癌を含む）、腎細胞種、造血器腫瘍及びそれらの転移癌と言った癌に関連する抗原である。

【０１６２】

全ての局面において、７６位の変異を含むＲａｓペプチド、７６位の変異と少なくとも一つの付加的なＲａｓの変異、例えば１２位の変異との組み合わせ、７３位、７４位、７５位、７７位、若しくは７８位における変異を含むＲａｓ、又は上述したような、それらの変異を利用する核酸の剤若しくは他の剤を含む、又は、主にそれらからなる、又は、それらからなる少なくとも一つの抗原が、ワクチン又は組成物に含まれる。

【０１６３】

本発明は、本発明の組成物又はワクチンの動物への送達を含む。投与工程は、エクソビボ又はインビボにおいて行い得る。エクソビボ投与は、調節工程の一部を患者の体外において行うことを指す。例えば、患者から取り除いた細胞（樹状細胞）集団に、酵母運搬体及び抗原が細胞内に取り込まれる条件のもと本発明の組成物を投与し、患者に細胞を戻すことが挙げられる。本発明の治療用組成物は、あらゆる適した投与様式により、患者に戻すことができ、又は患者に投与することができる。

【０１６４】

本発明に係るワクチン又は組成物の投与は、全身性投与、粘膜投与及び／又は標的部位の近傍（例えば、腫瘍のそば）への投与であり得る。好ましい投与経路は、予防若しくは治療する症状、用いられる抗原、及び／又は標的細胞集団若しくは組織のタイプに基づき当業者にとって明白であろう。好ましい投与方法としては、静脈内投与、腹腔内投与、筋肉内投与、結節内（ｉｎｔｒａｎｏｄａｌ）投与、冠動脈内投与、動脈内投与（例えば、頚動脈への投与）、皮下投与、経皮送達、気管内投与、皮下投与、関節内投与、心室内投与、吸入（例えば、エアロゾル）、頭蓋内、髄腔内、眼内、経耳、鼻腔内、経口、経肺投与、カテーテル注入、及び組織への直接注射が挙げられるが、これらに限定されない。特に好ましい投与経路は、静脈内、腹腔内、皮下、皮内、結節内、筋肉内、経皮、吸入、鼻

腔内、経口、眼内、関節内、頭蓋内及び髄腔内である。非経口送達としては、皮内、筋肉内、腹腔内、胸腔内、肺内、静脈内、皮下、心房カテーテル及び静脈カテーテルが挙げられる。経耳送達としては点耳が挙げられ、鼻腔内送達としては点鼻又は鼻腔内注射が挙げられ、また眼内送達としては点眼が挙げられる。エアロゾル（吸入）送達は、この分野において標準的な方法（例えば、本明細書にそのまま参考として援用される、Ｓｔｒｉｂｌｉｎｇｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９９２，１８９:１１２７７－１１２８１を参照）を用いて行うことも可能である。例えば、一実施形態において、本発明の組成物又はワクチンは、適した吸入器具又は噴霧器を用いての噴霧送達に適した組成物に調剤し得る。経口送達では、口から摂取し得る固体及び液体が挙げられる。経口送達は粘膜免疫の発現に有用であり、また、酵母運搬体を含んで構成される組成物を、例えば錠剤若しくはカプセルとして、同様に食品及び飲料製造物内に調剤して経口送達用に容易に調製できることから有用である。粘膜免疫を調節する他の投与経路は、ウイルス感染及び他の病原体による感染の治療においてとりわけ有用である。このような経路としては、気管支、皮内、筋肉内、鼻腔内、他の吸入、直腸、皮下、局所性、経皮、膣及び尿道口経路が挙げられる。

【０１６５】

本発明によれば、効果的な投与プロトコール（すなわち、効果的な手段によりワクチン又は治療用組成物を投与する方法）は、好ましくは動物が病気から保護されるように、（治療用又は予防用）ワクチンを投与した場合に、病気若しくは病状を患っている動物又は病気若しくは病状にかかる危険性のある動物に免疫反応を結果として引き出す、適した投与量パラメーター及び投与様式を含む。組成物が、本明細書に記載したような様々な治療用化合物又は薬剤を含んでいるとき、効果的な投与プロトコールは、少なくとも一つの症状又は患者における疾患若しくは症状の指標（例えば、腫瘍の大きさ若しくは程度）の緩和又は検知し得る改善、又は、患者が、病気若しくは病状にかかる危険性のあるときの疾患の予防を結果として引き出す、適した投与量パラメーター及び投与様式を含む。効果的な投与量パラメーターは、特定の病気に対して、この分野において標準的な方法により決定できる。このような方法としては、例えば、生存率、副作用（すなわち、毒性）及び病気の進行又は退行の判定が挙げられる。

【０１６６】

本発明によれば、適した単回投与量は、適した期間にわたって１回以上投与することによって、動物に、抗原特異的免疫反応又は少なくとも一つの症状若しくは疾患の指標の改善を引き出すことができる量である。投与量は治療すべき病気又は病状によって異なり得る。例えば、一実施形態において、本発明の酵母運搬体の単回投与量は、組成物が投与される生物の体重１ｋｇあたり約１×１０^{5}から約５×１０^{7}酵母細胞相当物である。好ましい実施形態では、投与量あたりの酵母細胞は、生物の体重に合わせては調整されていない。この実施形態において、本発明の酵母運搬体の単回投与量は、投与量あたり約１×１０^{4}から約１×１０^{9}酵母細胞である。より好ましくは、本発明の酵母運搬体の単回投与量は、投与量あたり（すなわち、生物あたり）約０．１Ｙ．Ｕ．（１×１０^{6}細胞）から約１００Ｙ．Ｕ．（１×１０^{9}細胞）であり、$０．１\times１０^{6}$細胞単位で（すなわち、$１．１\times１０^{6}$，$１．２\times１０^{6}$，$１．３\times１０^{6}$．．．）、その間のあらゆる投与量を含んでいる。投与量のこの範囲は、マウス、サル、ヒトなど、あらゆる大きさのあらゆる生物に効果的に使用し得るものである。酵母運搬体及び抗原を樹状細胞に取り込ませることによってワクチンを投与する場合には、本発明のワクチンの好ましい単回投与量は、投与ごとの生物あたり約$０．５\times１０^{6}$から約４０×１０^{6}樹状細胞である。単回投与量は、好ましくは、個体あたり約１×１０^{6}から約２０×１０^{6}樹状細胞であり、より好ましくは、個体あたり約１×１０^{6}から約１０×１０^{6}樹状細胞である。

【０１６７】

核酸ワクチンの好ましい単回投与量は、投与経路及び／又は送達の方法に基づいて当業者により定められ、約１ナノグラム（ｎｇ）から約１００μｇの範囲である。好適な送達方法は、例えば、注射により、ドロップとして、エアロゾル化して及び／又は局所的に行

うことを含む。一実施形態において、純粋なＤＮＡ構築物が、金粒子（直径１から３μｇ）の表面を覆っており、「遺伝子銃」によって、皮膚細胞又は筋肉内に送り込まれる。

【０１６８】

核酸：リポソーム複合体の適切な単回投与量は、複合体を投与する患者の体重１ｋｇ当たり、約０．１μｇから約１００μｇである。他の実施形態において、適切な単回投与量は、体重１ｋｇ当たり約１μｇから約１０μｇである。他の実施形態において、核酸：脂質複合体の適切な単回投与量は、少なくとも核酸相当で約０．１μｇ、より好ましくは、少なくとも核酸相当で約１μｇ、なお好ましくは、少なくとも核酸相当で約１０μｇ、なおさらに好ましくは、少なくとも核酸相当で約５０μｇ、なおさらに好ましくは、少なくとも核酸相当で約１００μｇである。

【０１６９】

組成物が、タンパク質、小分子（即ち、薬剤設計の産物）又は抗体を含んでいるとき、そのような組成物の好ましい単回投与量は、典型的には、動物の体重に対し、約０．０１μｇ／ｋｇと約１０ｍｇ／ｋｇとの間である。そのような剤のより好ましい単回投与量は、動物の体重に対し、約１μｇ／ｋｇと約１０ｍｇ／ｋｇとの間である。そのような剤のなおさらに好ましい単回投与量は、動物の体重に対し、約５μｇ／ｋｇと約７ｍｇ／ｋｇとの間である。そのような剤のなおさらに好ましい単回投与量は、動物の体重に対し、約１０μｇ／ｋｇと約５ｍｇ／ｋｇとの間である。そのような剤の他の特に好ましい単回投与量は、当該剤が非経口で送達される場合に、動物の体重に対し、約０．１μｇ／ｋｇと約１０μｇ／ｋｇとの間である。

【０１７０】

ワクチンである治療用組成物の「追加免疫（ｂｏｏｓｔｅｒ）」は、抗原に対する免疫反応が弱まったとき、又は免疫反応の供給若しくは特定の単一若しくは複数の抗原に対する記憶応答の誘導が必要なときに、好ましくは投与される。追加免疫は、はじめの投与から約２週間から数年経過後に投与可能である。一実施形態において、投与スケジュールは、生物の体重１ｋｇあたり、組成物の約1×10^{5}から約5×10^{7}酵母細胞相当物を、約１月から約６月の期間にわたって、約１回から約４回投与するスケジュールである。本明細書に記載の他の治療用組成物の追加投与は、投与後の患者の再評価及び疾患、病態、症状又はそれらの指標の状態の評価に基づいて、臨床医によって決定され得る。

【０１７１】

本発明の一実施形態において、本明細書において記載のＲａｓ変異を有していると同定された患者に対して、野生型又は「健康な」（変異していない）Ｒａｓを患者に送達するための遺伝子治療を、本発明に記載の他の治療方法と組合わせて、又は別々に適用することができる。遺伝子治療プロトコールにおける核酸分子の適用方法は、公知である。

【０１７２】

本発明の治療用組成物及びワクチンについての方法及び使用は、主に、疾患又は症状の予防及び／又は治療における使用を意図している。用語「保護する」は、一般に、予防及び／又は治療を意図するために用いられ得る。本発明の治療用組成物又はワクチンは、個体に対して投与される場合、以下をなし得る：疾患が生じることを予防する；疾患を治癒する；疾患の進行を遅らせる；及び／又は疾患の症状、兆候、若しくは原因を緩和（低減、遅らせる、減縮）する（例えば、疾患の一つ以上の症状を低減する；疾患の発症を低減する；疾患を有する、又は伸展させている個体の生存率を向上させる）。このように、本発明は、疾患の発症の予防（予防処置又は予防用ワクチン）及び疾患を有する、又は疾患の症状に悩む動物の治療（治療処置又は治療用組成物）の両方を含む。一実施形態において、本発明の方法は、個体における免疫反応を引き出すために効果的であり、有益又は保護的な免疫反応を誘導し、いくつかの場合においては、さらに、過剰又は有害な免疫反応を抑制（例えば、低減、阻害又は遮断）する。他の局面において、本発明の方法は、疾患又は病態の少なくとも一つの症状又は指標について、少なくとも一つの検知し得る改善又は利益を引き出すために有効であり、癌について、これに限定するものではないが、全身腫瘍組織量を低減させる（例えば、腫瘍のサイズの低減、腫瘍の程度の低減、腫瘍の成長

速度の低減、及び／又は転移の低減）、及び／又は疾患の進行を遅らせる、及び／又は患者の生存率を向上させる。

【０１７３】

（本発明の診断方法及び予後判定方法）

本発明の他の実施形態は、本発明の変異Ｒａｓタンパク質もしくは変異ｒａｓ核酸分子、ならびにこれらの一部の、癌用の診断的な又は予後判断のアッセイ又はキットにおける生物マーカーとしての利用に関する。好ましい実施形態において、本発明は、癌用の診断的な又は予後判断のアッセイにおける変異Ｒａｓタンパク質をコードする核酸（遺伝子又はＲＮＡ）の検出に関する。１つの実施形態において、方法は、核酸試料又はタンパク質試料におけるＥ７６変異マーカー（また、本明細書において生物マーカーと一般的に呼ばれる）の存在及び／又はレベルの決定を包含する。Ｅ７６変異は、本明細書に記載のようなあらゆるＥ７６における変異を包含可能であり、かつＥ７６Ｇ変異、Ｅ７６Ｋ変異、又はＥ７６Ｑ変異を好ましく包含するが、他の腫瘍が野生型のタンパク質又は遺伝子と比べてＲａｓのこの位置に異なる変異を有し得ることは理解されるべきである。生物マーカーは、変異Ｒａｓタンパク質の検出によって検出され得るが、当該変異Ｒａｓタンパク質をコードする核酸分子（ＲＮＡ又はＤＮＡ）の検出によってより好ましく検出され得る。他の実施形態において、方法は、Ｒａｓにとって他の変異体生物マーカー（Ｒａｓの１２、１３、５９又は６１位（コドン）におけるこれまでに公知の変異が挙げられる）の存在及び／又はレベルの（同時の又は連続した）検出を付加的に包含する。１つの実施形態において、方法は、単一の患者試料（核酸又はタンパク質）におけるＥ７６変異及びＧ１２変異の両方の存在及び／又はレベルの決定を包含する。他の実施形態において、方法は、７３、７４、７５、７７もしくは７８位の１つ以上のあらゆる位置の、又は上述のＲａｓ変異のあらゆる組み合わせ（そして特に５９、６１、７３、７４、７５、７６、７７、及び／又は７８位における変異と１２及び／又は１３位における変異のあらゆる組み合わせ）の存在及び／又はレベルの決定を包含できる。以下の局面は、便宜上、Ｅ７６変異に関して記載されるが、これらの変異又はこれらの組み合わせのあらゆるものを包含することにまで拡大されるべきである。

【０１７４】

本発明のこの方法の第１の段階は、変異ｒａｓ遺伝子（Ｅ７６　Ｒａｓ変異を結果として生じる変異を備える）、及び／又は患者に由来する試験試料（また、患者試料と呼ばれる）におけるＥ７６　Ｒａｓの発現もしくは生物活性の検出を包含する。患者試料を取得する好適な方法は、当業者にとって公知である。患者試料は、腫瘍細胞もしくは腫瘍細胞のタンパク質を含有し得る、患者に由来するあらゆる体液又は組織を包含できる。より詳細には、本発明によれば、用語「試験試料」又は「患者試料」は、本方法によって評価されるべき細胞から分泌されているか、もしくは細胞内に含まれる産物、又は細胞を含有するあらゆる種類の試料（単離した細胞の試料、組織試料、体液試料、又は例えば、患者から単離された細胞試料から取得さられた核酸の試料が挙げられるが、これらに限定されない）を指して、一般的に使用され得る。

【０１７５】

本発明によれば、単離された細胞の試料は、本発明の方法による評価にとって好適な数の細胞の回収を結果としてもたらすあらゆる好適な方法によって器官、組織又は液体から回収されている、典型的に懸濁液における細胞の検体であるか、又はインビボにおける組織内において細胞と結合している結合組織から分離される細胞の検体である。細胞試料における細胞は、同種である必要はないが、精製方法が使用されて好ましく評価される細胞種を富化し得る。細胞は、例えば、組織の掻き取り、組織試料を処理して個々の細胞を遊離すること、又は体液からの単離によって取得され得る。

【０１７６】

組織試料は、単離した細胞の試料と同様であるが、種々の細胞種及び／又は細胞を結合する細胞骨格構造を典型的に包含する体の器官又は組織の切片として、本明細書において定義される。当業者は、ある場合に用語「組織試料」が「細胞試料」と交換可能に使用さ

れ得るが、細胞試料よりも複雑な構造を示すために好ましく使用されることを十分に理解する。組織試料は、生検（例えば、切り取り、薄片化、又は打ち抜きが挙げられる）によって取得され得る。

【０１７７】

組織試料と同様に、体液試料は、マーカー発現もしくは生物活性に関して評価されるべき細胞を含有し、及び／又は細胞によって分泌され、かつ採取されるべき特定の体液にとって好適なあらゆる方法によって取得される液体である可溶性の生物マーカーを含有し得る。採取に好適な体液の例としては、血液、粘膜、精液、唾液、母乳、胆汁及び尿が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１７８】

一般的に、試料種（すなわち、細胞、組織又は体液）は、腫瘍細胞の存在もしくは増殖に関して評価されるべき器官もしくは組織の接触性及び構造と、及び／又は評価されるべき癌の種類とに基づいて選択される。例えば、評価されるべき器官／組織が乳房である場合には、試料は、生検に由来する上皮細胞の試料（すなわち、細胞試料）、又は生検に由来する乳房組織試料（組織試料）であり得る。本発明において最も有用な試料は、生検又は外科的処置又は通常の研究室における液体回収によって患者から単離された、細胞、組織又は体液（及びこれらの成分（例えば、ＤＮＡ））である。

【０１７９】

いったん試料が患者から取得されると、試料は、ｒａｓ遺伝子の単独もしくは他の変異の存在を検出するために評価されるか、又はＥ７６Ｒａｓの単独もしくは他の変異（例えば、他のＲａｓ又はｒａｓ変異、そして特に試料の細胞における本発明のＧ１２変異）との組み合わせにおける発現もしくは生物活性を検出するために（例えば、変異遺伝子産物をコードするｍＲＮＡの検出によってか、又は変異Ｒａｓタンパク質の検出によって）評価される。

【０１８０】

例えば、ｒａｓ生物マーカーの存在及び／又はレベルは、従来の方法（例えば、遺伝子又はＲＮＡの検出方法（例えば、ＤＮＡ塩基配列決定法、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション（ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ）、変異に対して特異的なプライマーを用いたＰＣＲ増幅）、又はタンパク質検出方法（例えば、遺伝子産物のレベルを検出するための免疫学検定法又は生化学的検定法））によって決定され得る。一般的に、患者試料におけるｒａｓ遺伝子又はＲＮＡの核酸配列は、遺伝子配列又は遺伝子発現を測定又は決定するあらゆる好適な方法又は技術によって検出され得る。当該方法の例としては、ＰＣＲ、逆転写酵素－ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）、インサイチュ（ｉｎｓｉｔｕ）ＰＣＲ、インサイチュ ハイブリダイゼーション、サザンブロット、ノザンブロット、配列分析、マイクロアレイ分析、レポータ遺伝子の検出、他のＤＮＡ／ＲＮＡハイブリダイゼーションプラットフォーム（ｐｌａｔｆｏｒｍ）が挙げられるが、これらに限定されない。発現は、変異ｒａｓ配列の存在に関して簡単に評価され得、及び／又は健康な個体から単離された試料もしくは他の陰性対照と比較され得る。

【０１８１】

例えば、包埋パラフィン塊に由来する患者の腫瘍生検試料は、病的な細胞がレーザ捕捉顕微解剖（ｌａｓｅｒｃａｐｔｕｒｅ ｍｉｃｒｏｄｉｓｓｓｅｔｉｏｎ）によって単離され得た後に、切片化され、かつヘマトキシリンを用いて染色され得る。それから、単離した細胞に由来するゲノムＤＮＡは、ＰＣＲ用の鋳型として使用されて、関心のある配列と隣接するプライマーを用いて、エキソン３における特定のｒａｓ配列を内部に有するＤＮＡ断片を増幅する。代替可能に、腫瘍生検に由来する切片は、増幅された配列が腫瘍細胞内において特異的に検出されるように標識ヌクレオチドを用いてプライマーが伸張され、かつ変異配列と結合する当該プライマーとのハイブリダイゼーションに増幅が依存するような、インサイチュＰＣＲによって分析され得る。さらに代替可能なものとして、切片は、１つ以上のＥ７６変異と特異的にハイブリダイズするが、野生型のｒａｓ配列とは特異的にハイブリダイズしないオリゴヌクレオチドを用いて試験される。

【０１８２】
Ｒａｓ Ｅ７６変異体タンパク質（又は本明細書に記載のＲａｓ変異の組み合わせ）が検出される場合に、タンパク質発現は、好適な組織（例えば、生検によって取得された腫瘍組織及び細胞材料）において検出され得る。例えば、固定化され得る患者の腫瘍生検試料は、検出されるＲａｓタンパク質と選択的に結合する抗体、抗体断片、又はアプタマーと接触させ得、かつ抗体、これらの断片又はアプタマーがＲａｓタンパク質と結合しているか否かを決定し得る。結合は、当該分野において標準的な種々の方法（ウエスタンブロット、免疫ブロット、酵素結合免疫吸着検定（ＥＬＩＳＡ）、放射免疫測定（ＲＩＡ）、免疫沈降、表面プラズモン共振（ｓｕｒｆａｃｅｐｌａｓｍｏｎ ｒｅｓｏｎａｎｃｅ）、化学発光、蛍光分極、燐光、免疫組織化学分析、マトリックス支援レーザイオン化飛行時間（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ）質量分析、微小細胞数測定、マイクロアレイ、顕微鏡法、蛍光表示式細胞分取（ＦＡＣＳ）、及びフローサイトメトリーが挙げられるが、こられに限定されない）を用いて測定され得る。特に免疫アッセイにおいて、Ｒａｓタンパク質に対する結合は、変異Ｒａｓタンパク質と特異的に結合する第１のモノクローナル抗体及び当該第１の抗体と結合する第２の抗体を用いて決定される。

【０１８３】
本発明の診断的／予後判定方法において、Ｅ７６ Ｒａｓ又はｒａｓ変異（又は本明細書に記載のＲａｓもしくはｒａｓ変異の組み合わせ）が（核酸又はタンパク質の検出のいずれかによって）検出される場合に、この変異が「健康な」個体（すなわち、このＲａｓ変異によって引き起こされる癌、又はもたらされる癌になり易くなっておらず、かつ癌になり易いとは思われない個体）において存在するとは予想されないので、変異の当該検出は、患者における腫瘍細胞の存在又は腫瘍細胞を発生し易い傾向の指標であると考えられる。しかし、必要に応じて、Ｒａｓ又はｒａｓ変異の検出を、必要に応じて健康な又は正常な個体における「Ｒａｓ状態」（すなわち、Ｒａｓタンパク質又は遺伝子の配列）と比較できる。

【０１８４】
Ｅ７６変異の検出は、患者における腫瘍細胞の存在又は腫瘍細胞を発生し易い傾向の明確な診断を下すのに十分であると同時に、腫瘍試料における他のＲａｓ変異、又はｒａｓ変異、そして特にＧ１２変異とのＥ７６の組み合わせの検出は、腫瘍細胞の存在又は腫瘍細胞を発生し易い傾向だけでなく、Ｅ７６単独の検出、他のＲａｓ変異（例えば、Ｇ１２変異）単独の検出、及び／又は変異なしの検出と比べてより悪性であると予測される腫瘍（例えば、より早い腫瘍の成長又はより大きな体積の腫瘍、強まった浸潤性、転移性の成長に関して強まった性向、悪い結果に関して強まった予後を示す）の指標であると思われる。

【０１８５】
本発明によれば、「基線レベル」は、対照レベルであり、かついくつかの実施形態（方法に依存するすべての実施形態ではないが）において、生物マーカー発現又は生物活性の試験レベル（すなわち、試験試料において）が比較され得る生物マーカー（例えば、Ｒａｓ又はｒａｓ）発現又は生物活性の通常レベルである。生物マーカー発現又は生物活性の基線レベルに対する言及に使用される、用語「陰性対照」は、患者に由来にする試料又は正常である（例えば、非腫瘍性である、非癌性である、悪性軽質転換を経ていない、腫瘍細胞の存在又は不適切な細胞増殖を示していない）と思われる個体の集団に由来する試料において設定された、基線レベルを典型的に指す。１つの実施形態において、患者の腫瘍状態（すなわち、全身腫瘍組織量、腫瘍増殖、腫瘍体積など）が長期間に渡って監視され得るように、及び／又は所定の治療手順の有効性が長期間に渡って評価され得るように、基線レベル又は対照は、試験される患者に由来する無関係な組織（すなわち、癌によって冒されていないと思われる組織）に鑑みて設定され得る。Ｒａｓの生物マーカー発現又は生物活性を検出する方法は、上記において詳細に説明されている。「陽性対照」は、生物マーカーの陽性検出を確認するあらゆる対照（例えば、確認された腫瘍において証明された生物マーカー発現又は生物活性のレベル）、又は生物マーカーに関して評価され得る要

素の陽性指標を含むことができる。

【０１８６】

基線又は対照が使用される場合に、アッセイが実施されるときに基線又は対照がアッセイのそれぞれに対して設定される必要はないが、むしろ基線又は対照が所定の対象試料に対して以前に決定された生物マーカーの基線レベル（例えば、上述の方法のあらゆるものによって設定された基線レベル）に関する蓄積情報の一形態を参照することによって設定され得ることは、当業者によって十分に理解される。当該蓄積情報の一形態としては、例えば、「健康な」（陰性対照）生物マーカー発現もしくは腫瘍陽性の（病期にある腫瘍を含む）生物マーカー発現に関する集団の又は個人のデータの一覧表、表もしくは電子ファイル；以前の評価にゆらいするデータを記録している、患者に対するカルテ；又は診断される患者に有用な基線の生物マーカー発現に関するデータのあらゆる情報源が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１８７】

変異Ｒａｓタンパク質又はＲａｓをコードする遺伝子又はＲＮＡの存在又は非存在が試料において検出されて腫瘍細胞に関して評価された後に、患者の診断、監視、病期判断をなす最終段階が実施され、かつ処置又は予防手段又はさらなるスクリーニング手段が指示され得る。さらに、Ｒａｓ変異の存在が検出される場合には、患者が別の癌診断によって評価されて、最初の診断を確かめ得る。

【０１８８】

本発明の１つの実施形態において、診断方法は、患者に対する診断、患者に対する予後判定を決定するために、及びまた適切な治療手順を決定するために及び所定の癌手順を用いた患者の好結果もしくは転帰を予想するために、使用され得る。例えば、患者が、癌にかかっているか、又は癌の発達のおそれを有する場合に、方法は、患者が、癌と関連付けられるＲａｓ変異を有するか否かを決定するために使用され、かつそのようにして癌を診断する。さらに、患者が癌にかかっていると思われる場合には、それから、異なる変異の同定又は少なくともＲａｓ変異と同定されないことと比較して、Ｒａｓ変異の同定は、患者の腫瘍がどれほど活動的であるかを臨床医に示し得、従って、より特異的な癌の診断を可能にする。上述のように、推測に縛られることなく、本発明者らは、Ｇ１２変異と一緒のＲａｓＥ７６変異の組み合わせの検出がより活動的な腫瘍の予報であり、かつ従って患者に対する予後判断が当該組み合わせのない患者よりも悪くなり得、及び／又は当該組み合わせを有する患者は、変異の当該組み合わせのない患者よりも積極的に処置され得ると考える。最後に、患者におけるＲａｓ変異又は変異の組み合わせの同定は、この特定の変異が細胞活性にどれだけの影響を与えるかという知識に基づいた、特定の癌の治療手順を発展させるために使用され得、かつまた、特定の種類の治療に対する患者の反応又は感受性を予測するために使用され得る。

【０１８９】

また、本発明は、本発明の診断方法を利用するキットを包含する。キットは、試験試料におけるＲａｓ（タンパク質）又はｒａｓ（核酸）変異の存在又は非存在の検出に有用なあらゆる試薬を好ましく含み、かつ生物マーカー（すなわち、変異したｒａｓ遺伝子、ＲＮＡ、ｃＤＮＡ、又はこれらにコードされるタンパク質）と結合する、オリゴヌクレオチドプローブ、ＰＣＲプライマー、又は抗体、抗原結合ペプチド、もしくはアプタマーを包含する。キットは、本明細書に想定される診断方法の実施に必要なあらゆる試薬を包含できる。また、キットは、他の癌生物マーカー（例えば、上述のＲａｓ変異、癌診断（本明細書に記載のＲａｓ変異と関連しない原因又は寄与を有する癌に対してさえも）に好適なあらゆる他の生物マーカー）の検出用の試薬を包含できる。試薬（例えば、プローブ、抗体、アプタマー）は、他の構成単位（例えば、マーカー）と接合され得るか、又は個体の担体（基材）に固定化され得る。１つの実施形態において、キットは、試験試料における細胞種の対照生物マーカーの特性を検出する試薬を含むことができる。試薬は、遊離形態、又は基材（例えば、プラスティックディッシュ、マイクロアレイプレート、試験管、及び試験棒（ｔｅｓｔｒｏｄ）など）に固定化された形態において存在し得る。また、キッ

トは、試薬の検出、及び／又は陽性対照もしくは陰性対照、洗浄溶液及び希釈緩衝液などの標識に好適な試薬を包含できる。また、キットは、キットの使用、及び結果の判断に関する一揃えの使用説明書を包含できる。１つの実施形態において、キットが構築されて、高速処理アッセイになる。

【０１９０】

より詳細には、本発明によれば、生物マーカーの存在、発現又は生物活性を検出する試薬は、本明細書において上述したＲａｓ生物マーカーの存在、発現又は生物活性の検出方法に使用され得るあらゆる好適な試薬であり得る。当該試薬としては、生物マーカー又はこれらの断片をコードする核酸に対してストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下においてハイブリダイズするプローブ；生物マーカー又はこれらの断片をコードする核酸の増幅用のプライマー；標的分子における立体配置的に区別可能な部位と特異的に結合する（すなわち、Ｅ７６変異を有するＲａｓ（Ｅ７６Ｇ、Ｅ７６Ｋ又はＥ７６Ｑといった特定のＥ７６変異が挙げられる）を、当該変異を有していないＲａｓと識別できる）アプタマー；及び／又は生物マーカーと選択的に結合する抗原、これらの抗原結合断片もしくは他の抗原結合ペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。また、試料におけるＲａｓタンパク質と選択的に結合する抗原（ポリクロナル抗体及びモノクロナル抗体、２価抗体及び１価の抗体、２重特異性抗体又は多重特異性抗体、当該抗体を包含する血清、種々の度合いに精製されている抗体、ならびに抗体全体のあらゆる機能的な等価物が挙げられるが、これらに限定されない）は、当該技術において利用可能な情報（上述されている）を用いて産生され得る。

【０１９１】

１つの実施形態において、採取される細胞種の特性を示す対照生物マーカーを検出する試薬は、一般的に、例えば、本明細書において上述されている生物マーカーの存在を検出する方法によって、試料における（核酸レベル又はタンパク質レベルにおける）公知のマーカーの存在を検出する方法に使用され得る試薬のあらゆる種類のものであり得る。特に試薬は、当該試薬が細胞種を明確に同定する、分析される細胞種の特異的なマーカーを特定する点において特徴付けられる。例えば、乳癌アッセイにおいて、生物マーカーの発現及び／又は生物活性のレベルに関して乳房の上皮細胞をスクリーニングすることが所望される。従って、対照マーカーを検出する試薬は、上皮細胞が線維芽細胞といった他の細胞種と区別されるように、上皮細胞、好ましくは乳房の上皮細胞の特性を示す、マーカーを特定する。当該試薬は、本発明のアッセイの正確さ及び特異性を増大させる。対照マーカーを検出する当該試薬としては、タンパク質マーカーをコードする核酸分子に対してストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下においてハイブリダイズするプローブ；当該核酸分子を増幅するＰＣＲプライマー；標的分子上の立体配置的に識別可能な部位と結合するアプタマー；及び／又は試料における対照マーカーと選択的に結合する抗体、これらの抗原結合断片、もしくは抗原結合ペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。多くの細胞マーカー用の核酸配列及びアミノ酸配列は、当該分野において公知であり、かつ検出用の当該試薬の産生に使用され得る。

【０１９２】

本発明のアッセイキットのＲａｓ生物マーカー及び／又は対照マーカーを検出する試薬は、検出可能なタグ又は検出可能な標識と接合され得る。当該タグは、生物マーカー又は対照マーカーの検出に使用される試薬の検出を可能にするあらゆる好適なタグであり得、かつ当該タグの例としては、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的又は化学的な手段によって検出可能なあらゆる組成物又は標識が挙げられるが、これらに限定されない。本発明において有用な標識としては、標識化ストレプトアビジン接合体を用いた染色用のビオチン、磁性ビーズ（例えば、ダイナビーズ（Ｄｙｎａｂｅａｄｓ）（商標）、蛍光染料（例えば、フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、及び緑色蛍光タンパク質など）、放射線標識（例えば、^{3}Ｈ、^{125}Ｉ、^{35}Ｓ、^{14}Ｃ、又は^{32}Ｐ）、酵素（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリンホスファターゼ及びＥＬＩＡにおいて通常に使用される他のもの）、コロイド金又は着色ガラスビーズ

又は着色プラスティック（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど）ビーズといった比色分析標識が挙げられる。

【０１９３】

さらに、本発明のアッセイキットの検出用の試薬は、基材上に固定化され得る。当該基材としては、上述した検出の方法のあらゆるものに使用されるような検出試薬の固定化に好適なあらゆる基材を挙げることができる。手短に言えば、検出試薬の固定化に好適な基材としては、所望の標的分子を検出するための検出試薬の活性及び能力に有為な影響を及ぼすことなく検出する試薬と結合を形成できる、あらゆる有機支持物、生体高分子支持物又は無機支持物といったあらゆる固体支持物が挙げられる。例示的な有機支持物としては、ポリスチレン、ナイロン、フェノール－ホルムアルデヒド樹脂、アクリル酸共重合体（例えば、ポリアクリルアミド）、固定した原型を保った細胞全体、及び固定した粗製の細胞全体／膜の均質化物といった高分子が挙げられる。例示的な生体高分子支持物としては、セルロース、ポリデキストラン（例えば、セファデックス（Ｓｅｐｈａｄｅｘ）（登録商標））、アガロース、コラーゲン、及びキチンが挙げられる。例示的な無機支持物としては、ガラスビーズ（多孔性及び非多孔性の）、ステンレス鋼、金属酸化物（例えば、ZrO_2、TiO_2、Al_2O_3、及びＮｉＯといった多孔性セラミックス）及び砂が挙げられる。

【０１９４】

（本発明のスクリーニング方法）

本発明の１つの実施形態は、変異Ｒａｓ遺伝子を保持しているか、又は本明細書に記載のＥ７６変異もしくは他のＲａｓ変異（例えば、Ｇ１２）とのＥ７６変異の組み合わせを有するＲａｓタンパク質を発現している患者を、癌から保護することに有用な化合物を同定する方法に関する。方法は、変異ｒａｓ遺伝子の発現を下方制御するか、その遺伝子産物の活性を阻害するか、又は変異Ｒａｓタンパク質の生物活性を逆転させるかもしくは補正する当該化合物（例えば、本明細書において特定される変異の存在にも関わらずＲａｓのＧＴＰ加水分解を誘発する化合物）の能力に基づいて、抗腫瘍治療薬としての活性を有する化学的化合物及び／又は生物学的化合物をスクリーニングし、かつ選択するアッセイおける標的として、ＲａｓＥ７６タンパク質もしくはペプチド、又は当該タンパク質もしくはペプチドをコードする核酸分子の使用を包含する。１つの実施形態において、方法は、Ｒａｓタンパク質もしくはペプチド、又は当該タンパク質もしくはペプチドをコードする核酸分子の標的としての使用を包含し、ここで、当該Ｒａｓタンパク質もしくはペプチドは、７３、７４、７５、７７もしくは７８位のあらゆる１つ以上の位置における変異、又は上述のＲａｓ変異のあらゆる組み合わせ、そして特に、５９、６１、７３、７４、７５、７６、７７、及び／又は７８位における変異との１２及び／又は１３位における変異のあらゆる組み合わせを有する。

【０１９５】

例えば、同定用の候補化合物としては、「恒常的な」Ｒａｓ活性が消失して、このために細胞増殖に関する無秩序なシグナルを抑制することによって、変異体Ｒａｓにおいて結合したＧＴＰが変異の存在にも関わらずＧＤＰに加水分解されるように、ＧＴＰ活性を誘引する化合物が挙げられる。標的を阻害することに対する本明細書における言及は、標的遺伝子の発現を阻害すること、ならびにその対応発現産物（タンパク質）の翻訳及び／又は活性を阻害することの、１つ又は両方を指すことができる。また、標的の生物活性を修飾する化合物（例えば、本発明の変異Ｒａｓの加水分解を誘引するか、又は起こす上述の化合物）は、同定の方法によって包含される。当該化合物は、本明細書において治療化合物と呼ばれ得る。

【０１９６】

１つの実施形態において、同定されるべき化合物としては、Ｒａｓ－ＧＡＰを制御するか、適合させるか、又は模倣する化合物が挙げられ、ここで、制御されたか、適合したか、又は模倣された化合物は、本明細書に記載される変異Ｒａｓタンパク質（例えば、ＲａｓＥ７６変異体、あらゆるＲａｓ　７３－７８変異体、又は本明細書に記載の変異体の組

み合わせのあらゆるもの）のあらゆるものと関連するＧＴＰの加水分解を可能にするが、野生型Ｒａｓと関連するＧＴＰの加水分解を可能にしない能力を有する。この局面において、本明細書に記載の新規な変異が使用されて、本明細書に記載の１つ以上のＲａｓ変異を内部に有する細胞（例えば、腫瘍細胞）におけるＲａｓＧＴＰ加水分解経路の機能を回復させて、従って当該細胞の無秩序な増殖及び転移を停止させることができると同時に、「正常な」細胞（非癌性細胞）のみを放置できる化合物を同定できる。当該戦略は、腫瘍細胞を標的化するが、非腫瘍細胞におけるＲａｓの正常な細胞機能を妨害することによって問題を引き起こさない化合物の同定を可能にする。この実施形態において、変異Ｒａｓ標的を（天然に又は組み換え法によって）発現する細胞に対してＧＴＰ加水分解を回復させるが、非変異（野生型）Ｒａｓを発現する細胞におけるＧＴＰ加水分解を引き起こさない、化合物を選択することによって同定される。

【０１９７】

この実施形態の１つの局面において、治療化合物は、本発明の標的タンパク質（又は天然にもしくは組み換え的に当該タンパク質を発現する細胞）を候補化合物にさらすこと、ならびに当該化合物が当該タンパク質の生物活性を阻害する（弱める、減少させる、妨害する）能力を測定することによって同定される。１つの実施形態において、候補化合物は、ＧＴＰ加水分解を起こすか又は誘引し、かつ本発明の変異体Ｒａｓの存在に対して効率的に優先するか又は補正する能力によって同定される。ＧＴＰ加水分解及びＧＴＰａｓｅ活性を測定する方法は、当該分野において公知である。

【０１９８】

この実施形態の他の局面において、変異ｒａｓ遺伝子を天然に発現するか、又は当該遺伝子もしくは変異Ｒａｓタンパク質をコードする他の組み換え核酸分子を用いてトランスフェクトされている細胞株は、種々の化合物（また、候補化合物、試験化合物、又は推定上の調節性化合物とも呼ばれる）とともに培養される。ｒａｓ遺伝子の発現の低減、又はそのコードされる産物の活性の修飾は、治療化合物の同定に使用され得る。例えば、変異体Ｒａｓを発現する細胞を候補化合物と接触させ、かつ上述のようなＧＴＰａｓｅ活性を誘発する化合物を同定できる。当該化合物は、内因性のＲａｓ－ＧＡＰがＲａｓ変異によってＲａｓに対する結合を遮断されている条件下においてＲａｓに結合し、かつＧＴＰａｓｅを活性化するそれらの能力、及び／又は及び／又は加水分解が起こされているときにＲａｓＧＴＰからγ－ホスファターゼの放出を可能にし得る能力によって同定される。言い換えると、アッセイは、Ｒａｓ変異又は変異の組み合わせの影響を克服する化合物を検出することを試みる。代替可能に、種々の類似の無細胞アッセイは、当該治療化合物を同定するために使用され得る。それから、この様式において同定された治療化合物は、必要に応じて、これらの活性を確認するための他のアッセイにおいて再試験され得る。好ましくは、野生型のＲａｓを発現する（変異Ｒａｓを発現しない）細胞におけるＧＴＰ加水分解をもまた引き起こさない化合物が、選択される。

【０１９９】

本発明の１つの実施形態において、無秩序な細胞成長の阻害剤は、試験化合物に対して標的遺伝子又はこれらの断片（すなわち、変異Ｅ７６Ｇｒａｓ遺伝子）をさらすこと；標的（Ｅ７６Ｇ　ｒａｓ）の発現を測定すること；ならびに標的の発現を下方制御する（弱める、減少させる、妨害する）か、又は標的の活性を修飾する化合物を選択することによって、同定される。例えば、推定上の阻害剤は、標的遺伝子を（内因的又は組み換え的に）発現する細胞に対してさらされ得る。アッセイへの使用に好ましい細胞としては、標的遺伝子を発現するか、又は標的遺伝子の組み換え体（例えば、標的タンパク質又はこれらの断片をコードする核酸配列を備える組み換え核酸分子）を用いて形質転換されている哺乳類細胞が挙げられる。遺伝子の発現レベルを決定する方法は、当該分野において公知である。遺伝子の発現、又はこれらにコードされるタンパク質の生物活性を阻害する核酸分子を設計し、かつ同定する方法は、当該分野において公知である。

【０２００】

本発明の１つの実施形態において、治療化合物は、候補化合物に対して標的（例えば、

Ｅ７６ＧＲａｓ－ＧＴＰ）をさらすこと；標的に対する候補化合物の結合を測定すること；ならびに所望の濃度、アフィニティー、又はアビディティーにおいて標的と結合する化合物を選択することによって同定される。好ましい実施形態において、アッセイは、標的に対する化合物の相互作用又は結合の促進につながる条件下において実施される。当業者は、アッセイに使用される標的及び化合物に基づいて当該条件を決定できる。１つの実施形態において、ＢＩＡｃｏｒｅ機械が使用されて、標的タンパク質（標的遺伝子によってコードされるタンパク質）と天然リガンドとの間における候補化合物の存在下又は非存在下における複合体の結合定数を決定できる。例えば、標的タンパク質又はこれらのリガンド結合断片は、基材上に固定化され得る。天然リガンド又は合成リガンドが基材と接触させられて複合体を形成する。複合体に関する解離定数は、緩衝液がチップ上を通過するときの時間に関する屈折率の変化を監視することによって決定され得る（O'Shannessy et al. Anal. Biochem. 212:457-468 (1993); Schuster et al., Nature 365:343-347 (1993)）。複合体と種々の濃度における候補化合物を接触させること及び反応関数（例えば、時間に関する屈折率の変化）を監視することは、複合体の解離定数が試験化合物の存在下において決定されることを可能にし、かつ候補化合物が複合体の阻害剤又はアゴニストであるか否かを示す。代替可能に、候補化合物は、固定化された標的と同時にリガンドとして接触されて、標的タンパク質に対するリガンドの結合を阻害するか、又は安定化する場合を予想できる。

【０２０１】

本発明の方法においてスクリーニングされるべき化合物としては、公知の有機化合物（例えば、ペプチドライブラリの産物、核酸分子の産物（例えば、ＲＮＡｉ、リボソーム、アプタマー、アンチセンス）、抗体の産物、及び化合的ライブラリの産物）が挙げられる。また、化合物は、遺伝子の産物の単独又は他の構成要素（例えば、ＧＴＰと複合体化された変異Ｒａｓ）と複合体の構造に依存した合理的な薬物設計を使用して同定され得る。当該方法は、当業者に公知であり、かつ３次元画像化ソフトウェアプログラムの利用を含む。図４は、例えば、２つの公知のＲａｓ変異の結果としてＲａｓに生じる３次元立体配置の変化を説明する。本発明に有用な模倣物又は他の治療化合物の設計又は選択に有用な薬物設計の種々の方法は、引用によってその全体が本明細書に組み込まれるMaulik et al., 1997, Molecular Biotechnology: Therapeutic Applications and Strategies, Wiley-Liss, Inc.に開示されている。

【０２０２】

本明細書において使用されるとき、用語「試験化合物」、「推定上の阻害化合物」又は「推定上の制御化合物」は、特定の過程における未知の制御活性、又は真価が認められていない制御活性を有する化合物を指す。従って、化合物を同定するための方法に関して用語「同定する」は、すべての化合物を含めて、その内の細胞成長を阻害することを目的として制御化合物の有用性が本発明の方法によって決定されていることを意図される。

【０２０３】

本発明の細胞、細胞溶解物、核酸分子又はタンパク質が推定上の制御化合物と、例えば混合することによってさらされるか、又は接触される条件は、あらゆる好適な培養条件又はアッセイ条件である。細胞に基づくアッセイの場合において、条件としては、推定上の制御化合物の存在下及び非存在下において、細胞が培養され得るか、又は細胞溶解物が評価され得る、有効な培地が挙げられる。本発明の細胞は、種々の容器（組織培養フラスコ、試験管、マイクロタイターディッシュ、及びペトリ皿が挙げられるが、これらに限定されない）において培養され得る。培養は、細胞にとって好適な温度、ｐＨ及び二酸化炭素の含有量において実施される。また、当該培養条件は、当業者の範囲内である。細胞は、容器毎に接触された細胞の数、細胞に投与された推定上の制御化合物の濃度、細胞と推定上の制御化合物の培養時間、及び細胞に投与された化合物の濃度を考慮した条件下において推定上の制御化合物と接触させられる。有効な手順の決定は、容器の大きさ、容器における液体の体積、アッセイに使用される特定の細胞種の培養に好適な公知の条件、及び試験される推定上の制御化合物の化学的な資性（すなわち、大きさ、電荷など）といった変

量に基づいて当業者によって達成され得る。推定上の制御化合物の好ましい量は、９６ウェルプレートのウェル毎に約１ｎＭから約１０ｍＭの間の推定上の制御化合物を包含できる。

【０２０４】

本明細書において使用されるときに、本発明の標的の発現を検出することに関して使用される場合の用語「発現」は、標的遺伝子の転写を検出すること、及び／又は標的遺伝子にコードされる標的タンパク質の翻訳と検出することを指し得る。標的の発現を検出することは、標的が発現されるか又は発現されないかを積極的に決定する行為を指す。これは、標的発現が、対象と比べて上方制御されるか、対象と比べて下方制御されるか、又は対照と比べて変化を受けないかのいずれかの決定を包含できる。従って、発現の検出の段階は、標的の発現が実際に上方制御されるか又は下方制御されることを要求していないが、むしろまた標的発現が変化していないことの検出（すなわち、標的の発現がないこと、又は標的の発現に変化がないことの検出）を包含できる。転写物及び／又はタンパク質の発現は、当該分野に公知のあらゆる種々の方法によって測定される。ＲＮＡ発現に関する方法としては、細胞のｍＲＮＡの抽出及び本発明の１つ以上の遺伝子のすべて又は一部をコードする転写物とハイブリダイズする標識プローブを用いたノザンブロッティング；遺伝子特異的プライマー、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、及び逆転写酵素連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）を用いた、本発明の１つ以上の遺伝子から発現されたｍＲＮＡの増幅、これに続く種々の手段のあらゆるものによる産物の定量的検出；後に標識され、かつ本発明の遺伝子をコードするｃＤＮＡもしくはオリゴヌクレオチドを調べるために使用され、あらゆる種々の表面上に配列される細胞由来の総ＲＮＡの抽出；インサイチュハイブリダイゼーション；ならびにレポータ遺伝子の検出が挙げられるが、これらに限定されない。遺伝子の転写レベルを定量化する状況において使用される場合の用語「定量（ｑｕａｎｔｉｆｙｉｎｇ）」又は「定量化（ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｎｇ）」は、絶対的又は相対的な定量化を指すことができる。絶対的な定量化は、１つ以上の標的核酸の既知の濃度の算入及び既知の標的核酸に対する未知物のハイブリダイゼーション強度の参照（例えば、検量線の生成を介して）によって達成され得る。代替的に、相対的な定量化は、２つ以上の遺伝子の間、又はハイブリダイゼーション強度の変化を定量化するための２つ以上の処置におけるハイブリダイゼーションシグナルの比較によって、及び転写レベルの関連付けによって達成され得る。

【０２０５】

好ましい実施形態において、標的遺伝子の発現は、ポリメラーゼ連鎖反応によって測定される。他の実施形態において、標的遺伝子の発現は、ポリアクリルアミドゲル分析、クロマトグラフィー又は分光法を用いて測定される。

【０２０６】

他の好ましい実施形態において、標的遺伝子の発現は、コードされたタンパク質の産生を測定すること（タンパク質の翻訳を測定すること）によって測定される。タンパク質の翻訳の測定は、細胞又は細胞抽出物に由来するタンパク質を検出、及び／又は測定に好適なあらゆる方法を包含する。当該方法としては、免疫ブロット（例えば、ウエスタンブロット）、酵素結合免疫吸着検定（ＥＬＩＳＡ）、放射免疫検定（ＲＩＡ）、免疫沈降、免疫組織化学、免疫蛍光法、蛍光標示式細胞分取法（ＦＡＣＳ）及び免疫蛍光顕微鏡法が挙げられるが、これらに限定されない。タンパク質の検出に特に好ましい方法としては、あらゆる単一の細胞アッセイ（免疫組織化学及び免疫蛍光アッセイを含む）が挙げられる。例えば、検出試薬（例えば、遺伝子によってコードされるタンパク質を特異的に認識する（と選択的に結合する）抗体）を使用できる。当該方法は、当該分野に公知である。

【０２０７】

上述の方法によって同定されたか又は設計された候補化合物は、当該分野に公知の方法を用い、かつ化合物の種類に応じて合成され得る。非タンパク質化合物（有機化合物及び無機化合物が挙げられる）の産生に関する合成は、当該分野において公知である。例えば、より小さいペプチドに対しては、化学的合成法が好ましい。例えば、当該方法としては

、公知の化学的手法（例えば、液相もしくは固相ペプチド合成、又は従来の溶液法を介して連結されたタンパク質断片から始める溶液における半合成）が挙げられる。当該方法は、当該分野において公知であり、かつ当該領域における一般的な教科書及び論文（例えば、これらの全てが引用によって本明細書に組み込まれる、Merrifield, 1997, Methods Enzymol. 289:3-13; Wade et al., 1993, Australas Biotechnol. 3(6):332-336; Wong et al., 1991, Experientia 47(11-12):1123-1129; Carey et al., 1991, Ciba Found Symp. 158:187-203; Plaue et al., 1990, Biologicals 18(3):147-157; Bodanszky, 1985, Int. J. Pept. Protein Res. 25(5):449-474;又はH. Dugas and C. Penney, BIOORGANIC CHEMISTRY, (1981) at pages 54-92）に見られ得る。例えば、ペプチドは、市販のペプチド合成機を利用した固相方法論、及び製造業者によって供給される合成サイクルによって合成され得る。当業者は、固相合成がまた、ＦＭＯＣ戦略及びＴＦＡ／補足剤切断混合物を用いて達成され得ることを認識する。また、タンパク質又はペプチドである化合物は、特に大量のタンパク質が所望される場合には、当該分野において標準的な組み換えＤＮＡ技術及び方法を用いて産生され得る。

【０２０８】

これらの方法によって同定されたあらゆる化合物は、癌の処置もしくは予防に関する薬物の調整、又は本明細書に記載の他の方法もしくは利用に用いられ得る。

以下の実験結果は、説明を目的として示されており、かつ本発明の範囲を制限することを意図されない。

【０２０９】

〔実施例〕

（実施例１）

以下の例は、変異Ｒａｓタンパク質を発現する完全な熱殺害した酵母（タルモゲン（Ｔａｒｍｏｇｅｎ））の第１相の免疫療法試験の間に評価された、腫瘍における新しいＲａｓ変異の同定について説明する。

【０２１０】

（材料及び方法（実施例１及び２において使用される））

患者

膵臓癌、直腸結腸癌又は非小細胞肺癌の１４９人の患者は、変異Ｒａｓタンパク質を発現する完全な熱殺害した酵母（タルモゲン）の第１相試験（ＧｌｏｂｅＩｍｍｕｎｅ，Ｉｎｃ．）に加えられた。患者の腫瘍の生検試料は、遺伝子型を特定されて、免疫療法試験に加えられるべき産物関連変異を有する対象を特定した。

【０２１１】

組織試料及びゲノムＤＮＡの単離

各患者の腫瘍試料は、パラフィン包埋塊又はパラフィン塊から切り出した切片を乗せたスライドのいずれかとして入手された。腫瘍細胞は、染色した（ＨｉｓｔｏＧｅｎｅＳｔａｉｎｉｎｇ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ，Ａｒｃｔｕｒｕｓ，ＣＡ）厚さ６－８μｍの切片からのＬＣＭ（レーザ捕捉顕微鏡）下又は顕微鏡下のメス掻き取り（ｓｃａｌｐｅｌｓｃｒａｐｉｎｇ）によって単離され、それから単離されたこれらの腫瘍細胞に由来するゲノムＤＮＡは、ＳＤＳ－プロテインキナーゼＫ処理及びＲＮａｓｅ Ａ消化、これに続くイソプロパノール沈殿によって抽出された。

【０２１２】

ＰＣＲ及びｒａｓ配列決定

ネステッドＰＣＲが、プラチナＴａｑ ＤＮＡポリメラーゼ ハイフィデリティーキット（Ｉｎｖｉｔｏｒｇｅｎ，ＣＡ）を用いてＫ－、Ｎ－、及びＨ－ｒａｓ遺伝子のエキソン２及び３に対して実施された。２５μＬの外部ＰＣＲ反応混合物は、１００ｎｇの鋳型ＤＮＡ、１×ＰＣＲ緩衝液、５０－１００ｐｍｏｌのＭｇＳＯ４、５ｎｍｏｌのｄＮＴＰｓ、１０ｐｍｏｌの外部プライマー及び２．５ユニットの高忠実度のＴａｑＤＮＡポリメラーゼを含む。熱サイクルは、９４℃において５分間の変性に始められて、９４℃において３０秒間、５５℃において３０秒間、及び６８℃において５０秒間の３段階を３５サイ

クル、そして６８℃における１０分間の最後のインキュベーションに続いた。内部ＰＣＲ反応は、鋳型としての１μＬの外部ＰＣＲ産物及び２０ｐｍｏｌの内部プライマーのそれぞれを有する総量が５０μＬの混合物において実施された。以下のプライマー：
Ｋ－ｒａｓエキソン２外部順方向プライマー
５′－ＡＧＧＴＧＡＧＴＴＴＧＴＡＴＴＡＡＡＡＧ－３′（配列番号１６）；
Ｋ－ｒａｓエキソン２外部逆方向プライマー
５′－ＴＣＡＴＧＡＡＡＡＴＧＧＴＣＡＧＡＧ－３′（配列番号１７）；
Ｋ－ｒａｓエキソン２内部順方向プライマー
５′－ＴＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧＧＧＴＧＴＧＴＧＡＣＡＴＧＴＴＣＴＡＡＴ－３′（配列番号１８）；
Ｋ－ｒａｓエキソン２内部逆方向プライマー
５′－ＡＴＴＴＡＧＧＴＧＡＣＡＣＴＡＴＡＧＡＡＧＡＡＴＧＧＴＣＣＴＧＣＡＣＣＡＧＴＡＡ－３′（配列番号１９）；
Ｋ－ｒａｓエキソン３外部順方向プライマー
５′－ＴＧＡＧＴＴＧＴＡＴＡＴＡＡＣＡＣＣ－３′（配列番号２０）；
Ｋ－ｒａｓエキソン３外部逆方向プライマー
５′－ＧＧＣＡＴＴＡＧＣＡＡＡＧＡＣＴＣＡ－３′（配列番号２１）；
Ｋ－ｒａｓエキソン３内部順方向プライマー
５′－ＴＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧＧＧＴＧＣＡＣＴＧＴＡＡＴＡＡＴＣＣＡＧ－３′（配列番号２２）；
Ｋ－ｒａｓエキソン３内部逆方向プライマー
５′－ＡＴＴＴＡＧＧＴＧＡＣＡＣＴＡＴＡＧＡＡＡＴＴＡＣＴＣＣＴＴＡＡＴＧＴＣＡＧＣ－３′（配列番号２３）；
Ｎ－ｒａｓエキソン２外部順方向プライマー
５′－ＡＴＧＧＡＡＧＧＴＣＡＣＡＣＴＡＧＧＧ－３′（配列番号２４）；
Ｎ－ｒａｓエキソン２外部逆方向プライマー
５′－ＡＡＧＡＴＧＡＴＣＣＧＡＣＡＡＧＴＧ－３′（配列番号２５）；
Ｎ－ｒａｓエキソン２内部順方向プライマー
５′－ＴＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧＧＧＡＧＴＡＣＴＧＴＡＧＡＴＧＴＧＧＣＴＣＧ－３′（配列番号２６）；
Ｎ－ｒａｓエキソン２内部逆方向プライマー
５′－ＡＴＴＴＡＧＧＴＧＡＣＡＣＴＡＴＡＧＡＡＧＡＧＡＣＡＧＧＡＴＣＡＧＧＴＣＡＧＣＧ－３′（配列番号２７）；
Ｎ－ｒａｓエキソン３外部順方向プライマー
５′－ＴＧＧＣＡＡＴＡＧＣＡＴＴＧＣＡＴＴＣ－３′（配列番号２８）；
Ｎ－ｒａｓエキソン３外部逆方向プライマー
５′－ＧＧＴＡＡＣＣＴＣＡＴＴＴＣＣＣＣＡ－３′（配列番号２９）；
Ｎ－ｒａｓエキソン３内部順方向プライマー
５′－ＴＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧＧＧＴＴＧＡＡＣＴＴＣＣＣＴＣＣＣＴＣＣＣＴＧ－３′（配列番号３０）；
Ｎ－ｒａｓエキソン３内部逆方向プライマー
５′－ＡＴＴＴＡＧＧＴＧＡＣＡＣＴＡＴＡＧＡＡＴＴＣＡＧＡＡＣＡＣＡＡＡＧＡＴＣＡ－３′（配列番号３１）；
Ｈ－ｒａｓエキソン２外部順方向プライマー
５′－ＴＴＧＧＣＡＧＧＴＧＧＧＧＣＡＧＧＡＧＡ－３′（配列番号３２）、
Ｈ－ｒａｓエキソン２外部逆方向プライマー
５′－ＣＣＴＡＴＣＣＴＧＧＣＴＧＴＧＴＣＣ－３′（配列番号３３）、
Ｈ－ｒａｓエキソン２内部順方向プライマー
５′－ＴＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧＧＧＡＧＧＡＧＡＣＣＣＴＧＴＡＧＧＡＧ－３′（配列番号３４）、

Ｈ－ｒａｓエキソン２内部逆方向プライマー
５′－ＡＴＴＴＡＧＧＴＧＡＣＡＣＴＡＴＡＧＡＡＣＴＣＧＣＣＣＧＣＡＧＣＡＧＣＴＧＣ－３′（配列番号３５）、
Ｈ－ｒａｓエキソン３外部順方向プライマー
５′－ＡＣＣＡＧＧＧＡＧＡＧＧＣＴＧＧＣ－３′（配列番号３６）、
Ｈ－ｒａｓエキソン３外部逆方向プライマー
５′－ＣＴＣＣＣＧＧＧＣＣＡＧＣＣＴＣＡＣ－３′（配列番号３７）、
Ｈ－ｒａｓエキソン３内部順方向プライマー
５′ＴＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧＧＧＴＧＡＡＣＴＣＣＣＣＣＣＡＣＧＧＡＡＧＧ－３′（配列番号３８）、及び
Ｈ－ｒａｓエキソン３内部逆方向プライマー
５′－ＡＴＴＴＡＧＧＴＧＡＣＡＣＴＡＴＡＧＡＡＧＴＴＣＡＣＣＴＧＴＡＣＴＧＧＴＧＧＡ－３′（配列番号３９）
が使用された。

【０２１３】

すべての順方向内部プライマーは、５′末端にＴ７プライマー配列を用いて補われ、かつすべての逆方向内部プライマーは、５′末端にＳＰ６プライマー配列を用いて補われた。内部ＰＣＲ産物は、１．５％アガロースを通した電気泳動の後に、ＱＩＡクイックゲル抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ，　ＣＡ）を用いて精製された。精製ＤＮＡは、Ｔ７プライマー及びＳＰ６プライマーを用いた標準的な配列決定のためにコロラド大学癌センターＤＮＡ配列決定及び分析コア（ＣＵＣａｎｃｅｒ　Ｃｅｎｔｅｒ　ＤＮＡ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　＆　Ａｎａｌｙｓｉｓ　Ｃｏｒｅ）に送られた。

【０２１４】

マウスＫ－ｒａｓ遺伝子発現ベクターの構築
全体のＲＮＡは、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎが提供しているトゥリゾール（Ｔｒｉｚｏｌ）試薬（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，ＣＡ）を用いて、Ｅ９マウス肺上皮細胞株から単離された。マウスＫ－ｒａｓ遺伝子のｃＤＮＡは、ｍ－ｋｒａｓ逆方向プライマー：５′－ＧＣＴＣＧＧＣＴＧＣＧＧＣＣＧＣＴＣＡＣＴＡＣＡＴＡＡＣＴＧＴＡＣＡＣＣＴＴＧＴＣＣＴ－３′（配列番号４０）及びスーパースクリプト（ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ）（商標）ＩＩリバーストランスクリプターゼ（Ｒｉｖｅｒｓｅ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔａｓｅ）キット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，ＣＡ）を用いて、製造者の使用説明書に従って、２．５μｇの全体のＲＮＡから逆転写された。反応させた１０分の１量は、マウスＫ－ｒａｓｃＤＮＡのコード領域の全体を網羅するために設計されている、ｍ－ｋｒａｓ順方向プライマー：５′－ＧＧＡＡＴＴＣＡＣＣＡＴＧＧＧＣＡＣＴＧＡＧＴＡＴＡＡＡＣＴＴＧＴＧＧＴＧ－３′及びｍ－ｋｒａｓ逆方向プライマーを用いて、続いて増幅された。熱サイクルは、９４℃において５分間のインキュベーションに始められて、９４℃において２５秒間、５５℃において２５秒間、及び６８℃において３０秒間の３段階の３５サイクルが引き続いた。ＰＣＲ産物は、製造者の使用説明書に従って、ｐＧＥＭ－Ｔベクター（Ｐｒｏｍｅｇａ，ＷＩ）にクローン化された。このマウスｋ－ｒａｓ遺伝子は、Ｑ６１Ｒ変異を含んでおり、その後に野生型マウスｋ－ｒａｓならびにＧ１２Ｖ、Ｅ７６Ｇ、Ｅ７６Ｋ及びＧ１２ＶＥ７６Ｇの変異を含むマウスｋ－ｒａｓは、部位特異的変異生成によって作製され、かつ哺乳類発言ベクターのＥｃｏＲＩ及びＮｏｔＩ部位にクローン化された。ｍ－ｋｒａｓ順方向プライマー、ｍ－ｋｒａｓ逆方向プライマー、及び以下のプライマー：ｒａｓＱ６１５′－ＴＡＣＴＣＣＴＣＴＴＧＡＣＣＴＧＣＴＧＴ－３′（配列番号４２）；ｒａｓＧ７６５′－ＡＡＧＡＡＡＧＣＣＣＣＣＣＣＣＡＧＴＴＣＴＣ－３′（配列番号４３）；ｒａｓＶ１２５′ＡＣＧＧＡＡＴＴＣＡＣＣＡＴＧＡＣＴＧＡＧＴＡＴＡＡＡＣＴＴＧＴＧＧＴＧＧＴＴＧＧＡＧＣＴＧＴＴＧＧＣＧＴＡＧ－３′（配列番号４４）；ｒａｓＫ７６５′－ＡＡＧＡＡＡＧＣＣＣＴＴＣＣＣＡＧＴＴＣＴＣ－３′（配列番号４５）が使用された。

【０２１５】

細胞培養及びトランスフェクション

ＢＡＬＢ３Ｔ３細胞は、１０％の新生子牛の血清、５０ユニット（Ｕ）／ｍｌのペニシリン、及び５０μｇ／ｍｌのストレプトマイシンを含むＤＭＥＭにおいて培養された。ＷＴ、Ｇ１２Ｖ、Ｅ７６Ｇ、Ｅ７６Ｋ、及びＧ１２Ｖ＋Ｅ７６Ｇのｋ－ｒａｓ発現プラスミドは、エフェクテン（Ｅｆｆｅｃｔｅｎｅ）トランスフェクション試薬キット（Ｑｉａｇｅｎ，ＣＡ）を用いてＢＡＬＢ３Ｔ３細胞にトランスフェクトされた。トランスフェクトされた細胞は、Ｇ４１８を用いて選択され、かつ培養プレートから（野生型）、又は軟寒天から（Ｇ１２Ｖ、Ｅ７６Ｇ、Ｅ７６Ｋ、及びＧ１２＋Ｅ７６Ｇ）からクローンを選択することによって精製された。トランスフェクトされた野生型のＫ－ｒａｓ遺伝子（ＷＴ）又は変異Ｋ－ｒａｓ遺伝子の発現は、ＲＴ－ＰＣＲ及びｒａｓタンパク質の免疫ブロットによって確認された。ＲＮＡの全体は、トランスフェクトされた細胞クローンのそれぞれから、トゥリゾール試薬を用いて単離され、かつｒａｓ遺伝子のｓＤＮＡは、スーパースクリプト（商標）ＩＩＩリバーストランスクリプターゼキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，ＣＡ）及びｍ－ｋｒａｓ逆方向プライマーを用いて逆増幅され、それから、外因性のｒａｓ遺伝子は、ｍ－ｋｒａｓ逆方向プライマー及びｐＵＰベクターのプロモータにおける順方向プライマー５′－ＴＴＧＧＧＴＣＧＣＧＧＴＴＣＴＴＧＴ－３′（配列番号４６）を用いたＰＣＲによって増幅された。タンパク質の全体は、ＲＩＰＡ溶解緩衝液（Ｕｐｓｔａｔｅ，ＮＹ）を用いて、トランスフェクトされた細胞のそれぞれから抽出され、かつタンパク質は、１２％のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，ＣＡ）において分離され、続いてニトロセルロース膜に転写され、かつ抗Ｒａｓ抗体（Ｏｎｃｏｇｅｎ，ＭＡ）及び抗ＧＡＰＤＨ抗体（Ａｂｃａｍ，ＭＡ）のそれぞれを用いてブロットされた。

【０２１６】

軟寒天アッセイ

5×10^{4}の細胞は、１０％の新生子牛の血清（ＮＢＣＳ）を含む０．５％の低融点アガロース（ＳｅａＰｌａｑｕｅａｇａｒｏｓｅ，Ｃａｍｂｒｅｓ ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅ Ｒｏｃｋｌａｎｄ Ｉｎｃ，ｍｅ）層である底の上に被せられた、０．３５％の低融点アガロース及び１０％のＮＢＣＳを含むＤＭＥＭにおいて懸濁された。２－４週間の増殖の後に、コロニーが観察されるか、又は１０％のＮＢＣＳを含む液体ＤＭＥＭ培地において選択された。

【０２１７】

腫瘍形成能アッセイ

トランスフェクトされたクローンのそれぞれは、増殖され、回収され、かつＰＢＳに懸濁された。

【０２１８】

5×10^{6}の細胞は、４－６週齢のＢａｂ／ｃヌードマウスに、皮下的に注入された。注入された細胞は、３０日の期間に渡って２回の監視を受け、腫瘍が測定され、かつ腫瘍の体積が３．１４２×（長さ）×（幅）^{2}／６として計算された。

【０２１９】

（結果）

この研究において、Ｋ－、Ｎ－及びＨ－ｒａｓＤＮＡ配列は、変異Ｒａｓタンパク質を発現する完全な熱殺害した酵母（タルモゲン）の第１相の免疫療法試験において、膵臓癌（６８％が変異を含む）、直腸結腸癌（４０％が変異を有する）又はＮＳＣＬＣ癌（９％が変異を有する）にかかっている１４９の被験者の腫瘍に由来するネステッドＰＣＲ増幅及び直接配列決定によって、腫瘍関連変異の存在に関して性質決定された。コドン７６における新たなｒａｓ変異は、２４の被験者において３種の癌から検出された（Ｅ７６Ｇが２２であると同時にＥ７６Ｋ変異又はＥ７６Ｑ変異を包含する腫瘍がそれぞれ１つであった）。Ｅ７６に加えてコドン１２又は１３における変異の組み合わせは、８の腫瘍において同定された。表１及び表２及び図１を参照すればよい。

【０２２０】

【表１】

表1. コドン76における変異の概略

	直腸結腸(85)			肺(33)			膵臓(31)			合計
	K-ras	N-ras	H-ras	K-ras	N-ras	H-ras	K-ras	N-ras	H-ras	
E76G	2*		3*	3		1	2			
予想 E76G#	5		1			1	4		1	
E76K		1								
E76Q	1									
合計	8 *	1	4 *	3	0	2	6	0	1	24

*1つの試料はK及びH-rasにE76Gを有し、#生検試料における癌細胞の存在量が少ないことにおそらく起因して、検出されたE76変異に対して弱いシグナルを有する。

【０２２１】

【表２】

表2. ras変異のホットスポット(コドン12,13及び61)の概要

癌の種類	#癌毎に選別された試料	#ras変異を有する対象(癌毎の%)	変異															
			コドン12							コドン13		コドン61						
			合計	G12V	G12C	G12D	G12R	G12S	G12A	合計	G13D	合計	Q61R	Q61L	Q61H	Q61P
直腸結腸	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
膵臓	31	21 (67.7%)	19 (95%)	6	0	10	3	0	0	0	0	2	1	0	1	0
合計	149	58 (38.9%)	50 (86.2%)	17	6	20	3	3	2	3	3	5	1	1	2	1

（実施例２）

以下の実施例は、Ｒａｓ　Ｅ７６変異が形質転換させていること、そしてさらにＲａｓＥ７６変異がＲａｓ　Ｇ１２変異と共同して腫瘍の発癌性を増強することを証明している。

【０２２２】

ＲａｓのＥ７６Ｇ変異及びＥ７６Ｋ変異は、非臨床研究において形質転換として確認された。特に興味深いことに、コドン７６変異及びコドン１２変異の連関が結果として腫瘍増殖の相乗作用を生じた。Ｇ１２Ｖ、Ｅ７６Ｇ及びＥ７６Ｋの単独の変異、又は２重のＧ

１２Ｖ－Ｅ７６Ｇ変異は、マウスＫ－ｒａｓ遺伝子に導入され、かつそれからＢＡＬＢ／３Ｔ３線維芽細胞にトランスフェクトされた。Ｇ１２Ｖもしくは Ｅ７６Ｋの単独、又はＧ１２Ｖ－Ｅ７６Ｇの２重変異を内部に有するｒａｓを用いてトランスフェクトされた細胞は、軟寒天おいてコロニーを形成した（図２Ａ及びｓＢＧ及び表３を参照すればよい）。

【０２２３】

【表３】

表3. 形質転換変異としてのE76

クローン（K-ras遺伝子型をトランスフェクトしたBALB/3T3細胞）	トランスフェクトしたras遺伝子のmRNA転写（RT-PCRによる）	外来性のRasタンパク質発現（ウエスタンブロッティング）	軟寒天におけるコロニー形成
野生型(WT)	+	+	-
G12V	+	+	++++
G12V＋E76G	+	+	+++++
E76G	+	+	-
E76K	+	+	++
pUP(空ベクター)	-	-	-
Balb3T3(トランスフェクトしていない)	-	-	-

野生型遺伝子又は変異Ｋ－ｒａｓ遺伝子を用いてトランスフェクトされたＢＬＡＢ／３Ｔ３細胞は、ＢＡＬＢ／ｃヌードマウスに皮下的に（ｓ．ｃ．）注入された。図３Ａ及び３Ｂは、アッセイの再現である。細長い線は、１群毎における３匹のマウスの標準偏差を示している。図３Ｃは、トランスフェクトしなかった（野生型の）ＢＡＬＢ／３Ｔ３細胞に対して相対的な、Ｅ７６変異体をトランスフェクトした細胞の増殖を示すための、図３Ａに示される研究の拡張された詳細である。

【０２２４】

Ｋ－ＲａｓにおいてＥ７６Ｇ又はＥ７６Ｋ変異を単独に有する細胞は、結果として、野生型のＫ－ｒａｓを用いてトランスフェクトされた細胞と比べて、ヌードマウスにおいて検出可能な増殖を生じたが、Ｅ７６変異を単独に有する腫瘍増殖は、Ｇ１２Ｖ変異Ｋ－Ｒａｓを発現する細胞よりも有為に低かった（図３Ｃを参照すればよい）。Ｇ１２Ｖ＋Ｅ７６Ｇの２重のＲａｓ変異を含むＲａｓを用いてトランスフェクトされた細胞は、あらゆる単独の変異を有する細胞と比較して増進された腫瘍増殖に導いた（図３Ａ－Ｃを参照すればよい）。

【０２２５】

（実施例３）

以下の実験は、Ｒａｓ Ｅ７６変異を備える融合タンパク質、及び酵母輸送体（ｙｅａｓｔ ｖｅｈｉｃｌｅ）を包含する酵母から作製されるワクチンについて説明している。

【０２２６】

Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅは、銅誘導性プロモータ ＣＵＰ１の制御下において多ドメイン変異体Ｒａｓ融合タンパク質を発現するために操作された。融合タンパク質は、Ｎ末端からＣ末端まで（配列番号１４によって本明細書において表されている融合タンパク質のアミノ酸配列）インフレームに融合された以下の（１）～（７）の配列要素を有する単一のポリペプチドである。（１）細胞培養の間における新生酵母発現異種タンパク質の安定性を与えるための配列ＭＡＤＥＡＰ（配列番号１４の１－６位）；（２）野生型のＲａｓタンパク質に関して１２位のアミノ酸を含むＲａｓの断片（ここで、１２位のグリシンは、システインと置換されている）（配列番号１４の７－５２位；配列番号１４の１７位にある１２位変異を有する）；（３）野生型のＲａｓタンパク質に関する６１位のアミノ酸を含むＲａｓの断片（ここで、６１位におけるグリシンは、ア

ルギニンと置換されている）（配列番号１４の５３－９１位；配列番号１４の６６位にある６１位変異を有する）；（４）野生型のＲａｓタンパク質に関して１２位のアミノ酸を含むＲａｓの断片（ここで、１２位におけるグリシンは、アスパラギン酸と置換されている）（配列番号１４の９２－１３７位；配列番号１４に対する１０２位にある１２位変異を有する）；（５）野生型のＲａｓタンパク質に関する１２位のアミノ酸を含むＲａｓの断片（ここで、１２位におけるグリシンは、バリンと置換されている）（配列番号１４の１３８－１８３位；配列番号１４の１４８にある１２位変異を有する）；（６）野生型のＲａｓタンパク質に関する１２位のアミノ酸を含むＲａｓの断片（ここで、１２位におけるグリシンは、アルギニンと置換されている）（配列番号１４の１８４－２２９位；配列番号１４の１９４位にある１２位変異を有する）；及び（７）野生型のＲａｓタンパク質に関する７６位のアミノ酸を含むＲａｓの断片（ここで、７６位のグルタミン酸は、グリシンと置換されている）（配列番号１４の２３０－２７５位；配列番号１４の２５８位にある７６位変異を有する）。

【０２２７】

Ｒａｓ融合タンパク質を発現する酵母の増殖及び誘導が実施され、かつタンパク質の発現が検出された。

これらの酵母は、コドン６１における変異（腫瘍の８０－９０％）及びコドン１２における変異（腫瘍の～１０％）、又はＲａｓ変異に非依存的に発生する腫瘍（＜１０％の腫瘍）を誘発するウレタンのばくろによって自発性に２５－５０の肺腫瘍が誘導された、Ａ／Ｊマウスに投与された。ワクチンの投与は、ウレタン誘導後の２又は５週間目において皮下投与によって実施された。ワクチンは、ワクチンを受けていないマウスと比べて、統計的に有為なほどにマウスにおける全身腫瘍組織量を減少させ、酵母ワクチンが、融合タンパク質コンストラクトによってコードされる少なくとも１つの変異を内部に有する腫瘍を標的化する、抗腫瘍免疫反応を引き出すことができることを示している。

【０２２８】

７６位における変異を内部に有するＲａｓに対する免疫反応の誘導に関して試験するためのさらなる実験において、これらの酵母は、腫瘍が誘発されているか、又はいずれ誘発されるマウスに投与され、ここで、腫瘍細胞は、Ｅ７６Ｇ変異を備えるＲａｓを発現するように操作されているか、又はＥ７６Ｇ変異を備えるＲａｓを天然に発現する。全腫瘍組織量の減少に関するワクチンの影響が評価される。さらに、マウス由来のＴ細胞が単離され、かつＥ７６Ｇ変異を備えるＲａｓを発現する細胞を殺すそれらの能力に関して（ＣＴＬアッセイにおいて）、及び／又は抗原提示細胞によって提示されているＥ７６Ｇ変異を備えるＲａｓに応じた増殖能に関して試験される。全身腫瘍組織量がワクチンの投与の非存在下と比べてマウスにおいて低減されることは、予想される。同様に、これらのマウスから単離されたＴ細胞は、抗原特異的な様式において、変異Ｒａｓタンパク質を発現する標的を殺すことができること、及び／又は変異Ｒａｓタンパク質に応じて増殖できることを予想される。

【０２２９】

（実施例４）

以下の実験は、Ｒａｓ　Ｅ７６変異を備える融合タンパク質、及び酵母輸送体を包含する、酵母から作製されるワクチンについて説明する。

【０２３０】

Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅは、プロモータの制御下において２重ドメイン変異体Ｒａｓタンパク質を発現するために操作された。融合タンパク質は、Ｎ末端からＣ末端まで（配列番号１５によって本明細書において表されている融合タンパク質のアミノ酸配列）インフレームに融合された以下の（１）、（２）及び（７）の配列要素を有する単一のポリペプチドである。（１）細胞培養の間における新生酵母発現異種タンパク質の安定性を与えるための配列ＭＡＤＥＡＰ（配列番号１５の１－６位）；（２）野生型のＲａｓタンパク質に関して１２位のアミノ酸を含むＲａｓの断片（ここで、１２位のグリシンは、アルギニンと置換されている）（配列番号１５の７－５２位；配列番

号１５の１７位にある１２位変異を有する）；及び（７）野生型のＲａｓタンパク質に関する７６位のアミノ酸を含むＲａｓの断片（ここで、７６位のグルタミン酸は、グリシンと置換されている）（配列番号１５の５３－９８位；配列番号１５の８１位にある７６位変異を有する）。

【０２３１】

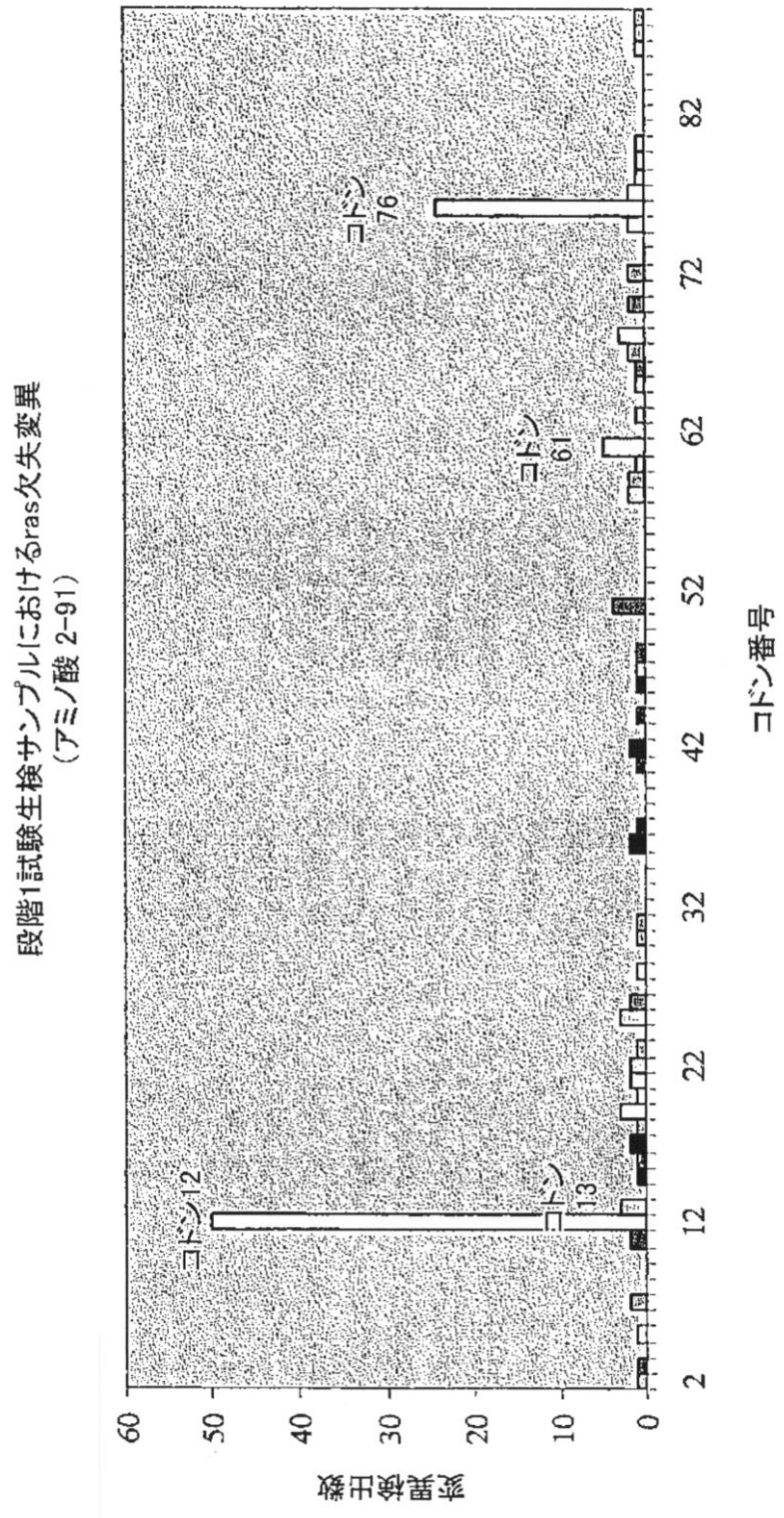
Ｒａｓ融合タンパク質を発現する酵母の増殖及び誘導が実施され、かつタンパク質の発現が検出された。

７６位における変異を内部に有するＲａｓに応じた免疫反応の誘導に関して調べるための実験において、これらの酵母は、腫瘍が誘発されているか、又はいずれ誘発されるマウスに投与され、ここで、腫瘍細胞は、Ｅ７６Ｇ変異を備えるＲａｓを発現するように操作されているか、又はＥ７６Ｇ変異を備えるＲａｓを天然に発現する。全身腫瘍組織量の減少に関するワクチンの影響が評価された。さらに、マウス由来のＴ細胞が単離され、かつＥ７６Ｇ変異を備えるＲａｓを発現する細胞を殺すそれらの能力に関して（ＣＴＬアッセイにおいて）、及び／又は抗原提示細胞によって提示されているＥ７６Ｇ変異を備えるＲａｓに応じた増殖能に関して試験される。全身腫瘍組織量がワクチンの投与の非存在下と比べてマウスにおいて低減されることは、予想される。同様に、マウスから単離されたＴ細胞は、抗原特異的な様式において、変異Ｒａｓタンパク質を発現する標的を殺すことができること、及び／又は変異Ｒａｓタンパク質に応じて増殖できることを予想される。米国仮出願第６０／７８６，５６８号明細書の全体の開示内容は、引用によって本明細書に組み込まれる。

【０２３２】

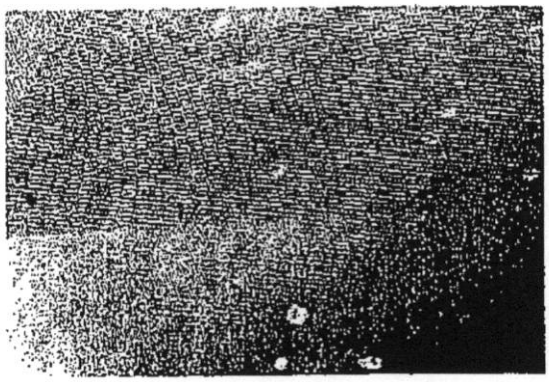
本発明の種々の実施形態について詳細に説明されているが、これらの実施形態の改変及び適合が当業者の頭に浮かぶことは、明らかである。しかし、当該改変及び適合が、以下の特許請求の範囲に記載の本発明の範囲内であることは、特に理解されるべきである。

【図１】


段階1試験生検サンプルにおけるras欠失変異
（アミノ酸 2-91）
変異検出数
コドン番号
コドン12
コドン13
コドン61
コドン76
0
10
20
30
40
50
60
2
12
22
32
42
52
62
72
82

【図２Ａ】

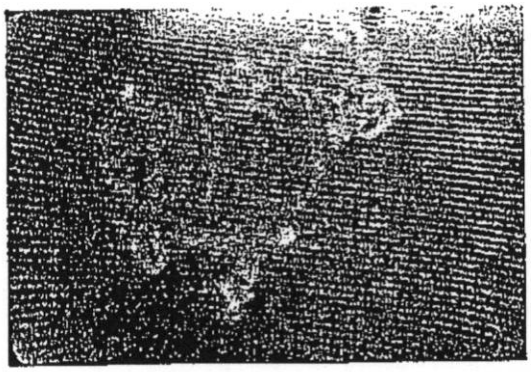
ネガティブ



BALB/3T3 細胞 －
トランスフェクションなし

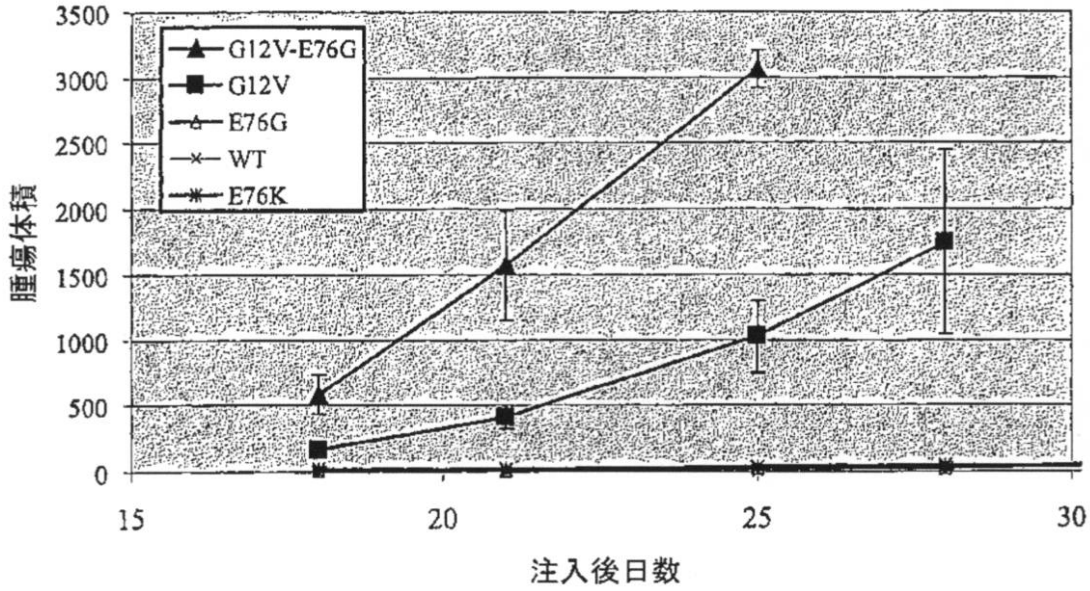
【図２Ｂ】

ポジティブ

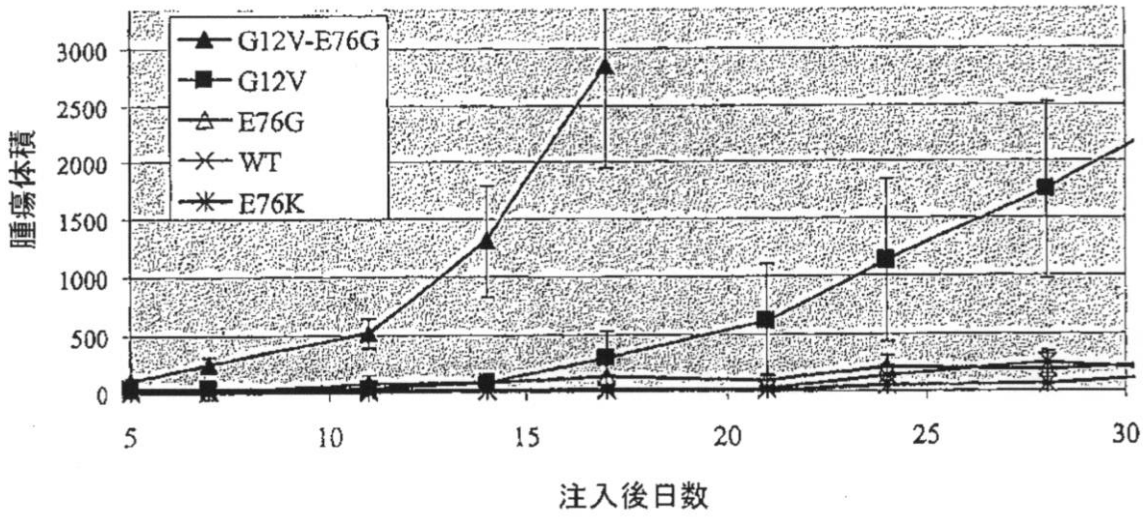


BALB/3T3 細胞 －
G12V + E76G Ras
トランスフェクションあり

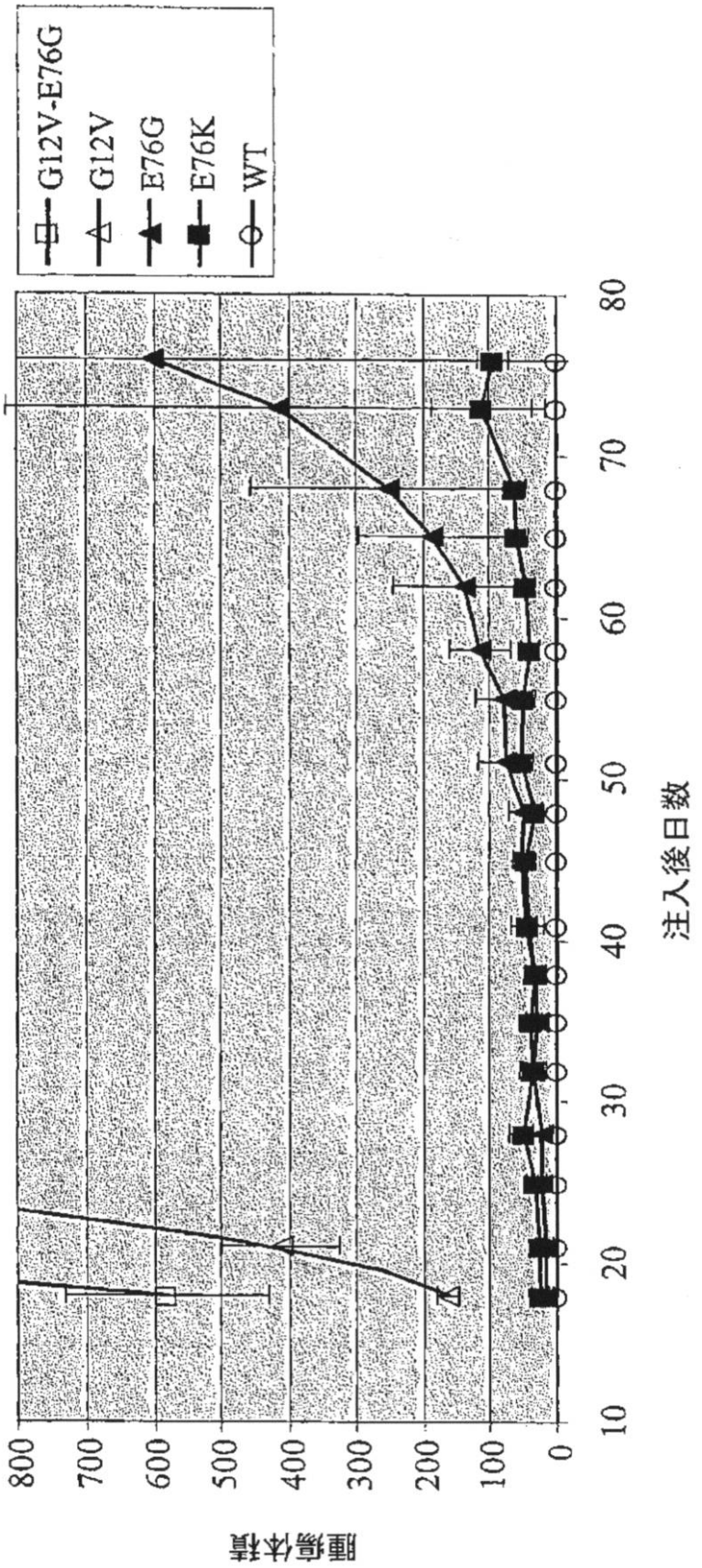
【図３Ａ】


3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
腫瘍体積
G12V-E76G
G12V
E76G
WT
E76K
15
20
25
30
注入後日数

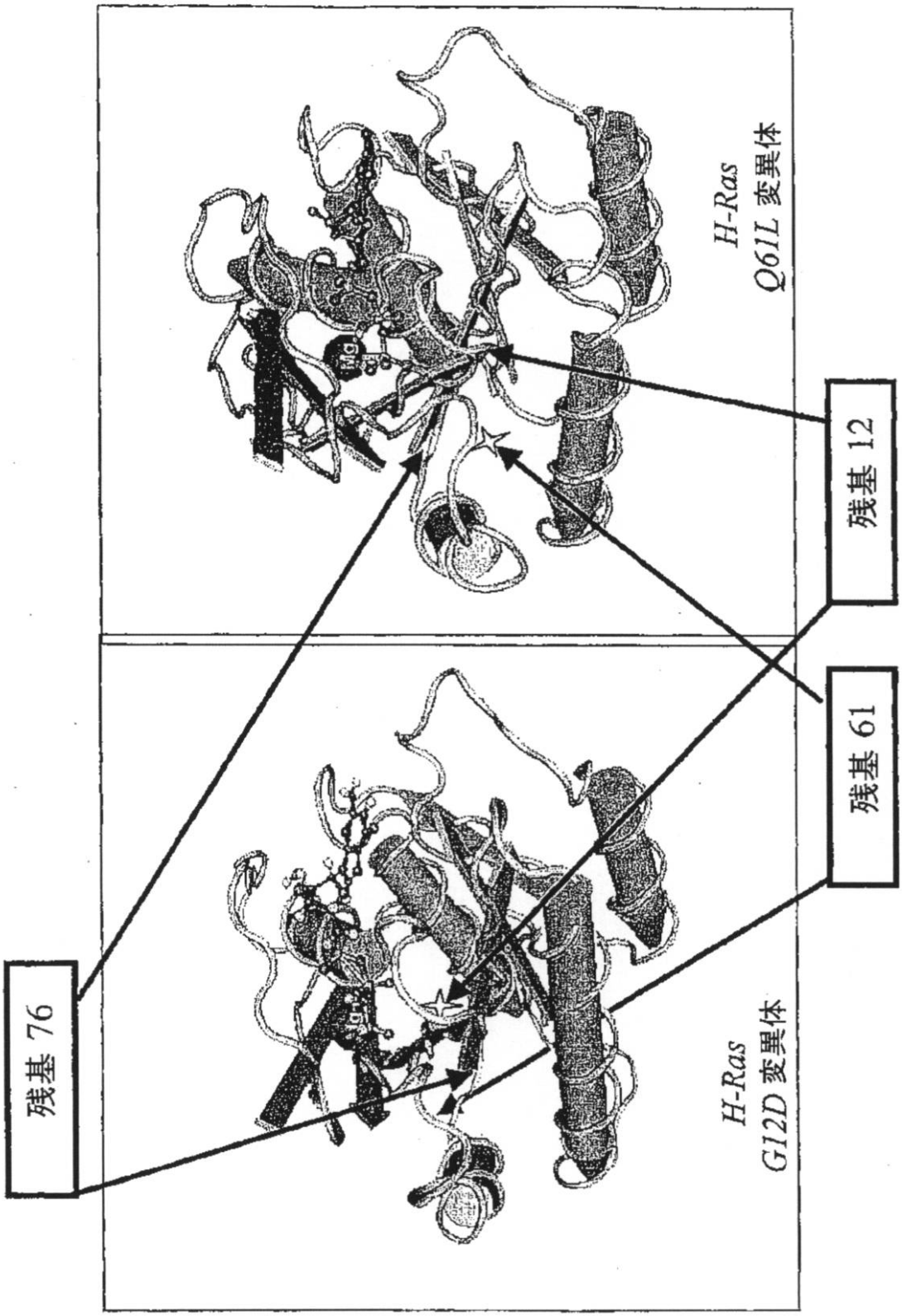
【図３Ｂ】


3000
2500
2000
1500
1000
500
0
腫瘍体積
G12V-E76G
G12V
E76G
WT
E76K
5
10
15
20
25
30
注入後日数

【図３Ｃ】


G12V-E76G
G12V
E76G
E76K
WT
腫瘍体積
800
700
600
500
400
300
200
100
0
10
20
30
40
50
60
70
80
注入後日数

【図４】



【配列表】
2015043773000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI			テーマコード（参考）
C07K 16/32	*(2006.01)*	C07K	16/32		4C084
C07K 19/00	*(2006.01)*	C07K	19/00		4C085
C07K 14/47	*(2006.01)*	C07K	14/47		4C086
C12N 9/14	*(2006.01)*	C12N	9/14		4H045
C12Q 1/02	*(2006.01)*	C12Q	1/02		
A61K 31/7088	*(2006.01)*	A61K	31/7088		
A61K 39/00	*(2006.01)*	A61K	39/00	H	
A61K 48/00	*(2006.01)*	A61K	48/00		
A61P 35/00	*(2006.01)*	A61P	35/00		
G01N 33/53	*(2006.01)*	G01N	33/53	M	
G01N 37/00	*(2006.01)*	G01N	37/00	102	
G01N 33/574	*(2006.01)*	G01N	33/574	A	
G01N 33/50	*(2006.01)*	G01N	33/50	Z	
G01N 33/15	*(2006.01)*	G01N	33/15	Z	
C07K 14/82	*(2006.01)*	C07K	14/82		

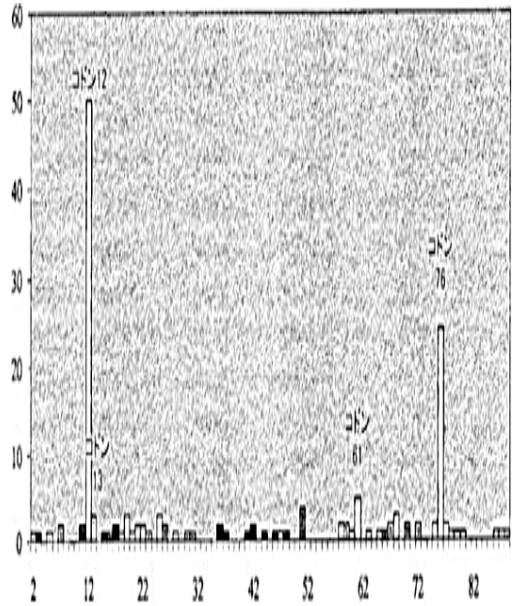
(72)発明者 グオ，ジミン
アメリカ合衆国，８００２７ コロラド州，ルイスヴィル，エス．タフト コート ２９４
(72)発明者 ル，インニェン
アメリカ合衆国，８０２３８ コロラド州，デンバー，アクロン コート ２８２９
(72)発明者 ベルグラウ，ドナルド
アメリカ合衆国，８０１２９ コロラド州，ハイランド ランチ，リッジクレスト ウェイ １８７４
(72)発明者 フランツソッフ，アレックス
アメリカ合衆国，８０２１８ コロラド州，デンバー，オグデン ストリート ８６０

Ｆターム(参考) 2G045 AA13 AA24 AA26 AA29 AA40 BA13 BB20 BB22 CA25 CB01
CB07 CB17 DA13 DA14 DA36 FB01 FB02 FB03 FB08 FB12
FB15
4B024 AA01 AA12 BA80 CA02 CA09 CA11 CA12 DA02 DA12 EA04
GA11 HA12
4B050 CC01 DD20 LL05
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ43 QQ58 QQ79 QR48 QR55 QR62 QR77
QR80 QS05 QS25 QS34 QX02
4B065 AA80X AA91X AB01 AC14 BA02 CA24 CA45
4C084 AA13 NA14 ZB262
4C085 AA03 BB11 DD62 EE01
4C086 AA01 AA02 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26 ZC20 ZC41
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA41 DA75 DA86 DA89 EA28 EA31
EA51 FA74

专利名称(译)	Ras突变及相关组合物和方法		
公开(公告)号	JP2015043773A	公开(公告)日	2015-03-12
申请号	JP2014198353	申请日	2014-09-29
[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)	格罗夫李亩下来，公司		
[标]发明人	グオジミン ルインニェン ベルグラウドナルド フランツソッフアレックス		
发明人	グオ,ジミン ル,インニェン ベルグラウ,ドナルド フランツソッフ,アレックス		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/19 C12Q1/68 C12N15/113 C12N15/115 C07K16/32 C07K19/00 C07K14/47 C12N9/14 C12Q1/02 A61K31/7088 A61K39/00 A61K48/00 A61P35/00 G01N33/53 G01N37/00 G01N33/574 G01N33/50 G01N33/15 C07K14/82		
CPC分类号	A61K39/0011 A61K2039/5156 A61K2039/523 A61P35/00 C07K14/82 C12Q1/6886 C12Q2600/136 C12Q2600/178 G01N33/574 G01N2800/52 Y10T436/143333 A61K39/001162		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/19 C12Q1/68.A C12N15/00.G C12N15/00.H C07K16/32 C07K19/00 C07K14/47 C12N9/14 C12Q1/02 A61K31/7088 A61K39/00.H A61K48/00 A61P35/00 G01N33/53.M G01N37/00.102 G01N33/574.A G01N33/50.Z G01N33/15.Z C07K14/82 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/115.Z C12Q1/6886.C C12Q1/6886.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB20 2G045/BB22 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/CB07 2G045/CB17 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/FB15 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B050/CC01 4B050/DD20 4B050/LL05 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ43 4B063/QQ58 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS05 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B065/AA80X 4B065/AA91X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA45 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/DD62 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C086/ZC20 4C086/ZC41 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/DA89 4H045/EA28 4H045/EA31 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	昂达诚 本田 淳		
优先权	60/786568 2006-03-27 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了鉴定其他癌症风险因子和癌症的早期诊断和治疗的方法。 本发明提供新发现的Ras突变和突变，蛋白质和肽的组合以及含有这些突变的融合蛋白，编码这些蛋白质的核酸分子，肽和融合蛋白等。公开了与这种突变的使用相关的各种技术和诊断，治疗和筛选方法。 [选图]图1


60
50
40
30
20
10
0
2
12
22
32
42
52
62
72
82
ピーク12
ピーク13
ピーク61
ピーク76