

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-502329

(P2021-502329A)

(43) 公表日 令和3年1月28日 (2021.1.28)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16 Z N A	4 B 0 6 3
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 A	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 73 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-520153 (P2020-520153)	(71) 出願人	399052796
(86) (22) 出願日	平成30年11月5日 (2018.11.5)		ダイナ ファーバー キャンサー インス
(85) 翻訳文提出日	令和2年4月8日 (2020.4.8)		ティチュート, インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2018/059188		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(87) 国際公開番号	W02019/094326		2 1 5, ポストン, ブルックライン ア
(87) 国際公開日	令和1年5月16日 (2019.5.16)		ベニュー 4 5 0
(31) 優先権主張番号	62/583, 166	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成29年11月8日 (2017.11.8)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(74) 代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		最終頁に続く	

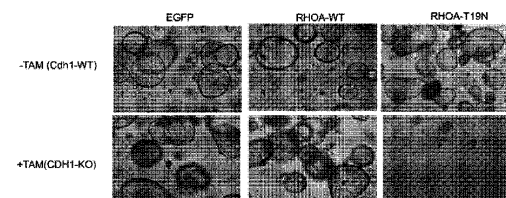
(54) 【発明の名称】 RHOAドミナントネガティブフォームを使用して癌を治療するための組成物および方法

(57) 【要約】

本発明は、RHOAドミナントネガティブポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片、および／またはRHOAドミナントネガティブポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片をコードする核酸を使用して、CDH1が減少または欠損した癌を治療するための組成物および方法を提供する。

【選択図】 図1

Figure 1

Msi1CreERT2;Cdh1^{flp} organoids

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

減少した C D H 1 レベルを有する癌に罹患した対象を治療する方法であって、1) R H O A ドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片をコードする核酸、および 2) R H O A ドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片、からなる群から選択される少なくとも 1 つの薬剤の治療的有効量を前記対象に投与することを含む、方法。

【請求項 2】

前記癌が C D H 1 発現を喪失している、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記癌が上皮間葉転換 (E M T) を起こしつつあるか、または既に起こしている、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記癌が、びまん性胃癌 (D G C)、乳小葉癌、転移性乳癌、転移性肺癌、転移性非小細胞肺癌、結腸癌、膵臓癌、前立腺癌、脳腫瘍および黒色腫からなる群から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記薬剤が、(i) 配列番号 1、2、および 3 からなる群から選択されるポリペプチドとその全長にわたって少なくとも 80 % 同一である R H O A ドミナントネガティブポリペプチド、またはその生物学的に活性な断片ならびに (i i) (i) の R H O A ドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片をコードする核酸配列、からなる群から選択され、前記核酸配列は、配列番号 4、5、6、7、8、9、10、および 11 からなる群から選択される核酸配列、または前記生物学的に活性な断片をコードするその一部と、その全長にわたって少なくとも 80 % 同一である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記薬剤が、配列番号 1、2、または 3 の R H O A ドミナントネガティブポリペプチド配列を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記薬剤が、R H O A ドミナントネガティブポリペプチド、またはその生物学的に活性な断片であり、かつそれに融合した異種ポリペプチドをさらに含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記融合ポリペプチドが、対応する非融合 R H O A ドミナントネガティブポリペプチド、またはその生物学的に活性な断片よりも長い半減期および／または細胞透過性を有する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記異種ポリペプチドが、F c ドメインおよび／または細胞透過性ペプチドである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記薬剤が、発現ベクターまたは細胞内に含まれる核酸である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記対象に免疫療法および／または癌療法を施すことをさらに含み、任意で、前記免疫療法および／または癌療法が前記薬剤の前、後、または同時に施される、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記免疫療法が、細胞ベースである、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記免疫療法が、癌ワクチンおよび／またはウイルスを含む、請求項 11 に記載の方法

10

20

30

40

50

。

【請求項 14】

前記免疫療法が、免疫チェックポイントを阻害する、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 15】

前記免疫チェックポイントが、CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIRファミリー受容体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、GITR、4-1BB、OX-40、BTLA、SIRPアルファ（CD47）、CD48、2B4（CD244）、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、HHLA2、ブチロフィリン、およびA2aRからなる群から選択される、請求項 14 に記載の方法。

10

【請求項 16】

前記癌療法が、放射線、放射線増感剤、および化学療法からなる群から選択される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 17】

前記薬剤が、前記癌中の生存細胞または増殖細胞の数を減少させ、かつ／または前記癌細胞を含む腫瘍の体積またはサイズを減少させる、請求項 1～16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記癌を治療するための少なくとも 1 つの追加の治療薬またはレジメンを前記対象に投与することをさらに含む、請求項 1～17 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 19】

減少したCDH1レベルを有する癌細胞の生存率または増殖を減少させる方法であって、前記癌細胞を 1) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片をコードする核酸、および 2) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片、からなる群から選択される少なくとも 1 つの薬剤と接触させることを含む、方法。

【請求項 20】

前記癌細胞がCDH1発現を喪失している、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記癌細胞が、上皮間葉転換（EMT）を起こしつつあるか、または既に起こしている、請求項 19 または 20 に記載の方法。

30

【請求項 22】

前記癌細胞が、びまん性胃癌（DGC）、乳小葉癌、転移性乳癌、転移性肺癌、転移性非小細胞肺癌、結腸癌、膵臓癌、前立腺癌、脳腫瘍、黒色腫からなる群から選択される癌を有する対象から得られる、請求項 19～21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

前記薬剤が、(i) 配列番号 1、2、および 3 からなる群から選択されるポリペプチドとその全長にわたって少なくとも 80% 同一である RHOAドミナントネガティブポリペプチド、またはその生物学的に活性な断片、ならびに(ii) (i) の RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片をコードする核酸配列、からなる群から選択され、前記核酸配列は、配列番号 4、5、6、7、8、9、10、および 11 からなる群から選択される核酸配列、または前記生物学的に活性な断片をコードするその一部と、その全長にわたって少なくとも 80% 同一である、請求項 19～22 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 24】

前記薬剤が、配列番号 1、2、または 3 の RHOAドミナントネガティブポリペプチド配列を含む、請求項 19～23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

前記薬剤が、RHOAドミナントネガティブポリペプチド、またはその生物学的に活性

50

な断片であり、かつそれに融合した異種ポリペプチドをさらに含む、請求項 19～24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記融合ポリペプチドが、対応する非融合 RHOA ドミナントネガティブポリペプチド、またはその生物学的に活性な断片よりも長い半減期および／または細胞透過性を有する、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記異種ポリペプチドが、Fc ドメインおよび／または細胞透過性ペプチドである、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記薬剤が、発現ベクターまたは細胞内に含まれる核酸である、請求項 19～23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記癌細胞を免疫療法および／または癌療法と接触させることをさらに含み、任意で、前記免疫療法および／または癌療法が前記薬剤の前、後、または同時に施される、請求項 19～28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記免疫療法が細胞ベースである、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記免疫療法が癌ワクチンおよび／またはウイルスを含む、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 32】

前記免疫療法が免疫チェックポイントを阻害する、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 33】

前記免疫チェックポイントが、CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIRファミリー受容体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、GITR、4-1BB、OX40、BTLA、SIRPアルファ（CD47）、CD48、2B4（CD244）、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、HHLA2、ブチロフィリン、およびA2aRからなる群から選択される、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 34】

前記癌療法が、放射線、放射線増感剤、および化学療法からなる群から選択される、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 35】

対象において減少したCDH1レベルを有する癌を治療するための請求項 1 に記載の薬剤の有効性を評価する方法であって、

a) 最初の時点で、対象の試料における生存および／または増殖癌細胞の数を検出することと、

b) 前記薬剤の投与後の少なくとも1つの後続時点の間、工程a)を繰り返すことと、

c) 工程a)およびb)で検出された生存および／または増殖癌細胞の数を比較することと、を含み、前記最初の時点での前記試料中の量と比較した、後続試料中の生存および／または増殖癌細胞の不在、またはその数の顕著な減少は、前記薬剤が前記対象の癌を治療することを示す、方法。

【請求項 36】

前記最初の時点と前記後続時点との間で、前記対象が前記癌の治療を受けたか、治療を完了したか、かつ／または寛解にある、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記最初および／または少なくとも1つの後続試料が、エキスピボおよびインビボ試料からなる群から選択される、請求項 35 または 36 に記載の方法。

【請求項 38】

10

20

30

40

50

前記最初および／または少なくとも１つの後続試料が、前記癌の動物モデルから得られる、請求項３５～３７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３９】

前記最初および／または少なくとも１つの後続試料が、前記対象から得られた単一試料またはプールされた試料の一部である、請求項３５～３８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４０】

前記試料が、前記対象から得られた細胞、血清、腫瘍周囲組織、および／または腫瘍内組織を含む、請求項３５～３９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４１】

臨床的有益率、死亡までの生存時間、病理学的完全奏効、病理学的奏効の半定量的測定、臨床的完全寛解、臨床的部分寛解、臨床的安定疾患、無再発生存期間、無転移生存期間、無病生存期間、循環腫瘍細胞減少、循環マーカー反応、およびRECIST基準からなる群から選択される少なくとも１つの基準を測定することにより、前記薬剤に対する奏効性を決定することをさらに含む、請求項３５～４０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４２】

前記薬剤が薬学的に許容される製剤で投与される、請求項１～４１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４３】

前記投与または接触の工程が、インビボ、エクスビボ、またはインビトロで生じる、請求項１～４２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４４】

前記対象が前記癌の動物モデルであり、任意に、前記動物モデルがマウスモデルである、請求項１～４３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４５】

前記対象が哺乳動物である、請求項１～４４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４６】

前記哺乳動物がマウスまたはヒトである、請求項４５に記載の方法。

【請求項４７】

前記哺乳動物がヒトである、請求項４６に記載の方法。

【請求項４８】

減少したCDH1レベルを有する癌細胞の生存率または増殖を減少させる薬剤をスクリーニングするための細胞ベースのアッセイであって、

a) 前記癌細胞を、１) RHOA変異体、またはその生物学的に活性な断片をコードする核酸、および２) RHOA変異体ポリペプチド、またはその生物学的に活性な断片、からなる群から選択される試験薬剤と接触させることと、

b) 対照と比較して癌細胞の減少した生存率または増殖を決定し、それにより癌細胞の生存率または増殖を減少させる前記試験薬剤を特定することと、を含む細胞ベースのアッセイ。

【請求項４９】

前記対照が前記試験薬剤と接触していない癌細胞である、請求項４８に記載の細胞ベースのアッセイ。

【請求項５０】

前記対照が抗癌剤と接触した癌細胞である、請求項４８に記載の細胞ベースのアッセイ。

【請求項５１】

前記癌細胞が、癌の動物モデル、または癌に罹患したヒト患者から単離される、請求項４８～５０のいずれか一項に記載の細胞ベースのアッセイ。

【請求項５２】

前記接触させる工程がインビボ、エクスビボ、またはインビトロで生じる、請求項４８～５１のいずれか一項に記載の細胞ベースのアッセイ。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2017年11月8日に提出された米国仮出願第62/583,166号の利益を主張し、前記出願の全内容は、本参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

胃癌は、世界中で癌による死亡の3位の主要原因である (Sutter et al. (2006) World J. Gastroenterol. 12:380-387; Zhou et al. (2014) Cancer Cell 16:9-11; Cancer Genome Atlas Research Network (2014) Nature 513:202-209)。胃癌は顕著な異質性を有するが、最も際立った2つのサブタイプは腸胃癌 (IGC) とびまん性胃癌 (DGC) である。DGCの名前の由来は、細胞接着の特徴的な欠如、間質全体への浸潤、および細胞分化の低下 (多くの場合、印環細胞の形態) である。DGCの遺伝型を有する家族は、細胞接着タンパク質E-カドヘリンをコードするCDH1に変異を持っている (Guilford et al. (1998) Nature 392:402-405)。遺伝性DGCを超えて、非常に一般的な散発型のDGCも、体細胞変異またはプロモーターの過剰メチル化を介して、E-カドヘリンの喪失とも関連している。DGCの開始は通常、腫瘍抑制因子CDH1の喪失に続いて起こる。EMT癌は、E-カドヘリン喪失びまん性胃癌と同様の特徴を有する。

【0003】

RHOA変異はDGC内で繰り返し特定されており、これはRHOAがDGCの新規候補ドライバーであることを示している。RhoAは、細胞表面受容体と、異なる細胞内シグナル伝達タンパク質との間の媒介として作用する低分子量GTPase-Ras様タンパク質のRhoファミリーのメンバーである。他のGTPaseと同様に、RhoAは、アクチン細胞骨格、細胞遊走、細胞質分裂、細胞 (分裂) 周期の構造とダイナミクスに影響を与える、ROCKなどの下流のエフェクターと相互作用する非活性GDP結合コンフィギュレーションと活性GTP結合コンフィギュレーションとの間を循環する。RhoAの過剰発現は様々な癌で観察されており、RhoA活性は腫瘍形成と腫瘍細胞浸潤に関係している (Karlsson et al. (2009) Biochim Biophys Acta. 1796:91-98)。しかし、RHOA変異が単に生理的なRhoA活性を弱毒化させるだけなのか、あるいはこれらの変異が機能の獲得をもたらすのかについては明らかにされていない。

【0004】

したがって、胃癌、ならびにCDH1発現の減少および/または欠損を特徴とする他の上皮/間葉転換 (EMT) 癌は、早期の浸潤および転移を起こしやすく、効果的な分子標的療法を欠いている。したがって、当技術分野では、DGCのようなEMT癌の新しい治療標的を特定する大きな必要性が存在する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Sutter et al. (2006) World J. Gastroenterol. 12:380-387

【非特許文献2】Zhou et al. (2014) Cancer Cell 16:9-11; Cancer Genome Atlas Research Network (2014) Nature 513:202-209

【非特許文献3】Guilford et al. (1998) Nature 392:402-405

【非特許文献4】Karlsson et al. (2009) Biochim Bio

10

20

30

40

50

phys Acta. 1796:91-98

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、低分子量GTPase RHOAドミナントネガティブフォーム（例えば、RHOA T19N、RHOA G17E、またはRHOA G17V）が、CDH1-null癌細胞など、減少および／または欠損したCDH1発現を有する癌細胞の過剰増殖を調節するが、CDH1発現が損なわれていない癌細胞は温存するという発見に一部基づいている。

【0007】

一態様では、減少したCDH1レベルを有する癌に罹患した対象を治療する方法が提供され、当該方法は、1) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片をコードする核酸、および2) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片、からなる群から選択される少なくとも1つの薬剤の治療的有効量を対象に投与することを含む。

【0008】

本発明の任意の態様に適用することができ、および／または本明細書で説明する任意の他の実施形態と組み合わせることができる多数の実施形態がさらに提供される。例えば、一実施形態において、癌はCDH1発現を喪失している。別の実施形態では、癌は上皮間葉転換（EMT）を起こしつつあるか、または既に起こしている。さらに別の実施形態では、癌は、びまん性胃癌（DGC）、乳小葉癌、転移性乳癌、転移性肺癌、転移性非小細胞肺癌、結腸癌、膵臓癌、前立腺癌、脳腫瘍および黒色腫からなる群より選択される。さらに別の実施形態において、薬剤は、(i) 配列番号1、2および3からなる群から選択されるポリペプチドとその全長にわたって少なくとも80%同一であるRHOAドミナントネガティブポリペプチド、またはその生物学的に活性な断片、ならびに(ii) (i)のRHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片をコードする核酸配列、からなる群から選択され、核酸配列は、配列番号4、5、6、7、8、9、10、および11からなる群から選択される核酸配列、または生物学的に活性な断片をコードするその一部と、その全長にわたって、少なくとも80%同一である。別の実施形態では、薬剤は、配列番号1、2、または3のRHOAドミナントネガティブポリペプチド配列を含む。さらに別の実施形態では、薬剤はRHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片であり、かつそれに融合した異種ポリペプチドをさらに含む。さらに別の実施形態では、融合ポリペプチドは、対応する非融合RHOAドミナントネガティブポリペプチド、またはその生物学的に活性な断片よりも長い半減期および／または細胞透過性を有する。別の実施形態では、異種ポリペプチドは、Fcドメインおよび／または細胞透過性ペプチドである。さらに別の実施形態では、薬剤は、発現ベクターまたは細胞内に含まれる核酸である。さらに別の実施形態において、本方法は、対象に免疫療法および／または癌療法を施すことをさらに含み、任意で、免疫療法および／または癌療法は、薬剤の前、後、または同時に施される。別の実施形態では、免疫療法は細胞ベースである。さらに別の実施形態では、免疫療法は癌ワクチンおよび／またはウイルスを含む。さらに別の実施形態では、免疫療法は免疫チェックポイントを阻害する。別の実施形態において、免疫チェックポイントは、CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIRファミリー受容体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、GITR、4-1BB、OX-40、BTLA、SIRPアルファ（CD47）、CD48、2B4（CD244）、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、HHLA2、ブチロフィリン、およびA2aRからなる群から選択される。さらに別の実施形態では、癌療法は、放射線、放射線増感剤、および化学療法からなる群から選択される。さらに別の実施形態では、薬剤は、癌中の生存細胞または増殖細胞の数を減少させ、かつ／または癌細胞を含む腫瘍の体積または

10

20

30

40

50

サイズを減少させる。別の実施形態において、本方法は、癌を治療するための少なくとも1つの追加の治療薬またはレジメンを対象に投与することをさらに含む。

【0009】

別の態様では、減少したCDH1レベルを有する癌細胞の生存率または増殖を減少させる方法が提供され、当該方法は、癌細胞を1) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片をコードする核酸、および2) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片、からなる群から選択される少なくとも1つの薬剤と接触させることを含む。

【0010】

上述のように、本発明の任意の態様に適用することができ、および／または本明細書で説明する他の実施形態と組み合わせることができる多数の実施形態がさらに提供される。例えば、一実施形態では、癌細胞はCDH1発現を喪失している。別の実施形態では、癌細胞は、上皮間葉転換(EMT)を起こしつつあるか、または既に起こしている。さらに別の実施形態では、癌細胞は、びまん性胃癌(DGC)、乳小葉癌、転移性乳癌、転移性肺癌、転移性非小細胞肺癌、結腸癌、膵臓癌、前立腺癌、脳腫瘍、および黒色腫からなる群から選択される癌を有する対象から得られる。さらに別の実施形態において、薬剤は、

(i) 配列番号1、2および3からなる群から選択されるポリペプチドとその全長にわたって少なくとも80%同一であるRHOAドミナントネガティブポリペプチド、またはその生物学的に活性な断片、および(ii) (i)のRHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片をコードする核酸配列、からなる群から選択され、核酸配列は、配列番号4、5、6、7、8、9、10、および11からなる群から選択される核酸配列、または生物学的に活性な断片をコードするその一部と、その全長にわたって、少なくとも80%同一である。別の実施形態では、薬剤は、配列番号1、2、または3のRHOAドミナントネガティブポリペプチド配列を含む。さらに別の実施形態では、薬剤はRHOAドミナントネガティブポリペプチド、またはその生物学的に活性な断片であり、それに融合した異種ポリペプチドをさらに含む。さらに別の実施形態では、融合ポリペプチドは、対応する非融合RHOAドミナントネガティブポリペプチド、またはその生物学的に活性な断片よりも長い半減期および／または細胞透過性を有する。別の実施形態では、異種ポリペプチドは、Fcドメインおよび／または細胞透過性ペプチドである。さらに別の実施形態では、薬剤は、発現ベクターまたは細胞内に含まれる核酸である。さらに別の実施形態において、方法は、癌細胞を免疫療法および／または癌療法と接触させることをさらに含み、任意で、免疫療法および／または癌療法は薬剤の前、後、または同時に施される。別の実施形態では、免疫療法は癌ワクチンおよび／またはウイルスを含む。さらに別の実施形態では、免疫療法は免疫チェックポイントを阻害する。さらに別の実施形態では、免疫チェックポイントは、CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIRファミリー受容体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、GITR、4-1BB、OX-40、BTLA、SIRPalpha(CD47)、CD48、2B4(CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、HHLA2、ブチロフィリン、およびA2aRからなる群から選択される。別の実施形態において、癌療法は、放射線、放射線増感剤、および化学療法からなる群から選択される。

【0011】

さらに別の態様では、減少したCDH1レベルを有する癌を治療するための請求項1に記載の薬剤の有効性を評価する方法が提供され、当該方法は、a)最初の時点で、対象の試料における生存および／または増殖している癌細胞の数を検出することと、b)薬剤の投与後の少なくとも1つの後続時点の間、工程a)を繰り返すことと、c)工程a)およびb)で検出された生存および／または増殖癌細胞の数を比較することと、を含み、最初の時点での試料中の量と比較した、後続試料中の生存および／または増殖癌細胞の数の不在、またはその数の顕著な減少は、薬剤が対象の癌を治療することを示す。

10

20

30

40

50

【0012】

上述のように、本発明の任意の態様に適用することができ、および／または本明細書で説明する任意の他の実施形態と組み合わせることができる多数の実施形態がさらに提供される。例えば、一実施形態では、最初の時点と後続時点との間で、対象は癌の治療を受けたか、治療を完了したか、かつ／または寛解にある。別の実施形態では、最初および／または少なくとも1つの後続試料は、エクスピボおよびインスピボ試料からなる群から選択される。さらに別の実施形態では、最初および／または少なくとも1つの後続試料は、癌の動物モデルから得られる。さらに別の実施形態では、最初および／または少なくとも1つの後続試料は、対象から得られた単一の試料またはプールされた試料の一部である。別の実施形態では、試料は、対象から得られた細胞、血清、腫瘍周囲組織、および／または腫瘍内組織を含む。さらに別の実施形態では、本方法は、臨床的有益率、死亡までの生存、病理学的完全奏効、病理学的奏効の半定量的測定、臨床的完全寛解、臨床的部分寛解、臨床的安定疾患、無再発生存期間、無転移生存期間、無病生存期間、循環腫瘍細胞減少、循環マーカー反応、およびRECIST基準からなる群から選択される少なくとも1つの基準を測定することにより、薬剤に対する奏効性を決定することをさらに含む。さらに別の実施形態では、薬剤は薬学的に許容される製剤で投与される。別の実施形態では、投与または接触の工程は、インスピボ、エクスピボ、またはインビトロで生じる。さらに別の実施形態では、対象は癌の動物モデルであり、場合により動物モデルはマウスモデルである。さらに別の実施形態では、対象は哺乳動物である。別の実施形態では、哺乳動物はマウスまたはヒトである。さらに別の実施形態では、哺乳動物はヒトである。

10

20

【0013】

さらに別の態様では、減少したCDH1レベルを有する癌細胞の生存率または増殖を減少させる薬剤をスクリーニングするための細胞ベースのアッセイが提供され、当該アッセイは、

a) 癌細胞を、1) RHOA変異体、またはその生物学的に活性な断片をコードする核酸、および2) RHOA変異体ポリペプチド、またはその生物学的に活性な断片、からなる群から選択される試験薬剤と接触させることと、b) 対照と比較して癌細胞の減少した生存率または増殖を決定し、それによって癌細胞の生存率または増殖を減少させる試験薬剤を特定することと、を含む。一実施形態では、対照は、試験薬剤と接触していない癌細胞である。別の実施形態では、対照は、抗癌剤と接触した癌細胞である。さらに別の実施形態では、癌細胞は、癌の動物モデル、または癌に罹患したヒト患者から単離される。さらに別の実施形態では、接触させる工程は、インスピボ、エクスピボ、またはインビトロで生じる。

30

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】RHOA-T19N異所性発現がCDH1-null胃オルガノイドを特異的に死滅させることを示している。Mist1CreER、Cdh1^{F/F}オルガノイドにplx307レンチーEGFP/RHOA-WT/RHO-T19Nウイルスを感染させ、1週間ピューロ(puro)を添加することにより安定感染オルガノイドを選択した。次いで、細胞をタモキシフェンの有無にかかわらず処理して、Creを活性化し、E-カドヘリン喪失を誘導した。RHOA異所性発現とE-カドヘリン喪失は、ウエスタンブロットとTomato/GFPカラースイッチ決定の両方で検証された。

40

【図2】RHOA-T19N異所性発現がCDH1-null乳房上皮MCF10A細胞を特異的に死滅させることを示している。同質遺伝子的MCF10A-CDH1-無傷細胞に異なる構成的RHOA変異ウイルスを感染させ、1週間ピューロを添加することにより安定感染細胞を選択した。次いで、cell titer gloアッセイを使用する分析のために、細胞を96ウェルプレートに播いた。MCF10A-CDH1-KO細胞に異なるDox誘導性RHOA変異ウイルスを感染させ、1週間ピューロを添加して安定感染細胞を選択した。次いで、cell titer gloアッセイ分析のために細胞を、Dox誘導を伴う96ウェルプレートに播いた。

50

【図3】RHOA-T19NがNUGC4腫瘍の成長を著しく阻害できることを示している。びまん性胃癌(DGC)NUGC4細胞では、ウエスタンブロット分析により総E-カドヘリン喪失が確認された。次いで、細胞を、ピューロ選択を使用して、Dox誘導性レンチRHOAウイルスに安定に感染させた。300万個のNUGC4細胞をヌードマウスの側腹部に注射した。2週間後、変異RHOA発現を誘導するために、通常の餌を、Doxを含む餌に変更した。各群のマウスN=3。P<0.0001：対照対-T19N。

【図4】RHOA-T19NがMKN45腫瘍の成長を著しく阻害できることを示している。びまん性腺癌MKN45細胞では、ウエスタンブロット分析により総E-カドヘリン喪失が確認された。次いで、細胞を、ピューロ選択を使用して、Dox誘導性レンチRHOAウイルスに安定に感染させた。300万個のMKN45細胞をヌードマウスの側腹部に注射した。2週間後、変異RHOA発現を誘導するために、通常の餌を、Doxを含む餌に変更した。各群のマウスN=3。P<0.0001：対照対-T19N。バーヒストグラムを示すいくつかの図については、示されるように、各表示の左から右へのバーは、凡例の上から下へのボックスに直接対応している。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明は、低分子量GTPase RHOAドミナントネガティブフォーム（例えば、RHOA-T19N、RHOA-G17E、またはRHOA-G17V）が、CDH1-null癌細胞など、減少および/または欠損したCDH1発現を有する癌細胞の過剰増殖を調節するが、CDH1発現が損なわれていない癌細胞は温存するという発見に一部基づいている。例えば、RHOA-T19Nドミナントネガティブフォームは、CDH1-nullMCF10A細胞を特異的に死滅させるが、CDH1-無傷MCF10A細胞を温存する。同質遺伝子的胃オルガノイドモデルを使用して同様の結果が見出された。例えば、RHOA-T19Nの異所性発現は、CDH1-null胃オルガノイドを特異的に死滅させる。さらに、RHOA-T19NはE-カドヘリン喪失NUGC4およびMKN45拡散胃細胞株の腫瘍成長を有意に抑制することができる。したがって、本発明は、部分的に、ドミナントネガティブRHOAを使用して減少したCDH1レベルを有する癌を治療するための方法および薬剤に関する。

【0016】

I. 定義

冠詞「a」および「an」は、本明細書において、冠詞の文法的対象の1つまたは2つ以上（すなわち、少なくとも1つ）を指すために使用される。例として、「要素」とは、1つの要素または2つ以上の要素を意味する。

【0017】

本明細書で特に明記しない限り、用語「抗体」および「抗体類」は、抗体の天然に存在する形態（例えば、IgG、IgA、IgM、IgE）および、単鎖抗体、キメラおよびヒト化抗体、および多特異性抗体などの組換え抗体、ならびに前述のすべての断片および誘導体であって、少なくとも抗原結合部位を有するこれらの断片および誘導体、を広く包含する。抗体誘導体は、抗体に結合したタンパク質または化学成分を含んでもよい。

【0018】

本明細書で使用される「抗体」という用語には、抗体の「抗原結合部分」（または単に「抗体部分」）も含まれる。本明細書で使用される「抗原結合部分」という用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つまたは複数の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、全長抗体の断片によって実行できることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語に含まれる結合断片の例には、(i) Fab断片、VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる一価の断片と、(ii) F(ab')₂断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された2つのFab断片を含む二価の断片と、(iii) VHおよびCH1ドメインからなるFd断片と、(iv) 抗体の単一アームのVLおよびVHドメインからなるFv断片と、(v) VHドメインからなるdAb断片(Ward et

al., (1989) *Nature* 341:544-546) と、(vi) 分離された相補性決定領域 (CDR) と、が含まれる。さらに、Fv断片の2つのドメイン、VLとVHは別々の遺伝子によってコードされているが、それらは組換え法を使用して、VL領域とVH領域が対になって一価のポリペプチドを形成する単一のタンパク質鎖 (一本鎖Fv (scFv)) として知られている、例えばBird et al. (1988) *Science* 242:423-426、およびHouston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883、およびOsbourne et al. 1998, *Nature Biotechnology* 16:778を参照されたい) としてそれらを作成できるようにする合成リンカーによって結合することができる。そのような一本鎖抗体は、抗体の「抗原結合部分」という用語を包含することも意図されている。完全なIgGポリペプチドまたは他のアイソタイプをコードする発現ベクターを生成するために、特定のscFvの任意のVHおよびVL配列をヒト免疫グロブリン定常領域cDNAまたはゲノム配列に連結することができる。VHおよびVLはまた、タンパク質化学または組換えDNA技術のいずれかを使用して、Fab、Fv、または免疫グロブリンの他の断片の生成にも使用できる。ダイアボディなどの他の形態の一本鎖抗体も含まれる。ダイアボディは、VHおよびVLドメインが一本鎖ポリペプチドで発現する二価の二重特異性抗体であるが、同じ鎖上の2つのドメイン間のペアリングを可能にするには短すぎるリンカーを使用し、それによりドメインを別の鎖の相補ドメインとペアリングさせ、2つの抗原結合部位の作成する (例えば、Holliger, P., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448、Poljak, R. J., et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123を参照されたい)。

【0019】

さらに、抗体またはその抗原結合部分は、抗体または抗体部分と1つ以上の他のタンパク質またはペプチドとの共有結合性または非共有結合性会合により形成される、より大きな免疫接着性 (immunoadhesion) ポリペプチドの一部であり得る。そのような免疫接着性ポリペプチドの例には、四量体scFvポリペプチドの作成のためのストレプトアビジンコア領域の使用 (Kipriyanov, S. M., et al. (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) および二価およびビオチン化scFvポリペプチドを作成するためのシステイン残基、マーカーペプチドおよびC末端ポリヒスチジンタグの使用 (Kipriyanov, S. M., et al. (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058) が含まれる。FabおよびF(ab')₂断片などの抗体部分は、それぞれ抗体全体のパインまたはペプシン消化などの従来の技術を使用して抗体全体から調製することができる。さらに、抗体、抗体部分、および免疫接着性ポリペプチドは、本明細書に記載の標準的な組換えDNA技術を使用して取得することができる。

【0020】

抗体はポリクローナルでもモノクローナルでも、異種、同種、または同一遺伝子のものでもまたはその修飾形態 (例えば、ヒト化、キメラなど) であってもよい。抗体も完全にヒトのものであってよい。本明細書で使用される「モノクローナル抗体」および「モノクローナル抗体組成物」という用語は、抗原の特定のエピトープと免疫反応することができる抗原結合部位の1つの種のみを含む抗体ポリペプチドの集団を指し、一方「ポリクローナル抗体」および「ポリクローナル抗体組成物」という用語は、特定の抗原と相互作用することができる抗原結合部位の複数の種を含む抗体ポリペプチドの集団を指す。モノクローナル抗体組成物は、通常、免疫反応する特定の抗原に対して単一の結合親和性を示す。

【0021】

「アンチセンス」核酸ポリペプチドという用語は、タンパク質をコードする「センス」核酸に相補的な、例えば、二本鎖cDNAポリペプチドのコード鎖に相補的な、mRNA配列に相補的な、または遺伝子のコード鎖に相補的な、ヌクレオチド配列を含む。したがって、アンチセンス核酸ポリペプチドは、センス核酸ポリペプチドに水素結合できる。

【0022】

「体液」という用語は、体から排泄または分泌される体液と、通常は排泄または分泌されない体液（例、羊水、房水、胆汁、血液および血漿、脳脊髄液、耳垢および耳聾、カウパー氏腺液または尿道球腺液、乳び、キームス、便、女性射出液（female ejaculate）、間質液、細胞内液、リンパ、月経、母乳、粘液、胸水、腹水、膿、唾液、皮脂、精液、血清、汗、滑液、涙、尿、膣潤滑液、硝子体液、嘔吐）を指す。好ましい実施形態では、体液は、全血、血清、血漿などを含む血液関連液に制限される。

【0023】

「癌」または「腫瘍」または「過剰増殖性障害」という用語は、制御されない増殖、不死、転移能、急速な成長および増殖速度、および特定の特徴的な形態的特徴など、発がん性細胞に典型的な特徴を有する細胞の存在を指す。癌は一般に、制御されない細胞成長、隣接組織へのそのような細胞の浸潤、および血管およびリンパ管メナスによる身体の他の器官へのそのような細胞の拡散に関連している。癌浸潤は、癌細胞が隣接組織の正常な境界に侵入してそれを越えるときに発生し、これは、癌細胞の遊走、癌細胞による基底膜の酵素的破壊などをアッセイすることで測定できる。いくつかの実施形態では、癌の特定の段階が関連しており、そのような段階には、血管新生、細胞浸潤、および／または転移の、前および／または後の期間が含まれ得る。癌細胞は、多くの場合、固形腫瘍の形態であるが、そのような細胞は動物内に単独で存在する場合もあれば、白血病細胞などの非腫瘍形成性癌細胞である場合もある。癌には、B細胞癌、例えば多発性骨髄腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、例えばα鎖病、γ鎖病、およびμ鎖病などの重鎖病、良性単クローン性ガンマグロブリン異常症、および免疫細胞性アミロイドーシス、黒色腫、乳癌、肺癌、気管支癌、結腸直腸癌、前立腺癌、膵臓癌、胃癌、卵巣癌、膀胱癌、脳または中枢神経系癌、末梢神経系癌、食道癌、子宮頸癌、子宮癌または子宮内膜癌、口腔癌または咽頭癌、肝臓癌、腎臓癌、精巣癌、胆道癌、小腸または虫垂癌、唾液腺癌、甲状腺癌、副腎癌、骨肉腫、軟骨肉腫、血液組織の癌などが含まれるが、これらに限定されない。本発明に包含される方法に適用可能な癌の他の非限定的な例には、ヒト肉腫および癌腫、例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫（lymphangioma）、滑膜腫、中皮腫、ユーイング肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、結腸直腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝細胞腫、胆管癌、肝臓癌、絨毛癌、セミノーマ、胚性癌腫、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、骨癌、脳腫瘍、精巣癌、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫瘍、乏突起神経膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、白血病、例えば急性リンパ性白血病および急性骨髄性白血病（骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性および赤白血病）、慢性白血病（慢性骨髄性（顆粒球性）白血病および慢性リンパ性白血病）、および真性赤血球増加症、リンパ腫（ホジキン病および非ホジキン病）、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、および重鎖病、が含まれる、いくつかの実施形態において、表現型が本発明の方法によって決定される癌は、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、結腸癌、婦人科癌、腎癌、喉頭癌、肺癌、口腔癌、頭頸部癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、または皮膚癌などであるがこれらに限定されない上皮癌である。他の実施形態では、癌は乳癌、前立腺癌、肺癌、または結腸癌である。さらに他の実施形態において、上皮癌は、非小細胞肺癌、非乳頭腎細胞癌、子宮頸癌、卵巣癌（例えば、漿液性卵巣癌）、または乳癌である。上皮性癌は、漿液性、類内膜性、粘液性、明細胞、プレナー、または未分化性を含むが、これらに限定されない様々な他の方法で特徴付けられてもよい。いくつかの実施形態では、本発明は、黒色腫およびそのサブタイプの治療、診断、および／または予後に使用される。

【0024】

「分類する」という用語には、疾病状態を含む試料を「関連付ける」または「カテゴリ

10

20

30

40

50

一化する」ことが含まれる。特定の例では、「分類する」は統計的証拠、経験的証拠、またはその両方に基づいている。特定の実施形態では、分類する方法およびシステムは、既知の疾病状態を有する試料のいわゆるトレーニングセット (training set) を使用する。確立されると、トレーニングデータセットは、試料の未知の疾病状態を分類するために、未知の試料の特徴が比較される基礎、モデル、または鋳型として機能する。特定の例では、試料を分類することは、試料の疾病状態の診断に似ている。特定の他の例では、試料を分類することは、試料の疾病状態を別の疾病状態と区別することに似ている。

【0025】

「コード領域」という用語は、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含むヌクレオチド配列の領域を指し、「非コード領域」という用語は、アミノ酸に翻訳されないヌクレオチド配列の領域を指す（例えば、5' および 3' 非翻訳領域）。

【0026】

「相補的」という用語は、2つの核酸鎖の領域間または同じ核酸鎖の2つの領域間の配列相補性の広い概念を指す。第1の核酸領域のアデニン残基は、残基がチミンまたはウラシルである場合、第1の領域と逆平行である第2の核酸領域の残基と特異的な水素結合（「塩基対合」）を形成できることが知られている。同様に、第1の核酸鎖のシトシン残基は、残基がグアニンである場合、第1の鎖と逆平行である第2の核酸鎖の残基と塩基対合することができることが知られている。2つの領域が逆平行に配置されるときに、第1の領域の少なくとも1つのヌクレオチド残基が、第2の領域の残基と塩基対合することができる場合、核酸の第1の領域は、同じまたは異なる核酸の第2の領域に相補的である。好ましくは、第1の領域は第1の部分を含み、第2の領域は第2の部分を含み、それにより、第1および第2の部分が逆平行に配置される場合、第1部分のヌクレオチド残基の少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約75%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%は、第2部分のヌクレオチド残基と塩基対合することができる。より好ましくは、第1の部分のすべてのヌクレオチド残基は、第2の部分のヌクレオチド残基と塩基対合することができる。

【0027】

「対照」という用語は、試験試料中の発現産物との比較を提供するのに適した参照標準を指す。一実施形態では、対照は、そこから発現産物レベルが検出され、試験試料からの発現産物レベルと比較される「対照試料」を得ることを含む。そのような対照試料は、任意の適切な試料を含み得、それには、既知の結果を有する対照癌患者由来の試料（試料または以前の試料測定値を保存することができる）、正常患者または癌患者などの対象から単離された正常組織または細胞、正常対象または癌患者などの対象から単離された培養初代細胞／組織、癌患者の同じ臓器または体の位置から得られた隣接する正常細胞／組織、正常な対象から単離された組織または細胞試料、または預託機関から取得された初代細胞／組織が含まれるが、これらに限定されない。別の好ましい実施形態では、対照は、ハウスキーピング遺伝子を含むがこれに限定されない、任意の適切なソース由来の参照標準発現産物レベル、正常組織（または以前に分析された他の対照試料）由来の発現産物レベルの範囲、または特定の結果（例えば、1年、2年、3年、4年の生存など）を有する、もしくは特定の治療を受けている患者群、もしくは一連の患者由来の試験試料内で以前に決定された発現産物レベルの範囲、を含み得る。そのような対照試料および参照標準発現産物レベルは、本発明の方法における対照として組み合わせ使用できることが当業者に理解されるであろう。一実施形態では、対照は、正常または非癌性の細胞／組織試料を含み得る。別の好ましい実施形態では、対照は、一連の癌患者などの一連の患者の、または特定の治療を受けている一連の癌患者の、またはある結果と別の結果を有する一連の患者の、発現レベルを含み得る。前者の場合、各患者の特定の発現産物レベルを、発現のパーセントイルレベルに割り当てるか、または参照標準発現レベルの平均 (mean) または平均 (average) よりも高いか低いとして表現できる。別の好ましい実施形態では、対照は、正常細胞、併用化学療法で治療された患者由来の細胞、および良性癌を有する患

10

20

30

40

50

者由来の細胞、を含み得る。別の実施形態では、対照は、測定値、例えば、その同じ集団のハウスキーピング遺伝子の発現レベルと比較したある集団の特定の遺伝子の平均発現レベルも含み得る。そのような集団は、正常な対象、任意の治療を受けていない（すなわち、治療を受けていない）癌患者、治療を受けている癌患者、または良性癌を有する患者、を含み得る。別の好ましい実施形態では、対照は、発現産物レベルの比率変換を含み、それには、試験試料中の2つの遺伝子の発現産物レベルの比を決定してそれを参照標準中の同じ2つの遺伝子の適切な比と比較すること、試験試料中の2つ以上の遺伝子の発現産物レベルを決定して任意の適切な対照における発現産物レベルの差を決定すること、試験試料中の2つ以上の遺伝子の発現産物レベルを決定してそれらの発現を試験試料中のハウスキーピング遺伝子の発現に正規化し、任意の適切な対照と比較すること、が含まれるがこれらに限定されない。特に好ましい実施形態では、対照は、試験試料と同じ系統および／または種類である対照試料を含む。別の実施形態では、対照は、癌を有するすべての患者などの一連の患者試料内またはそれに基づくパーセンタイルとしてグループ化された発現産物レベルを含み得る。一実施形態では、例えば特定のパーセンタイルと比較して発現産物のより高いまたはより低いレベルが、結果を予測するための基礎として使用される、対照発現産物レベルが確立される。別の好ましい実施形態では、対照発現産物レベルは、既知の結果を有する癌対照患者由来の発現産物レベルを使用して確立され、試験試料からの発現産物レベルは、結果を予測するための基礎として対照発現産物レベルと比較される。以下のデータによって実証されるように、本発明の方法は、試験試料中の発現産物のレベルを対照と比較する際、特定のカットポイントの使用に限定されない。

10

20

【0028】

本明細書で使用する場合、活性化免疫細胞に関して「同時刺激する」という用語は、同時刺激分子が増殖またはエフェクター機能を誘導する第2の非活性化受容体媒介シグナル（「同時刺激シグナル」）を提供する能力を含む。例えば、同時刺激シグナルは、例えば、T細胞受容体媒介シグナルを受け取ったT細胞におけるサイトカイン分泌をもたらし得る。例えば、活性化受容体を介して細胞受容体媒介シグナルを受け取った免疫細胞は、本明細書では「活性化免疫細胞」と呼ばれる。

【0029】

「癌の診断」という用語は、個体における癌またはそのサブタイプの有無を決定するための本発明の方法、システム、およびコードの使用を含む。この用語には、個体における疾患活動性のレベルを評価するための方法、システム、およびコードも含まれる。診断は、治療的処置を提供する薬剤によって直接実施することができる。あるいは、治療薬を提供する人は、実行される診断アッセイを要求することができる。診断医および／または治療介入医は、診断アッセイの結果を解釈して治療戦略を決定することができる。同様に、そのような代替プロセスは、予後アッセイなどの他のアッセイにも適用できる。

30

【0030】

分子が基質に関して共有結合または非共有結合している場合、分子のかなりの部分が基質から解離することなく、流体（例えば、標準食塩クエン酸緩衝液、pH 7.4）ですすぐことができ、分子は基質に「固定」または「付着」されている。

【0031】

本明細書で 사용되는「遺伝子発現データ」または「遺伝子発現レベル」という用語は、細胞または細胞群における遺伝子または遺伝子群の発現の相対的または絶対レベルに関する情報を指す。遺伝子発現レベルは、遺伝子によってコードされるmRNAなどのRNAのレベルに基づいて決定され得る。あるいは、発現レベルは、遺伝子によりコードされるポリペプチドまたはその断片のレベルに基づいて決定され得る。遺伝子発現データは、個々の細胞、または腫瘍や生検試料などの細胞群について取得できる。遺伝子発現データおよび遺伝子発現レベルは、コンピューター読み取り可能な媒体、例えば、マイクロアレイまたはチップ読み取り装置と組み合わせて使用されるコンピューター読み取り可能な媒体に保存することができる。そのような遺伝子発現データを操作して、遺伝子発現シグネチャを生成することができる。

40

50

【0032】

本明細書で使用される「遺伝子発現シグネチャ」または「シグネチャ」という用語は、協調的に発現される遺伝子群を指す。このシグネチャを構成する遺伝子は、特定の細胞系統、分化段階、または特定の生物学的応答中に発現し得る。遺伝子は、癌の原発部位の細胞、生検における非悪性細胞の性質、および癌の原因となる発癌メカニズムなど、それらが発現される腫瘍の生物学的側面を反映することができる。

【0033】

本明細書で使用される「相同」または「相同性」という用語は、同じ核酸鎖の2つの領域間または2つの異なる核酸鎖の領域間のヌクレオチド配列の類似性を指す。両方の領域のヌクレオチド残基の位置が同じヌクレオチド残基で占められている場合、領域はその位置で相同である。各領域の少なくとも1つのヌクレオチド残基位置が同じ残基によって占められている場合、第1の領域は第2の領域と相同である。2つの領域間の相同性は、同じヌクレオチド残基が占める2つの領域のヌクレオチド残基位置の割合で表される。例として、ヌクレオチド配列5'-ATTGCC-3'を有する領域およびヌクレオチド配列5'-TATGGC-3'を有する領域は、50%の相同性を共有する。好ましくは、第1領域は第1部分を含み、第2領域は第2部分を含み、それにより各部分のヌクレオチド残基位置の少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約75%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%が、同じヌクレオチド残基によって占められている。より好ましくは、各部分のすべてのヌクレオチド残基位置は、同じヌクレオチド残基によって占められている。

【0034】

「宿主細胞」という用語は、本発明の組換え発現ベクターなどの本発明の核酸が導入されている細胞を指すことを意図している。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書で互換的に使用される。そのような用語は、特定の対象細胞だけでなく、そのような細胞の子孫または潜在的な子孫も指すことを理解されたい。変異または環境の影響のいずれかにより、後続の世代で特定の変異が発生する可能性があるため、そのような子孫は実際には親細胞と同一ではないかもしれないが、本明細書で使用される用語の範囲内に含まれる。

【0035】

本明細書で使用される「ヒト化抗体」という用語は、例えばヒト細胞によって作られる抗体により類似するように変更された可変および定常領域を有する非ヒト細胞によって作られる抗体を含むことを意図する。非ヒト抗体のアミノ酸配列を変更して、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に見られるアミノ酸を組み込む。ヒト化抗体には、例えばCDR中のヒトの生殖細胞系免疫グロブリン配列によってコードされていないアミノ酸残基（例えば、インビトロでのランダムまたは部位特異的変異によりまたはインビボでの体細胞変異により導入された変異）が含まれてもよい。

【0036】

本明細書で使用される「ヒト化抗体」という用語は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列に移植された抗体も含む。

【0037】

本明細書で使用される「免疫細胞」という用語は、免疫応答に役割を果たす細胞を指す。免疫細胞は造血系起源であり、B細胞およびT細胞、ナチュラルキラー細胞などのリンパ球や、単球、マクロファージ、好酸球、マスト細胞、好塩基球、顆粒球などの骨髄細胞が含まれる。

【0038】

本明細書で使用される「免疫応答」という用語は、T細胞媒介性および／またはB細胞媒介性免疫応答を含む。例示的な免疫応答には、T細胞応答、例えばサイトカイン産生および細胞毒性が含まれる。さらに、免疫応答という用語には、T細胞の活性化、例えば抗体産生（体液性応答）およびサイトカイン応答性細胞、例えばマクロファージの活性化によって間接的に影響を受ける免疫応答が含まれる。

【0039】

「免疫療法剤」という用語は、宿主の免疫系を刺激して対象の腫瘍または癌に対する免疫応答を生じさせることができる、任意の分子、ペプチド、抗体または他の薬剤を含むことができる。様々な免疫療法剤は、本明細書に記載の組成物および方法において有用である。免疫療法剤クラスの多数の抗癌剤が当技術分野で周知であり、PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4などの機能をブロックまたは阻害する抗体が含まれるが、これらに限定されない。

【0040】

本明細書で使用される場合、「阻害する」という用語は、例えば特定のアクション、機能、または相互作用の減少、制限、または遮断を含む。例えば、過剰増殖性成長などの癌の少なくとも1つの症状が緩和、終結、減速、または予防される場合、癌は「阻害」される。本明細書で使用される場合、癌の再発または転移が減少、遅延、または予防される場合も、癌はまた「阻害」される。

10

【0041】

本明細書で使用される「阻害シグナル」という用語は、免疫細胞上のポリペプチドの阻害受容体（例えばCTLA-4またはPD-1）を介して伝達されるシグナルを指す。そのようなシグナルは、活性化受容体を介して（例えば、TCR、CD3、BCR、またはFcポリペプチドを介して）シグナルに拮抗して、例えば、二次メッセンジャー生成の阻害、増殖の阻害、免疫細胞におけるエフェクター機能の阻害、例えば食作用の減少、抗体産生の減少、細胞毒性の減少、免疫細胞のメディエーター（サイトカイン（IL-2など）および／もしくはアレルギー反応のメディエーターなど）を産生することの不全、またはアレルギーの発達、をもたらし得る。

20

【0042】

本明細書で使用する場合、「相互作用」という用語は、2つの分子間の相互作用を指す場合、分子と相互の物理的接触（例えば、結合）を指す。一般的に、そのような相互作用は、前記分子の一方または両方の活性（生物学的効果を生み出す）をもたらす。活性は、分子の一方または両方の直接的な活性であってもよい。あるいは、相互作用における一方または両方の分子は、それらのリガンドとの結合を妨げられる可能性があり、したがって、リガンド結合活性に関して不活性に保たれる（例えば、そのリガンドと結合し、免疫応答を誘発または阻害する）。そのような相互作用を阻害することにより、相互作用に関与する1つ以上の分子の活性が破壊される。そのような相互作用を強化することは、前記物理的接触の可能性を延長または増加させ、前記活性の可能性を延長または増加させることである。

30

【0043】

本明細書で使用される「単離された抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を指すことを意図している。さらに、単離された抗体は、他の細胞物質および／または化学物質を実質的に含まないでよい。

【0044】

本明細書で使用する「単離されたタンパク質」は、細胞から単離された場合、または組換えDNA技術により生成された場合、他のタンパク質、細胞材料、分離培地、および培地を実質的に含まないタンパク質、または化学合成された場合の化学前駆体または他の化学物質を含まないタンパク質を指す。「単離された」または「精製された」タンパク質またはその生物学的に活性な部分は、抗体、ポリペプチド、ペプチドもしくは融合タンパク質が由来する細胞または組織源からの細胞物質または他の混入タンパク質を実質的に含まないか、または化学的に合成された場合、化学前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない。「細胞物質を実質的に含まない」という言葉には、本発明の組成物が、それらが単離されまたは組換え生産される細胞の細胞成分から分離されている、調製物が含まれる。一実施形態では、「細胞物質を実質的に含まない」という言葉には、細胞物質が約30%、20%、10%、または5%（乾燥重量で）未満の調製物が含まれる。抗体、ポリペプチド、ペプチドもしくは融合タンパク質またはそれらの断片、例えばそれらの生物学的

40

50

に活性な断片が組換え生産される場合、それはまた、好ましくは培地を実質的に含まない、すなわち、培地は、タンパク質調製物の体積の、約20%未満、より好ましくは約10%未満、最も好ましくは約5%未満となる。

【0045】

「キット」は、本発明のマーカーの発現を特異的に検出または調節するための少なくとも1つの試薬、例えばプローブを含む任意の製造物（例えば、パッケージまたは容器）である。キットは、本発明の方法を実施するためのユニットとして宣伝、配布、または販売することができる。

【0046】

「びまん性胃癌」という用語は、「印環細胞胃癌」または「形成性胃組織炎」とも呼ばれる特定の種類の胃癌を指す。胃の1つの領域に留まるのではなく、胃の多くに影響を及ぼす傾向がある。固形腫瘍はない。代わりに、癌性（悪性）細胞が胃の裏層の下で増殖し、裏層を厚く硬くする。このタイプの癌の浸潤性により、これらの癌細胞は肝臓や近くの骨などの他の組織に広がる（転移する）可能性が高くなる。すべての胃癌の約20%はびまん性胃癌であり、少数は遺伝性びまん性胃癌（HDGC）によるものである。HDGCは遺伝性の遺伝子疾患である。HDGCに最も一般的に関連する遺伝子はCDH1と呼ばれる。CDH1遺伝子の変異（変化）は、人の胃癌やHDGCに関連する他の癌を発症するリスクを高める。CTNNA1を含む他の遺伝子はHDGCと関連している可能性がある。

10

【0047】

内視鏡検査とバリウムX線分析は、胃癌の診断に使用できる。CTスキャン、PETスキャン、内視鏡超音波検査、および腹腔鏡による病期分類から選択された1つ以上の検査を使用して、胃腫瘍の病期を決定できる。びまん性胃癌は、上部内視鏡検査では癌が見えないため、診断が困難である。このため、びまん性胃癌のほとんどの症例は後期（IIIまたはIV）に診断され、生存率の低下に関連している。びまん性胃癌の複数の症例がある家族、ならびに40歳以前にびまん性胃癌と診断された患者は、CDH1遺伝子変異の検査を推奨される。現在のスクリーニングの推奨事項は、毎年の生検による上部内視鏡検査である。特に病気が初期段階にある場合、手術（例、部分的胃切除術または胃全摘術）が最も一般的な治療アプローチである。より進行した胃癌の場合、化学療法、放射線療法、またはこれらのアプローチの組み合わせなど、手術に加えて治療が使用できる。

20

30

【0048】

浸潤性小葉癌（ILC）とも呼ばれる「乳小葉癌」という用語は、小葉の壁を突き破り、乳房の組織に浸潤し始めた癌を指す。ILCは、浸潤性乳管癌（乳管（milk-carrying duct）で始まり、それを超えて広がる癌）に次いで2番目に多い乳癌である。米国癌協会によると、米国では18万人以上の女性が毎年浸潤性乳癌に罹患していることが判明している。すべての浸潤性乳癌の約10%は浸潤性小葉癌である。

【0049】

ILCは、独特の分岐パターンで広がるため、他の形態の乳癌よりも診断が難しい場合がある。浸潤性小葉癌の診断には通常、乳房の物理的検査、マンモグラフィ、超音波、乳房MRI、および生検（例えば、穿刺吸引生検、コア針生検、切開生検、切除生検など）を含む手順の組み合わせが含まれる。組織試料は顕微鏡下での検査のために病理学者に送られる。病理学者は、浸潤性小葉癌に典型的な細胞の外観と成長パターンを探す。病理学者は、E-カドヘリンタンパク質研究と呼ばれる特別な検査を注文することもできる。この変異について浸潤性小葉癌細胞を検査することは、インサイチュでそれを上皮内小葉癌、癌ではない小葉の異常細胞群と区別するのに役立つ。浸潤性小葉癌は、ステージI（最も初期の段階）からステージIV（最も進行した段階）までのスケールで記述される。病期分類は、腫瘍の大きさ、リンパ節転移、および体の他の部位に拡がっているかどうかに関連している。数値が大きいほど、より進行した段階を表す。

40

【0050】

浸潤性小葉癌の治療は、局所治療と全身治療の2つの広いカテゴリーに分類される。手

50

術や放射線療法などの局所治療は、浸潤性小葉癌（ILC）自体と、胸部やリンパ節などの癌の影響を受ける可能性のある任意の周辺領域を治療するために行われる。可能な外科的手技には、乳腺腫瘍摘出術、乳房切除術、センチネルリンパ節郭清、および腋窩リンパ節郭清が含まれる。放射線療法を行う可能な方法には、体外照射、体内部分乳房照射、および体外部分乳房照射が含まれる。浸潤性小葉癌（ILC）が発見された領域（または複数領域）に焦点を当てた局所治療とは異なり、全身治療は全身に関与する。化学療法、ホルモン療法、その他の標的療法などの治療は、原発性腫瘍から離れた可能性のある癌細胞を破壊し、ならびに浸潤性小葉癌が再発するリスクを減少させるために使用される。浸潤性小葉癌の治療に使用できる多くの化学療法のほんの一部の例には、アドリアマイシン、エレンス（E l l e n c e）、シトキサン、タキソテール、タキソール、ゼローダ、イグゼンプラ、メトトレキサート、およびフルオロウラシルが含まれる。ホルモン療法は、抗エストロゲン療法とも呼ばれ、体内のエストロゲンの量を減少させるか、エストロゲンが乳癌細胞にシグナルを送って増殖するのをブロックすることで機能する。最も頻繁に使用されるホルモン療法には以下の2つのタイプがある：選択的エストロゲン受容体モジュレーター（SERM）およびアロマターゼ阻害剤。他の種類のホルモン療法には、エストロゲン受容体ダウンレギュレーター（ERD）および卵巣の機能停止または除去が含まれる。浸潤性小葉癌がHER2陽性の場合、HER2を標的とする治療法（ハーセプチンやタケケルブなど）を使用できる。ホルモン療法やHER2標的療法と同様に、他の標的療法は、乳癌細胞の増殖と成長を可能にする特定のプロセスを妨げるように設計されている。ほんの一例は、血管内皮成長因子（VEGF）と呼ばれるタンパク質を標的とする薬剤であるアバスタチン（化学名：ベバシズマブ）であり、新しい血管の形成と成長を刺激することを防ぐことができる。

10

20

【表 1】

EMTのマーカー

獲得性マーカー		弱毒化マーカー	
名称	EMTタイプ	名称	EMTタイプ
細胞表面タンパク質			
N-カドヘリン	1, 2		
OB-カドヘリン	3	E-カドヘリン	1, 2, 3
$\alpha 5 \beta 1$ インテグリン	1, 3	ZO-1	1, 2, 3
$\alpha V \beta 6$ インテグリン	1, 3		
シンデカン-1	1, 3		
細胞骨格マーカー			
FSP1	1, 2, 3	サイトケラチン	1, 2, 3
α -SMA	2, 3		
ビメンチン	1, 2		
β -カテニン	1, 2, 3		
ECMタンパク質			
$\alpha 1$ (I) コラーゲン	1, 3	$\alpha 1$ (IV) コラーゲン	1, 2, 3
$\alpha 1$ (III) コラーゲン	1, 3	ラミニン1	1, 2, 3
フィブロネクチン	1, 2		
ラミニン5	1, 2		
転写因子			
Snail1 (カタツムリ)	1, 2, 3		
Snail2 (ナメカジ)	1, 2, 3		
ZEB1	1, 2, 3		
CBF-A/KAP-a 複合体	2, 3		
Twist	1, 2, 3		
LEF-1	1, 2, 3		
Ets-1	1, 2, 3		
FOXC2	1, 2		
グースコイド	1, 2		
マイクロRNA			
miR10b	2	Mir-200ファミリー	2
miR-21	2, 3		
ZEB1、ジンクフィンガーE-box結合ホメオボックス1.			

【0051】

「上皮間葉転換 (EMT)」という用語は、通常、基底表面を介して基底膜と相互作用する分極上皮細胞が、間葉細胞表現型を想定できる複数の生化学的変化を起こすことを可能にする生物学的プロセスを指し、これには、遊走能力の強化、侵襲性、アポトーシスに対する抵抗性の向上、およびECM成分の生産の大幅な増加が含まれる。EMTの完了は、基底となる基底膜の分解と、それが発生した上皮層から離れて移動できる間葉系細胞の形成によって示される。EMTを開始し、完了に到達できるようにするために、多くの異なる分子プロセスが関与している。これらには、転写因子の活性化、特定の細胞表面タンパク質の発現、細胞骨格タンパク質の再編成と発現、ECM分解酵素の産生、特定のマイクロRNAの発現の変化が含まれる。多くの場合、関与する因子は、EMTを介して細胞が通過することを示すバイオマーカーとしても使用される。E-カドヘリンの喪失は、EMTの基本事象であると考えられている。EMTは、中胚葉形成や神経管形成など、多数

10

20

30

40

50

の発達プロセスに不可欠である。E M Tは、創傷治癒、臓器線維化、および癌進行の転移の開始でも発生することが示されている。転移の開始には浸潤が必要であり、これはE M Tによって可能になる。原発腫瘍の癌細胞は、Eーカドヘリン抑制によって媒介される細胞間接着を失い、浸潤性が増加した基底膜を突き破り、血管内侵入によって血流に入る。

「E M T癌」という用語は、E M Tプロセスを起こしつつあるか、または既に起こしているあらゆる種類の癌を指す。E M T癌には、びまん性胃癌、乳小葉癌、転移性乳癌、転移性肺癌、転移性非小細胞肺癌、結腸癌、膵臓癌、前立腺癌、脳癌、黒色腫が含まれるが、これらに限定されない。

【0052】

E M Tでは、間葉状態に転換する上皮細胞は極性を失い、いくつかの転写因子の発現を増加させ（表1を参照）、Eーカドヘリン、シンデカン1、および閉鎖帯1（ZO1）の発現を喪失し、細胞骨格タンパク質の合成を増加させ（下記を参照）、アクチンストレスファイバーの再配列、紡錘状になって、より移動性になる。これらのE M T様細胞は、アポトーシスや癌の化学療法にも耐性がある。

【0053】

E M Tを実証するために、様々なバイオマーカーが使用されており、その一部は獲得され、一部は転換中に弱毒化される（表1を参照）。Eーカドヘリンの発現の変化は、E M Tの原型上皮細胞マーカーであり、Eーカドヘリン機能の喪失はE M Tを促進する。EーカドヘリンからNーカドヘリンへのカドヘリンの切り替えは、間葉系細胞、線維芽細胞、癌細胞、および神経組織で発現され、多くの場合、E M Tの進行を監視するために使用されている。F S P 1は、C a 2 +結合S 1 0 0タンパク質ファミリーのメンバーである。これは、癌および線維形成におけるE M Tを検出するためのプロトタイプの線維芽細胞マーカーである。カタツムリ転写因子は、E M Tを調節する様々なシグナル伝達経路の一般的な下流標的の顕著な一例である。

【0054】

「調節する」という用語には、アップレギュレーションおよびダウンレギュレーション、例えば、応答の増強または阻害が含まれる。

【0055】

C D H 1、R H O Aなどのバイオマーカーの「正常」または「対照」発現レベルは、癌などの関心のある疾患に罹患していない例えばヒトの患者などの対象の細胞におけるバイオマーカーの発現レベルである。バイオマーカーの「過剰発現」または「有意に高い発現レベル」とは、発現を評価するために使用されるアッセイの標準誤差よりも大きい試験試料の発現レベルを指し、対照試料（例えば、関心のある疾患を有していない健康な対象からの試料）の発現活性またはバイオマーカーのレベルならびに好ましくは、いくつかの対照試料におけるバイオマーカーの平均発現レベルよりも好ましくは少なくとも1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20倍以上高い。バイオマーカーの「有意に低い発現レベル」とは、対照試料（例えば、関心のある疾患のない健康な対象からの試料）の発現活性またはバイオマーカーのレベルならびに好ましくは、いくつかの対照試料におけるバイオマーカーの平均発現レベルよりも少なくとも1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20倍以上低い試験試料の発現レベルを指す。

【0056】

本明細書に記載される「前悪性病変」という用語は、癌ではないが、癌になる可能性を有する病変を指す。「前悪性疾患」または「潜在的な悪性疾患」という用語も含まれる。

特に、これは悪性形質転換について通常のリスクよりも大きい良性、形態学のおよび／または組織学的に変化した組織を指し、および局所組織の臨床的外観を必ずしも変化させないが、その組織における前癌病変または癌発生（白板症、紅板症、紅白板症扁平苔癬（苔癬様反応）および組織学的検査で異型の細胞または異形成が示された任意の病変または領域、について通常のリスクより大きな関連がある疾患または患者の習慣を指す。

【0057】

「プローブ」という用語は、具体的に意図された標的分子、例えば、マーカーによってコードされるかまたはマーカーに対応するヌクレオチド転写物またはタンパク質に選択的に結合することができる任意の分子を指す。プローブは、当業者によって合成されるか、適切な生物学的調製物に由来するかのいずれかである。標的分子の検出の目的のために、プローブは、本明細書に記載されるように、標識されるように特に設計され得る。プローブとして利用できる分子の例には、RNA、DNA、タンパク質、抗体、および有機分子が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0058】

「予後」という用語には、癌の可能性のある経過および結果の予測、または疾患からの回復の可能性が含まれる。いくつかの実施形態において、統計的アルゴリズムの使用は、個体の予後の癌を提供する。例えば、予後は、手術、黒色腫の臨床的サブタイプの発症、1つ以上の臨床的要因の発症、腸癌の発症、または疾患からの回復であり得る。いくつかの実施形態では、用語「良好な予後」は、黒色腫の治療後の予想されるまたは可能性の高い結果が良好であることを示す。「予後不良」という用語は、黒色腫の治療後の予想されるまたは可能性の高い結果が良好でないことを示す。

20

【0059】

「耐性」という用語は、癌試料もしくは哺乳動物の癌治療に対する後天的または自然な耐性（すなわち、治療的処置に対して非応答性である、または治療的処置に対する応答が減少または制限されている）を指し、例えば、治療的処置に対する応答が25%、またはそれ以上、例えば、30%、40%、50%、60%、70%、80%、またはそれ以上から、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍以上で、減少する。応答の減少は、耐性が獲得される前に同じ癌試料もしくは哺乳動物と比較するか、または治療的処置に対する耐性がないことが知られている別の癌試料もしくは哺乳動物と比較することによって測定できる。化学療法に対する典型的な獲得耐性は「多剤耐性」と呼ばれる。多剤耐性は、P糖タンパク質によって媒介されるか、他のメカニズムによって媒介されるか、または哺乳動物が多剤耐性微生物または微生物の組み合わせに感染したときに発生する可能性がある。治療的処置に対する耐性の決定は、当技術分野で日常的であり、通常熟練した臨床医の技量の範囲内であり、例えば、本明細書で「感作されている」と記載される細胞増殖アッセイおよび細胞死アッセイにより測定することができる。いくつかの実施形態では、「耐性を逆転させる」という用語は、原発性癌療法（例えば、化学療法または放射線療法）単独では未治療の腫瘍の腫瘍体積と比較して腫瘍体積の統計的に有意な減少をもたらすことができない状況下で、未治療の腫瘍の腫瘍体積と比較した場合に、原発性癌療法（例えば、化学療法または放射線療法）と組み合わせた第2の薬剤を使用が、統計的有意性のレベル（例えば、 $p < 0.05$ ）で腫瘍体積の有意な減少をもたらすことができることを意味する。これは一般に、未治療の腫瘍が対数で規則正しく成長しているときに行われた腫瘍体積測定に適用される。

30

40

【0060】

「感作させる」という用語は、癌療法（例えば、化学療法または放射線療法）による関連する癌のより効果的な治療を可能にする方法で、癌細胞または腫瘍細胞を変えることを意味する。いくつかの実施形態では、正常細胞は、癌治療（例えば、化学療法または放射線療法）によって正常細胞が過度に損傷される程度には影響を受けない。治療的処置に対する感受性の増加または減少した感受性は、特定の治療についての当該技術分野で既知の方法および本明細書において以下に記載される方法に従って測定され、これらは限定されないが、細胞増殖アッセイ（Tanigawa N, Kern D H, Kikasa

50

Y, Morton D L, Cancer Res 1982; 42: 2159-2164)、細胞死アッセイ (Weisenthal L M, Shoemaker R H, Marsden J A, Dill P L, Baker J A, Moran E M, Cancer Res 1984; 94: 161-173、Weisenthal L M, Lippman M E, Cancer Treat Rep 1985; 69: 615-632、Weisenthal L M, In: Kaspers G J L, Pieters R, Twentymann P R, Weisenthal L M, Veerman A J P, eds. Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma. Langhorne, P A: Harwood Academic Publishers, 1993: 415-432、Weisenthal L M, Contrib Gynecol Obstet 1994; 19: 82-90) が含まれる。一定期間、例えば、ヒトでは6ヶ月、マウスでは4~6週間にわたって腫瘍サイズの減少を測定することにより、動物の感受性または耐性を測定することもできる。組成物または方法は、そのような組成物または方法の非存在下での治療感受性または治療耐性と比較して、治療感受性の増加または耐性の減少が25%、またはそれ以上、例えば30%、40%、50%、60%、70%、80%、またはそれ以上、から2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍以上である場合、治療的処置に対する応答を感作させている。治療的処置に対する感受性または耐性の決定は、当技術分野で日常的であり、通常の熟練した臨床医の技量の範囲内である。癌療法の効力を増強するための本明細書に記載の任意の方法は、過剰増殖性またはそうでなければ癌性細胞（例えば、耐性細胞）を癌療法に対して感作させる方法に等しく適用できることを理解されたい。

【0061】

「RHOA」という用語は、低分子量GTPaseのRhoファミリーのメンバーであるRasホモログファミリーメンバーA (Ras Homolog Family Member A) を指し、不活性GDP結合状態と活性GTP結合状態の間を循環し、シグナル伝達カスケードの分子スイッチとして機能する。Rhoタンパク質は、アクチン細胞骨格の再編成を促進し、細胞の形状、付着、運動性を調節する。この遺伝子の過剰発現は、腫瘍細胞の増殖と転移に関連している。複数の選択的スプライスバリエーションが特定されている。「RHOA」という用語は、その断片、バリエーション（例えば、対立遺伝子バリエーション）、および誘導体を含むことを意図している。代表的なヒトRHOA cDNAおよびヒトRHOAタンパク質配列は当技術分野で周知であり、国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) から公的に入手可能である。ヒトRHOAアイソフォームには、最長のアイソフォーム1 (NM_001664. 3およびNP_001655. 1)、短いアイソフォーム2 (NM_001313941. 1およびNP_001300870. 1、バリエーション1と比較して5' UTRが異なるが、同じタンパク質をコードする)、3 (NM_001313943. 1およびNP_001300872. 1、代替の3' コーディングエクソンを含み、アイソフォーム1と比較して短く異なるC末端をもたらす)、4 (NM_001313944. 1およびNP_001300873. 1、3' コーディング領域で2つの代替インフレームスプライス部位を使用し、アイソフォーム1と比較してより短いアイソフォームをもたらす)、5 (NM_001313945. 1およびNP_001300874. 1、5' 領域の代替スプライス部位を使用し、下流の開始コドンを使用して、アイソフォーム1と比較して短いN末端をもたらす)、6 (NM_001313946. 1およびNP_001300875. 1、3' コーディング領域に2つの代替インフレームエクソンを欠きを欠き、アイソフォーム1と比較してより短いアイソフォームをもたらす)、および7 (NM_001313947. 1およびNP_001300876. 1、5' コーディング領域に代替エクソンを欠き、フレームシフトが生じ、アイソフォーム1と比較して、異なるC末端を有する短いアイソフォームをもたらす) が含まれる。ヒト以外の生物のRHOAオーソログの核酸およびポリペプチド配列は周知であり、例えば、チンパンジーRHOA (XM_001163851. 5およびXP_001163851. 3)、イヌRHOA (NM_001003273. 3およびNP_00100

3 2 7 3. 2)、ウシRHOA (NM__1 7 6 6 4 5. 3およびNP__7 8 8 8 1 8. 1)、マウスRHOA (NM__0 0 1 3 1 3 9 6 1. 1およびNP__0 0 1 3 0 0 8 9 0. 1、NM__0 0 1 3 1 3 9 6 2. 1およびNP__0 0 1 3 0 0 8 9 1. 1、およびNM__0 1 6 8 0 2. 5およびNP__0 5 8 0 8 2. 2)、およびラットRHOA (XM__0 0 6 2 4 3 6 9 9. 1およびXP__0 0 6 2 4 3 7 6 1. 1、XM__0 0 6 2 4 3 7 0 0. 1およびXP__0 0 6 2 4 3 7 6 2. 1、およびXM__0 0 6 2 4 3 7 0 1. 1およびXP__0 0 6 2 4 3 7 6 3. 1)が含まれる。

【0062】

「ドミナントネガティブRHOA」という用語は、1つ以上の変異を保有し、そのためGTPに結合できず、ドミナントネガティブな様式で作用して、Rh o A GTPローディングを阻害し、内在性RHOAおよび他のGTPaseの減衰をもたらす、RHOA遺伝子またはタンパク質を指す。いくつかの実施形態において、それらは、他のGTPase活性化タンパク質およびグアニン交換因子を隔離することができる。これらの変異には、T19N、G17V、およびG17Eが含まれるが、これらに限定されない。代表的な「ドミナントネガティブRh o A」は、表2および表3に示されている配列で示されている。

【0063】

「CDH1」という用語は、カドヘリンスーパーファミリーの古典的なカドヘリンであるカドヘリン1を指す。この遺伝子は、16番染色体上のカドヘリンファミリーの他のメンバーとともに遺伝子クラスターに存在する。選択的スプライシングは複数の転写バリエーションをもたらす、そのうちの少なくとも1つはタンパク質分解処理されて成熟糖タンパク質を生成するプレプロタンパク質をコードする。このカルシウム依存性細胞間接着タンパク質は、5つの細胞外カドヘリンリピート、膜貫通領域、高度に保存された細胞質尾部で構成されている。タンパク質の構造と機能の関係は周知である。例えば、細胞内ドメインには、カテニン分子（ベータカテニンなど）の結合、したがってE-カドヘリン機能に不可欠な高度にリン酸化された領域が含まれている。この遺伝子の変異は、胃癌、乳癌、結腸直腸癌、甲状腺癌、卵巣癌と関連している。エクソン8または9のインフレームスキッピングとエクソン10の欠失は、びまん型胃癌で実証されている。E-カドヘリンの細胞外ドメインに主に影響するエクソン7（浸潤性乳癌）、12および13（子宮内膜癌）、および16（卵巣癌）の点変異も実証されている。おそらく、CDH1の変異を示す最も知られている腫瘍は、浸潤性の乳房の小葉癌およびびまん性胃癌であり、これらの腫瘍の約50%が影響を受けている。CDH1の生殖細胞系変異は様々な家系で検出されており、その結果、印環細胞を伴う低分化びまん型腺癌が発生する。「遺伝性びまん性胃癌（HDGC）症候群」という用語は、罹患患者を説明するために作られている。CDH1遺伝子の機能の喪失は、増殖、浸潤、および／または転移の増加により癌の進行に寄与する。このタンパク質の外部ドメインは、哺乳動物細胞への細菌の接着を媒介する可能性もあり、細胞質ドメインは内在化に必要である。

【0064】

複数の選択的スプライスバリエーションが特定されている。「CDH1」という用語は、その断片、バリエーション（例えば、対立遺伝子バリエーション）、および誘導体を含むことを意図している。代表的なヒトCDH1 cDNAおよびヒトCDH1タンパク質配列は当技術分野で周知であり、国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）から公的に入手可能である。ヒトCDH1アイソフォームには、最も長いアイソフォーム1（NM__004360. 4およびNP__004351. 1）、より短いアイソフォーム2（NM__001317184. 1およびNP__001304113. 1、バリエーション1と比較して中央コーディング領域に代替エクソンを欠く）、3（NM__001317185. 1およびNP__001304114. 1、その5'UTRのエクソンで代替スプライス部位を使用し、異なる5'UTRをもたらす、バリエーション1と比較して下流の開始部位を使用する）および4（NM__001317186. 1およびNP__001304115. 1、その5'UTRにエクソンを欠き、異なる5'UTRをもたらす、バリエーション1と比較して下流の開

10

20

30

40

50

始部位を使用する)が含まれる。ヒト以外の生物のCDH1オーソログの核酸およびポリペプチド配列は周知であり、例えば、チンパンジーCDH1(XM__001168150.4およびXP__001168150.1、XM__016930064.1およびXP__016785553.1、XM__016930063.1およびXP__016785552.1)、サルCDH1(XM__015126485.1およびXP__014981971.1、2.XM__015126486.1およびXP__014981972.1)、犬CDH1(NM__001287125.1およびNP__001274054.1)、牛CDH1(NM__001002763.1およびNP__001002763.1)、マウスCDH1(NM__009864.3およびNP__033994.1)、およびラットCDH1(NM__031334.1およびNP__112624.1)が含まれる。

10

【0065】

「相乗効果」という用語は、2つ以上の抗癌剤または化学療法薬の併用効果が、抗癌剤または化学療法薬単独の個別の効果の合計よりも大きくできることを指す。

【0066】

「対象」という用語は、健康な動物、哺乳動物またはヒト、または重大な疾患（例えば、癌）に罹患した動物、哺乳動物またはヒトを指す。「対象」という用語は「患者」と交換可能である。いくつかの実施形態では、対象は黒色腫以外の癌がない。他の実施形態では、対象は黒色腫を有するが、重大な1つ以上の他の癌がない。例えば、いくつかの実施形態では、対象は腎細胞癌、頭頸部癌、および／または肺癌がない。

【0067】

「化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」という言葉には、タンパク質の合成に関与する化学前駆体または他の化学物質からタンパク質が分離される抗体、ポリペプチド、ペプチドまたは融合タンパク質の調製物が含まれる。一実施形態では、「化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」という言葉には、（乾燥重量で）約30%未満の化学前駆体もしくは非抗体、ポリペプチド、ペプチドもしくは融合タンパク質化学物質、より好ましくは約20%未満の化学前駆体もしくは非抗体、ポリペプチド、ペプチドもしくは融合タンパク質化学物質、さらにより好ましくは約10%未満の化学前駆体もしくは非抗体、ポリペプチド、ペプチドもしくは融合タンパク質化学物質、および最も好ましくは、約5%未満の化学前駆体もしくは非抗体、ポリペプチド、ペプチドもしくは融合タンパク質化学物質、を有する抗体、ポリペプチド、ペプチドまたは融合タンパク質の調製物が含まれる。

20

30

【0068】

「実質的に純粋な細胞集団」という用語は、全細胞集団を構成する細胞の、少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約75~80%、より好ましくは少なくとも約85~90%、最も好ましくは、少なくとも約95%である特定の細胞マーカー特性および分化能を有する細胞の集団を指す。したがって、「実質的に純粋な細胞集団」とは、指定されたアッセイ条件下で、特定のマーカー特性および分化能を示さない細胞の約50%未満、好ましくは約20~25%未満、より好ましくは約10~15%未満、最も好ましくは約5%未満を含有する細胞集団を指す。

【0069】

本明細書で使用される「生存」という用語には、以下のすべてが含まれる：全生存としても知られる、死亡までの生存（死亡は原因に関係ないかまたは腫瘍に関連するかのいずれかであってよい）、「無再発生存」（再発という用語には、局所再発と遠隔再発の両方が含まれる）、転移のない生存、無疾患生存（疾患という用語には、癌およびそれに関連する疾患が含まれる）。前記生存の長さは、定義された開始点（例えば、診断の時間または治療の開始）および終了点（例えば、死、再発または転移）を参照することにより計算され得る。さらに、治療の有効性の基準は、化学療法への応答、生存の可能性、所定の期間内の転移の可能性、および腫瘍の再発の可能性を含むように拡大することができる。

40

【0070】

「転写されたポリヌクレオチド」または「ヌクレオチド転写物」は、本発明のマーカー

50

の転写、およびもしあれば、RNA転写物の通常の転写後プロセッシング（例えば、スプライシング）、およびRNA転写物の逆転写、によって作製された成熟mRNAのすべてまたは一部に対して相補的または相同である、ポリヌクレオチド（例えば、mRNA、hnRNA、cDNA、成熟miRNA、pre-miRNA、pri-miRNA、miRNA*、piwiRNA、anti-miRNA、またはmiRNA結合部位、またはそのバリエーション、またはそのようなRNAまたはcDNAの類似体）である。いくつかの態様において、転写されたポリヌクレオチドは、翻訳されたタンパク質を本来コードしない転写されたポリヌクレオチドとして定義される「長鎖ノンコーディングRNA」または「lncRNA」である。lncRNAは一般に約100ヌクレオチドよりも長い配列であり、長さの定義はmicroRNA、siRNA、piwi関連RNAなどの従来の小さな核酸を区別するための便宜であるが、数十キロベースまでの長さがある。lncRNAは、タンパク質をコードする遺伝子（長鎖の遺伝子間ncRNAまたはlincRNA）とは別に配置され得るか、タンパク質をコードする遺伝子の近くまたは内部に存在し得る（Guttman et al. (2009) Nature 458:223-227、Katayama et al. (2005) Science 309:1564-1566、Kim et al. (2010) Nature 465:182-187、De Santa et al. (2010) PLoS Biol. 8:e1000384）。

【0071】

本明細書で使用される「ベクター」という用語は、それが連結されている別の核酸を輸送することができる核酸を指す。ベクターの1つのタイプは「プラスミド」であり、これは、追加のDNAセグメントを連結できる環状の二本鎖DNAループを指す。別のタイプのベクターはウイルスベクターであり、追加のDNAセグメントをウイルスゲノムに連結することができる。特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞内で自律複製が可能である（例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソード哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソード哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それにより、宿主ゲノムとともに複製される。さらに、特定のベクターは、それらに作動可能に連結されている遺伝子の発現を指示することができる。そのようなベクターは、本明細書において「組換え発現ベクター」または単に「発現ベクター」と呼ばれる。一般に、組換えDNA技術で有用な発現ベクターは、多くの場合プラスミドの形態である。本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は、

【0072】

本明細書で使用される場合、用語「不応答性」は、刺激、例えば、活性化受容体またはサイトカインを介した刺激に対する免疫細胞の屈折性（refractivity）を含む。例えば、免疫抑制剤への曝露または高用量の抗原への曝露のために、不応答が生じる可能性がある。本明細書で使用される「アネルギー」または「寛容性」という用語には、受容体媒介刺激の活性化に対する屈折性が含まれる。そのような屈折性は一般に抗原特異的であり、寛容化抗原への曝露を中止した後も持続する。例えば、T細胞のアネルギー（非応答性とは対照的に）は、サイトカイン産生の欠如（IL-2など）によって特徴付けられる。T細胞アネルギーは、T細胞が抗原にさらされ、2番目のシグナル（共刺激シグナル）がない状態で1番目のシグナル（T細胞受容体またはCD-3を介したシグナル）を受け取ると発生する。これらの条件下では、同じ抗原に対する細胞の再曝露は（共刺激ポリペプチドの存在下で再曝露が起こったとしても）、サイトカインを産生できず、したがって増殖できなくなる。しかし、サイトカイン（例えば、IL-2）とともに培養すると、アネルギーT細胞は増殖する。例えば、T細胞アネルギーは、ELISAによりまたは指標細胞株を用いた増殖アッセイにより測定されるTリンパ球によるIL-2産生の欠如によっても観察される。あるいは、レポーター遺伝子構築物を使用することができる。

例えば、アネルギーT細胞は、5' IL-2 遺伝子エンハンサーの制御下にある異種プロモーターによってまたはエンハンサー内に見られるAP1配列の多量体によって誘導されるIL-2 遺伝子転写を開始できない (Kang et al (1992) Science 257:1134)。

【0073】

「単離されたポリペプチド」という用語は、特定の実施形態では、組換えDNAまたはRNA、または合成起源、またはそれらのいくつかの組み合わせから調製され、(1) 自然界で通常見られるタンパク質と関連しない、(2) 通常発生する細胞から単離されている、(3) 同じ細胞源から他のタンパク質を含まない状態で単離されている、(4) 異なる種の細胞によって発現されている、または(5) 自然界では発生しない、ポリペプチドを指す。

10

【0074】

「標識」または「標識された」という用語は、ポリペプチドなどの分子への検出可能なマーカーの、任意に共有結合または非共有結合による組み込みまたは付着を指す。ポリペプチドを標識する様々な方法が当技術分野で知られており、使用することができる。ポリペプチドの標識の例には、以下が含まれるが、これらに限定されない：放射性同位体、蛍光標識、重原子、酵素標識またはレポーター遺伝子、化学発光基、ビオチン基、二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパーペア配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）。そのようなラベルの例と使用法については、以下で詳しく説明する。いくつかの実施形態において、ラベルは、潜在的な立体障害を減少させるために、様々な長さのスペーサーアームによって取り付けられている。

20

【0075】

状態を「治療すること」という用語は、疾患の1つ以上の症状を鎮め、緩和または寛解させる、病気の程度を減少させる、病気の進行を遅延させるまたは緩徐させる、疾患の測定基準（統計）を改善および緩和または安定化させる、対象に障害および／またはその症状の低減、進行遅延、退行または寛解を経験させる、などの臨床結果を含む有益または望ましい結果を得るための措置を講じることを意味する。一実施形態では、障害および／またはその症状の再発が防止される。好ましい実施形態では、対象は障害および／またはその症状が治癒している。いくつかの実施形態では、「治療」または「治療すること」は、治療、防止、および予防を指すこともでき、予防（防止）のためまたは患者が罹患している場合の病気もしくは疾病もしくは状態もしくは事象の程度または発生の可能性を（可能ならば）治癒させる、もしくは減らすための、患者に対する薬の投与または医療処置の実施を特に指す。より詳細には、本発明に関連して、「治療」または「治療すること」は、患者への治療薬の適用または投与、または疾患、疾患の症状、または疾患の発症の素因を有する患者からの単離された組織または細胞株への治療薬の適用または投与として定義される。治療は、疾患、疾患の症状、または疾患に対する素因を、緩徐させ、治癒させ、直し、緩和させ、軽減させ、変化させ、鎮め、癒させ、寛解させ、改善し、または影響を及ぼさせ得る。

30

【0076】

特定のタンパク質のアミノ酸配列と、そのタンパク質をコードできるヌクレオチド配列との間には、遺伝暗号（以下に示す）によって定義されているように、既知の明確な対応関係がある。同様に、特定の核酸のヌクレオチド配列と、その核酸によってコードされるアミノ酸配列との間には、遺伝暗号によって定義される既知の明確な対応がある。

40

遺伝暗号

【表 A】

アラニン (Ala, A)	GCA, GCC, GCG, GCT
アルギニン (Arg, R)	AGA, ACG, CGA, CGC, CGG, CGT
アスパラギン (Asn, N)	AAC, AAT
アスパラギン酸 (Asp, D)	GAC, GAT
システイン (Cys, C)	TGC, TGT
グルタミン酸 (Glu, E)	GAA, GAG
グルタミン (Gln, Q)	CAA, CAG
グリシン (Gly, G)	GGA, GGC, GGG, GGT
ヒスチジン (His, H)	CAC, CAT
イソロイシン (Ile, I)	ATA, ATC, ATT
ロイシン (Leu, L)	CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG
リジン (Lys, K)	AAA, AAG
メチオニン (Met, M)	ATG
フェニルアラニン (Phe, F)	TTC, TTT
プロリン (Pro, P)	CCA, CCC, CCG, CCT
セリン (Ser, S)	AGC, AGT, TCA, TCC, TCG, TCT
トレオニン (Thr, T)	ACA, ACC, ACG, ACT
トリプトファン (Trp, W)	TGG
チロシン (Tyr, Y)	TAC, TAT
バリン (Val, V)	GTA, GTC, GTG, GTT
終了信号 (end)	TAA, TAG, TGA

10

20

【0077】

遺伝暗号の重要で周知である特徴はその冗長性であり、それにより、タンパク質を作るために使用されるアミノ酸のほとんどに、2個以上のコードヌクレオチドトリプレットを使用することができる（上に示す）。したがって、多くの異なるヌクレオチド配列が、特定のアミノ酸配列をコードできる。そのようなヌクレオチド配列は、すべての生物で同じアミノ酸配列が生成されるため、機能的に同等であると見なされる（ただし、特定の生物は、他の生物よりも効率的に一部の配列を翻訳する場合がある）。さらに、時々、プリンまたはピリミジンのメチル化バリエーションが、特定のヌクレオチド配列で見つかる場合がある。そのようなメチル化は、トリヌクレオチドコドンと対応するアミノ酸との間のコード関係に影響を与えない。

30

【0078】

上記を考慮して、本発明の融合タンパク質またはポリペプチド（またはその任意の部分）をコードするDNAまたはRNAのヌクレオチド配列を、DNAまたはRNAをアミノ酸配列に翻訳する遺伝暗号を用いて、融合タンパク質またはポリペプチドのアミノ酸配列を使用して誘導できる。同様に、融合タンパク質またはポリペプチドのアミノ酸配列については、融合タンパク質またはポリペプチドをコードできる対応するヌクレオチド配列を遺伝暗号から推定することができる（その冗長性のため、特定のアミノ酸配列に対して複数の核酸配列が生成される）。したがって、融合タンパク質またはポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の本明細書における説明および／または開示は、ヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列の説明および／または開示も含むとみなされるべきである。同様に、本明細書の融合タンパク質またはポリペプチドアミノ酸配列の説明および／または開示は、アミノ酸配列をコードすることができるすべての可能なヌクレオチド配列の説明および／または開示も含むとみなされるべきである。

40

【0079】

最後に、本発明の組成物および方法の範囲内に包含されるドミナントネガティブRHOAの例示的な核酸およびタンパク質配列を以下に示す。

表2：RHOAドミナントネガティブフォームのアミノ酸配列

配列番号1 ヒトRHOA T19Nアミノ酸配列

MAAIRKKLVIVGDGACGKNCLLIVFSKDQFPVYVPTVFE

50

NYVADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPDTDVI
 LMCFSIDSPDSLENIPEKWTPEVKHFPCPNVPIILVGNKKD
 LRNDEHTRRELAKMKQEPVKPEEGRDMANRIGAFGYMECS
 AKTKDGVREVFEMATRAALQARRGKKKSGCLVL

配列番号2 ヒトRHOA G17Vのアミノ酸配列

MAAIRKKLVIVGDGACVKTCLLIVFSKDKQFPEVYVPTVFE
 NYVADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPDTDVI
 LMCFSIDSPDSLENIPEKWTPEVKHFPCPNVPIILVGNKKD
 LRNDEHTRRELAKMKQEPVKPEEGRDMANRIGAFGYMECS
 AKTKDGVREVFEMATRAALQARRGKKKSGCLVL

10

配列番号3 ヒトRHOA G17Eのアミノ酸配列

MAAIRKKLVIVGDGACEKTCLLIVFSKDKQFPEVYVPTVFE
 NYVADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPDTDVI
 LMCFSIDSPDSLENIPEKWTPEVKHFPCPNVPIILVGNKKD
 LRNDEHTRRELAKMKQEPVKPEEGRDMANRIGAFGYMECS
 AKTKDGVREVFEMATRAALQARRGKKKSGCLVL

表3：RHOAドミナントネガティブフォームのcDNA配列

配列番号4 ヒトRHOA T19N cDNA配列、バリエント1

atggcctgccatccgggaagaaactgggtgattgttgggtgatg
 gagcctgtggaaagAATtgcttgctcatagtccttcagcaa
 ggaccagttcccagagggtgtatgtgcccacagtggttgag
 aactatgtggcagatatcgagggtggatggaaagcaggtag
 agttggcctttgtgggacacacagctggggcagggaagattatga
 tcgccctgaggcccccctctccctacccagataccgatgttata
 ctgatgtgtttttccatcgacagccctgatagtttagaaa
 acatcccagaaaaagtggaaccccagaagtcaagcatttctg
 tcccacacgtgcccatcatcctgggttgggaataaagaaggat
 cttcgggaatgatgagcacacacaggcgaggagctagccaaga
 tgaagcaggagcgggtgaaacctgaagaaggcagagatat
 ggcaaacaggattggcgcttttgggtacatggagtggttca
 gcaaaagaccaaaagatggagtgagagagggtttttgaaatgg
 ctacgagagctgctctgcaagctagacgtgggaagaaaaa
 atctggggtgcccttgtcttgtga

20

30

配列番号5 ヒトRHOA T19N cDNA配列、バリエント2

atggcctgccatccgggaagaaactgggtgattgttgggtgatg
 gagcctgtggaaagAACtgcttgctcatagtccttcagcaa
 ggaccagttcccagagggtgtatgtgcccacagtggttgag
 aactatgtggcagatatcgagggtggatggaaagcaggtag
 agttggcctttgtgggacacacagctggggcagggaagattatga
 tcgccctgaggcccccctctccctacccagataccgatgttata
 ctgatgtgtttttccatcgacagccctgatagtttagaaa
 acatcccagaaaaagtggaaccccagaagtcaagcatttctg
 tcccacacgtgcccatcatcctgggttgggaataaagaaggat
 cttcgggaatgatgagcacacacaggcgaggagctagccaaga
 tgaagcaggagcgggtgaaacctgaagaaggcagagatat
 ggcaaacaggattggcgcttttgggtacatggagtggttca
 gcaaaagaccaaaagatggagtgagagagggtttttgaaatgg
 ctacgagagctgctctgcaagctagacgtgggaagaaaaa
 atctggggtgcccttgtcttgtga

40

配列番号6 ヒトRHOA G17V cDNA配列、バリエント1

50

a t g g c t g c c a t c c g g a a g a a a c t g g t g a t t g t t g g t g a t g
g a g c c t g t G T T a a g a c a t g c t t g c t c a t a g t c t t c a g c a a
g g a c c a g t t c c c a g a g g t g t a t g t g c c c a c a g t g t t t g a g
a a c t a t g t g g c a g a t a t c g a g g t g g a t g g a a a g c a g g t a g
a g t t g g c t t t g t g g g a c a c a g c t g g g c a g g a a g a t t a t g a
t c g c c t g a g g c c c c t c t c c t a c c c a g a t a c c g a t g t t a t a
c t g a t g t g t t t t t c c a t c g a c a g c c c t g a t a g t t t a g a a a
a c a t c c c a g a a a a g t g g a c c c c a g a a g t c a a g c a t t t c t g
t c c c a a c g t g c c c a t c a t c c t g g t t g g g a a t a a g a a g g a t
c t t c g g a a t g a t g a g c a c a c a a g g c g g g a g c t a g c c a a g a
t g a a g c a g g a g c c g g t g a a a c c t g a a g a a g g c a g a g a t a t
g g c a a a c a g g a t t g g c g c t t t t g g g t a c a t g g a g t g t t c a
g c a a a g a c c a a a g a t g g a g t g a g a g a g g t t t t t g a a a t g g
c t a c g a g a g c t g c t c t g c a a g c t a g a c g t g g g a a g a a a a a
a t c t g g g t g c c t t g t c t t g t g a

10

配列番号8 ヒトRHOA G17V cDNA配列、バリエント2

a t g g c t g c c a t c c g g a a g a a a c t g g t g a t t g t t g g t g a t g
g a g c c t g t G T C a a g a c a t g c t t g c t c a t a g t c t t c a g c a a
g g a c c a g t t c c c a g a g g t g t a t g t g c c c a c a g t g t t t g a g
a a c t a t g t g g c a g a t a t c g a g g t g g a t g g a a a g c a g g t a g
a g t t g g c t t t g t g g g a c a c a g c t g g g c a g g a a g a t t a t g a
t c g c c t g a g g c c c c t c t c c t a c c c a g a t a c c g a t g t t a t a
c t g a t g t g t t t t t c c a t c g a c a g c c c t g a t a g t t t a g a a a
a c a t c c c a g a a a a g t g g a c c c c a g a a g t c a a g c a t t t c t g
t c c c a a c g t g c c c a t c a t c c t g g t t g g g a a t a a g a a g g a t
c t t c g g a a t g a t g a g c a c a c a a g g c g g g a g c t a g c c a a g a
t g a a g c a g g a g c c g g t g a a a c c t g a a g a a g g c a g a g a t a t
g g c a a a c a g g a t t g g c g c t t t t g g g t a c a t g g a g t g t t c a
g c a a a g a c c a a a g a t g g a g t g a g a g a g g t t t t t g a a a t g g
c t a c g a g a g c t g c t c t g c a a g c t a g a c g t g g g a a g a a a a a
a t c t g g g t g c c t t g t c t t g t g a

20

30

配列番号8 ヒトRHOA G17V cDNA配列、バリエント3

a t g g c t g c c a t c c g g a a g a a a c t g g t g a t t g t t g g t g a t g
g a g c c t g t G T G a a g a c a t g c t t g c t c a t a g t c t t c a g c a a
g g a c c a g t t c c c a g a g g t g t a t g t g c c c a c a g t g t t t g a g
a a c t a t g t g g c a g a t a t c g a g g t g g a t g g a a a g c a g g t a g
a g t t g g c t t t g t g g g a c a c a g c t g g g c a g g a a g a t t a t g a
t c g c c t g a g g c c c c t c t c c t a c c c a g a t a c c g a t g t t a t a
c t g a t g t g t t t t t c c a t c g a c a g c c c t g a t a g t t t a g a a a
a c a t c c c a g a a a a g t g g a c c c c a g a a g t c a a g c a t t t c t g
t c c c a a c g t g c c c a t c a t c c t g g t t g g g a a t a a g a a g g a t
c t t c g g a a t g a t g a g c a c a c a a g g c g g g a g c t a g c c a a g a
t g a a g c a g g a g c c g g t g a a a c c t g a a g a a g g c a g a g a t a t
g g c a a a c a g g a t t g g c g c t t t t g g g t a c a t g g a g t g t t c a
g c a a a g a c c a a a g a t g g a g t g a g a g a g g t t t t t g a a a t g g
c t a c g a g a g c t g c t c t g c a a g c t a g a c g t g g g a a g a a a a a
a t c t g g g t g c c t t g t c t t g t g a

40

配列番号9 ヒトRHOA G17V cDNA配列、バリエント4

a t g g c t g c c a t c c g g a a g a a a c t g g t g a t t g t t g g t g a t g
g a g c c t g t G T A a a g a c a t g c t t g c t c a t a g t c t t c a g c a a

50

g g a c c a g t t c c c a g a g g t g t a t g t g c c c a c a g t g t t t g a g
a a c t a t g t g g c a g a t a t c g a g g t g g a t g g a a a g c a g g t a g
a g t t g g c t t t g t g g g a c a c a g c t g g g c a g g a a g a t t a t g a
t c g c c t g a g g c c c c t c t c c t a c c c a g a t a c c g a t g t t a t a
c t g a t g t g t t t t t c c a t c g a c a g c c c t g a t a g t t t a g a a a
a c a t c c c a g a a a a g t g g a c c c c a g a a g t c a a g c a t t t t c t g
t c c c a a c g t g c c c a t c a t c c t g g t t g g g a a t a a g a a g g a t
c t t c g g a a t g a t g a g c a c a c a a g g c g g g a g c t a g c c a a g a
t g a a g c a g g a g c c g g t g a a a c c t g a a g a a g g c a g a g a t a t
g g c a a a c a g g a t t g g c g c t t t t g g g t a c a t g g a g t g t t c a
g c a a a g a c c a a a g a t g g a g t g a g a g a g g t t t t t g a a a t g g
c t a c g a g a g c t g c t c t g c a a g c t a g a c g t g g g a a g a a a a a
a t c t g g g t g c c t t g t c t t g t g a

10

配列番号10 ヒトRHOA G17E cDNA配列、バリエント1

a t g g c t g c c a t c c g g a a g a a a c t g g t g a t t g t t g g t g a t g
g a g c c t g t G A A a a g a c a t g c t t g c t c a t a g t c t t c a g c a a
g g a c c a g t t c c c a g a g g t g t a t g t g c c c a c a g t g t t t g a g
a a c t a t g t g g c a g a t a t c g a g g t g g a t g g a a a g c a g g t a g
a g t t g g c t t t g t g g g a c a c a g c t g g g c a g g a a g a t t a t g a
t c g c c t g a g g c c c c t c t c c t a c c c a g a t a c c g a t g t t a t a
c t g a t g t g t t t t t c c a t c g a c a g c c c t g a t a g t t t a g a a a
a c a t c c c a g a a a a g t g g a c c c c a g a a g t c a a g c a t t t t c t g
t c c c a a c g t g c c c a t c a t c c t g g t t g g g a a t a a g a a g g a t
c t t c g g a a t g a t g a g c a c a c a a g g c g g g a g c t a g c c a a g a
t g a a g c a g g a g c c g g t g a a a c c t g a a g a a g g c a g a g a t a t
g g c a a a c a g g a t t g g c g c t t t t g g g t a c a t g g a g t g t t c a
g c a a a g a c c a a a g a t g g a g t g a g a g a g g t t t t t g a a a t g g
c t a c g a g a g c t g c t c t g c a a g c t a g a c g t g g g a a g a a a a a
a t c t g g g t g c c t t g t c t t g t g a

20

配列番号11 ヒトRHOA G17E cDNA配列、バリエント2

a t g g c t g c c a t c c g g a a g a a a c t g g t g a t t g t t g g t g a t g
g a g c c t g t G A G a a g a c a t g c t t g c t c a t a g t c t t c a g c a a
g g a c c a g t t c c c a g a g g t g t a t g t g c c c a c a g t g t t t g a g
a a c t a t g t g g c a g a t a t c g a g g t g g a t g g a a a g c a g g t a g
a g t t g g c t t t g t g g g a c a c a g c t g g g c a g g a a g a t t a t g a
t c g c c t g a g g c c c c t c t c c t a c c c a g a t a c c g a t g t t a t a
c t g a t g t g t t t t t c c a t c g a c a g c c c t g a t a g t t t a g a a a
a c a t c c c a g a a a a g t g g a c c c c a g a a g t c a a g c a t t t t c t g
t c c c a a c g t g c c c a t c a t c c t g g t t g g g a a t a a g a a g g a t
c t t c g g a a t g a t g a g c a c a c a a g g c g g g a g c t a g c c a a g a
t g a a g c a g g a g c c g g t g a a a c c t g a a g a a g g c a g a g a t a t
g g c a a a c a g g a t t g g c g c t t t t g g g t a c a t g g a g t g t t c a
g c a a a g a c c a a a g a t g g a g t g a g a g a g g t t t t t g a a a t g g
c t a c g a g a g c t g c t c t g c a a g c t a g a c g t g g g a a g a a a a a
a t c t g g g t g c c t t g t c t t g t g a

30

40

*表2に含まれるのは、表2にリストされた任意の配列番号のアミノ酸配列またはその一部と全長にわたって少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、またはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、ポリペプチド分子である。そのようなポリペプチドは、例えば癌中の生存細胞

50

または増殖細胞の数を減少させる、および／または癌細胞を含む腫瘍の体積またはサイズを減少させるなど、本明細書でさらに説明する全長ポリペプチドの機能を有することができる。シグナルペプチドを含むまたは含まない、および／またはプロタンパク質を含むまたはプロタンパク質のみの、および／または成熟タンパク質を含むまたは成熟タンパク質のみの、ポリペプチドがさらに含まれる。

＊表3に含まれるのは、表3にリストされた任意の配列番号の核酸配列またはその一部とそれらの全長にわたって少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、またはそれ以上の同一性を有する核酸配列を含む、RNA核酸分子（例えば、チミンをウレジンに置き換えたもの）、およびDNAまたはRNA核酸配列である。そのような核酸分子は、例えば、癌中の生存細胞または増殖細胞の数を減少させ、および／または癌細胞を含む腫瘍の体積またはサイズを減少させるタンパク質をコードするなど、本明細書でさらに説明されるような全長核酸の機能を有することができる。シグナルペプチドを含むまたは含まない、および／またはプロタンパク質を含むまたはプロタンパク質のみの、および／または成熟タンパク質を含むまたは成熟タンパク質のみの、ポリペプチドをコードする核酸がさらに含まれる。

【0080】

II. 薬剤と組成物

a. 単離された核酸

本発明の一態様は、RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分をコードする単離された核酸分子を利用する方法に関する。本明細書で使用される「核酸分子」という用語は、DNA分子（すなわち、cDNAまたはゲノムDNA）およびRNA分子（すなわち、mRNA）、およびヌクレオチド類似体を使用して生成されたDNAまたはRNAの類似体を含むものとする。核酸分子は一本鎖でも二本鎖でもよいが、好ましくは二本鎖DNAである。「単離された」核酸分子は、核酸の天然源に存在する他の核酸分子から分離されたものである。好ましくは、「単離された」核酸は、核酸が由来する生物のゲノムDNA中の核酸に自然に隣接する配列（すなわち、核酸の5'および3'末端に位置する配列）を含まない。例えば、種々の実施形態では、RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分をコードする単離された核酸分子は、核酸が由来する細胞（例えば、RHOAドミナントネガティブ変異を有する癌細胞）のゲノムDNA中の核酸分子に自然に隣接する、ヌクレオチド配列の約5 kb、4 kb、3 kb、2 kb、1 kb、0.5 kbまたは0.1 kb未満を含み得る。さらに、cDNA分子などの「単離された」核酸分子は、他の細胞材料、または組換え技術によって産生される場合の培地、または化学合成される場合の化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない。

【0081】

本発明のRHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分をコードする核酸分子、例えば、配列番号4、5、6、7、8、9、10、もしくは11のヌクレオチド配列を有する核酸分子、または配列番号4、5、6、7、8、9、10、もしくは11に示されるヌクレオチド配列またはその一部と、少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、より好ましくは少なくとも約70%、さらにより好ましくは少なくとも約80%、さらにより好ましくは少なくとも約90%、および最も好ましくは少なくとも約95%、またはそれ以上（例えば、約98%）相同であるヌクレオチド配列（すなわち、100、200、300、400、450、500個の、またはそれ以上のヌクレオチド）は、標準的な分子生物学技術および本明細書で提供される配列情報を使用して単離することができる。例えば、ヒトRHOAドメインネガティブ変異体cDNAは、配列番号4、5、6、7、8、9、10、もしくは11のすべてまたは一部、またはその断片を使用して、ハイブリダイゼーションプローブおよび標準ハイブリダイゼーション技術（すなわち、Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Ma

nual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989に記載されている)として、ヒト癌細胞株から単離することができる。さらに、配列番号4、5、6、7、8、9、10、もしくは11のすべてまたは一部を含む核酸分子、または、配列番号4、5、6、7、8、9、10、もしくは11に示されるヌクレオチド配列、またはその断片と、少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、より好ましくは少なくとも約70%、さらにより好ましくは少なくとも約80%、さらにより好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%またはそれ以上相同であるヌクレオチド配列は、配列番号4、5、6、7、8、9、10、もしくは11、またはその断片、の配列に基づいて設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって単離することができる。例えば、mRNAは癌細胞から単離することができ(すなわち、Chirgwin et al. (1979) Biochemistry 18:5294-5299のグアニジニウム-チオシアネート抽出手順によって)、cDNAは逆転写酵素(すなわち、Gibco/BRL, Bethesda, MDから入手可能な、Moloney MLV逆転写酵素、またはSeikagaku America, Inc., St. Petersburg, FLから入手可能なAMV逆転写酵素)を使用して調製できる。PCR増幅のための合成オリゴヌクレオチドプライマーは、配列番号4、5、6、7、8、9、10、もしくは11に示されるヌクレオチド配列、またはその断片、またはそれらに相同なヌクレオチド配列に基づいて設計することができる。本発明の核酸は、標準的なPCR増幅技術に従って、鋳型として、cDNAまたは代替としてゲノムDNAおよび適切なオリゴヌクレオチドプライマーを使用して増幅することができる。さらに、本発明の核酸は、鋳型としての野生型RHOAのcDNAまたはゲノムDNAおよび意図された変異を含む特定のオリゴヌクレオチドプライマーを使用する部位特異的変異誘発技術によって生成することができる。そのように増幅または生成された核酸は、適切なベクターにクローン化され、DNA配列分析によって特徴付けられる。さらに、RHOAドミナントネガティブ変異ヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドは、標準的な合成技術により、すなわち自動化されたDNA合成装置を使用して調製することができる。

【0082】

RHOAドミナントネガティブ変異ヌクレオチド配列に基づくプローブを使用して、同じまたは相同タンパク質をコードする転写物またはゲノム配列を検出できる。好ましい実施形態では、プローブはそれに付着した標識基をさらに含む、すなわち、標識基は放射性同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子であり得る。そのようなプローブは、対象からの細胞試料中のRHOAドミナントネガティブポリペプチドをコードする核酸のレベルを測定する、すなわち、RHOAドミナントネガティブポリペプチドのmRNAレベルを検出するなどして、RHOAドミナントネガティブポリペプチドを発現する細胞または組織を識別する診断テストキットの一部として使用できる。

【0083】

他のRHOAドミナントネガティブ変異体をコードし、したがって配列番号4~11の配列またはその断片とは異なるヌクレオチド配列を有する核酸分子が企図される。さらに、異なる種由来のRHOAドミナントネガティブ変異体をコードし、したがって配列番号4~11の配列とは異なるヌクレオチド配列を有する核酸分子も、本発明の範囲内であることが意図されている。例えば、チンパンジーまたはサルRHOAドミナントネガティブ変異体cDNAは、ヒトおよび/またはマウスRHOAドミナントネガティブ変異体のヌクレオチド配列に基づいて特定できる。

【0084】

一実施形態では、本発明の核酸分子(複数可)は、配列番号1、2、または3のアミノ酸配列またはその断片と十分に相同なアミノ酸配列を含むタンパク質またはその一部をコードし、そのため、タンパク質またはその一部は、癌中の生存細胞または増殖細胞の数を減少させ、および/または癌細胞を含む腫瘍の体積またはサイズを減少させる。そのよう

な各生物活性を測定するための方法およびアッセイは当技術分野で周知であり、代表的な非限定的な実施形態は以下の実施例および上記の定義に記載されている。

【0085】

本明細書で使用される場合、「十分に相同」という言葉は、配列番号1、2、もしくは3のアミノ酸配列またはその断片に対して、最小数の同一または同等物（例えば、配列番号1、2、もしくは3のアミノ酸、またはその断片として、配列中のアミノ酸残基と同様の側鎖を有するアミノ酸残基）のアミノ酸残基を含むアミノ酸配列を有するタンパク質またはその部分を指し、その結果、そのタンパク質またはその部分が癌中の生存細胞または増殖細胞の数を減少させ、および／または癌細胞を含む腫瘍の体積またはサイズを減少させる。

10

【0086】

別の実施形態では、タンパク質は、配列番号1、2、もしくは3のアミノ酸配列全体、またはその断片に対して、少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、より好ましくは少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上相同である。

【0087】

本発明のRHOAドミナントネガティブ変異体核酸分子によりコードされるタンパク質の部分は、好ましくはRHOAドミナントネガティブポリペプチドの生物学的に活性な部分である。本明細書で使用される「RHOAドミナントネガティブポリペプチドの生物学的活性部分」という用語は、それぞれ全長RHOAドミナントネガティブポリペプチドの生物学的活性の1つ以上を有するRHOAドミナントネガティブポリペプチドの一部、例えばドメイン／モチーフを含むことを意図する。

20

【0088】

全長RHOAドミナントネガティブポリペプチドの生物活性を維持する、RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片の能力を決定するために、本明細書に記載の標準的な結合アッセイ、例えば免疫沈降および酵母ツーハイブリッドアッセイ、または機能アッセイ、例えばRNAiまたは過剰発現実験を実施できる。

【0089】

本発明はさらに、遺伝暗号の縮重により配列番号4、5、6、7、8、9、10、もしくは11に示されるヌクレオチド配列またはその断片とは異なり、したがって配列番号4、5、6、7、8、9、10、もしくは11に示されるヌクレオチド配列またはその断片によりコードされるものと同じRHOAドミナントネガティブポリペプチドをコードする、核酸分子を包含する。別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、配列番号1、2、もしくは3に示されるアミノ酸配列、またはその断片を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列、あるいは配列番号1、2、もしくは3のアミノ酸配列、またはその断片と、少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上相同であるアミノ酸配列、または配列番号1、2、もしくは3と、少なくとも1、2、3、5、もしくは10アミノ酸であるが30、20、15アミノ酸以下で異なるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列、を有する。別の実施形態では、RHOAドミナントネガティブポリペプチドをコードする核酸は、195、190、185、180、175、170、165、160、155、150、145、140、135、130、125、120、115、110、105、100、95、90、85、80、75、または70未満の長さのアミノ酸である関心のある全長RHOAドミナントネガティブポリペプチド断片の一部をコードする核酸配列からなる。

30

40

【0090】

RHOAドミナントネガティブポリペプチドのアミノ酸配列の変化をもたらすDNA配列多型は、集団（例えば、哺乳動物集団、例えば、ヒト集団）内に存在し得ることが当業者に認識されるであろう。ドミナントネガティブRHOA遺伝子のそのような遺伝子多型は、自然の対立遺伝子変異により、集団内の個体に存在する可能性がある。本明細書で使

50

用される「遺伝子」および「組換え遺伝子」という用語は、ドミナントネガティブRHOAタンパク質、好ましくは哺乳動物、例えばヒトのドミナントネガティブRHOAタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含む核酸分子を指す。そのような天然の対立遺伝子変異は、通常、ドミナントネガティブRHOA遺伝子のヌクレオチド配列に1～5%の相違をもたらす可能性がある。天然の対立遺伝子変異の結果であり、ドミナントネガティブRHOAの機能的活性を変化させないドミナントネガティブRHOAでのそのようなすべてのヌクレオチド変異および結果として生じるアミノ酸多型は、本発明の範囲内であることが意図されている。さらに、他の種からのドミナントネガティブRHOAタンパク質をコードし、したがって配列番号4～11の配列とは異なるヌクレオチド配列を有する核酸分子は、本発明の範囲内であることが意図されている。本発明のヒトまたはマウスのドミナントネガティブRHOA cDNAの天然の対立遺伝子バリエーションおよび相同体に対応する核酸分子は、(本明細書に開示されるような)ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下での標準的なハイブリダイゼーション技術によるハイブリダイゼーションプローブとしてヒトまたはマウスのcDNAまたはその一部を使用して、本明細書に開示されるヒトまたはマウスのドミナントネガティブRHOA核酸配列との相同性に基づいて単離することができる。

10

【0091】

集団に存在する可能性があるRHOAドミナントネガティブ変異体配列の天然に存在する対立遺伝子バリエーションに加えて、当業者は、配列番号4、5、6、7、8、9、10、または11のヌクレオチド配列、またはその断片に、変異により変化を導入でき、それにより、RHOAドミナントネガティブポリペプチドの機能的能力を変更することなくコード化されたRHOAドミナントネガティブポリペプチドのアミノ酸配列に変化をもたらし得ることをさらに理解するであろう。例えば、「非必須」アミノ酸残基でのアミノ酸置換をもたらすヌクレオチド置換は、配列番号1、2、または3の配列、またはその断片で行うことができる。「非必須」アミノ酸残基は、RHOAドミナントネガティブポリペプチドの配列(例えば、配列番号1、2、または3の配列、またはその断片)から、RHOAドミナントネガティブポリペプチドの活性を大きく変えることなく変更できる残基であり、一方、RHOAドミナントネガティブポリペプチド活性には「必須」アミノ酸残基が必要である。しかし、他のアミノ酸残基(例えば、マウスとヒトの間で保存されていない、または半保存されているもの)は、活性に必須ではない可能性があり、したがって、RHOAのドミナントネガティブポリペプチド活性を変更することなく、変更を受け入れやすい可能性がある。さらに、癌細胞の生存性および/または増殖に関連するRHOAドミナントネガティブポリペプチド機能に必須であるが、他のRHOAドミナントネガティブポリペプチド機能に必須ではないアミノ酸残基は、変更を受けやすい可能性が高い。

20

30

【0092】

したがって、本発明の別の態様は、RHOAドミナントネガティブポリペプチド活性に必須ではないアミノ酸残基の変化を含有するRHOAドミナントネガティブポリペプチドをコードする核酸分子に関する。そのようなRHOAドミナントネガティブポリペプチドは、配列番号1、2、または3またはその断片とアミノ酸配列が異なるが、本明細書に記載のRHOAドミナントネガティブポリペプチド活性の少なくとも1つを保持する。一実施形態では、単離された核酸分子は、タンパク質が1つ以上のRHOAドミナントネガティブポリペプチドドメインを欠いている、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。定義セクションで述べたように、RHOAドミナントネガティブポリペプチドの構造機能相関は既知であるため、当業者はRHOAドミナントネガティブポリペプチドの少なくとも1つの生物活性を保持しながら、変異またはその他の方法で変更される可能性のある領域を容易に理解できる。

40

【0093】

本明細書で使用する「配列同一性または相同性」とは、2つのポリペプチド分子間または2つの核酸分子間の配列類似性を指す。2つの比較された配列の両方の位置が同じ塩基またはアミノ酸モノマーサブユニットによって占められている場合、例えば、2つのDN

50

A分子のそれぞれの位置がアデニンによって占められている場合、分子はその位置で相同または配列同一である。2つの配列間の相同性または配列同一性のパーセントは、2つの配列で共有される一致または相同な同一の位置の数を、比較される位置の数で割った関数 $\times 100$ である。例えば、2つの配列の10個のうち6個が同じ場合、2つの配列は60%の相同性であるか、60%の配列同一性を持つ。例として、DNA配列A T T G C CおよびT A T G G Cは、50%の相同性または配列同一性を共有する。一般に、2つの配列を整列させて最大の相同性を得るときに比較が行われる。特に指定のない限り、「ループアウト領域」、例えば、配列のうちの1つでの欠失または挿入から生じるものは、ミスマッチとしてカウントされる。

【0094】

10

数学的アルゴリズムを使用して、2つの配列間の配列の比較とパーセント相同性の決定を行うことができる。好ましくは、アラインメントは、Clustal法を使用して実行することができる。マルチプルアライメントパラメータには、ギャップペナルティ=10、ギャップ長ペナルティ=10が含まれる。DNAアラインメントの場合、ペアワイズアラインメントパラメーターは、Hタプル (Htuple) = 2、ギャップペナルティ=5、ウィンドウ=4、およびダイアゴナルセーブド (Diagonal saved) = 4である。タンパク質アラインメントの場合、ペアワイズアラインメントパラメーターは、Kタプル=1 (Ktuple)、ギャップペナルティ=3、ウィンドウ=5、およびダイアゴナルセーブド=5である。

【0095】

20

好ましい実施形態では、2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、Blossom 62マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれか、16、14、12、10、8、6、または4のギャップ重み (gap weight) および1、2、3、4、5、または6の長さ重み (length weight) を使用して、GCGソフトウェアパッケージ (オンラインで入手可能) のGAPプログラムに組み込まれたNeedleman and Wunsch (J. Mol. Biol. (48): 444-453 (1970)) アルゴリズムを使用して決定される。さらに別の好ましい実施形態では、2つのヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、NWSgapdna. CMPマトリックスおよび40、50、60、70、または80のギャップ重み、または1、2、3、4、5、または6の長さ重みを使用する、GCGソフトウェアパッケージ (オンラインで入手可能) のGAPプログラムを使用して決定される。別の実施形態では、2つのアミノ酸またはヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、PAM120重み付き残基表 (weight residue table)、ギャップ長ペナルティ12、ギャップペナルティ4を使用する、ALIGNプログラム (バージョン2.0) (オンラインで入手可能) に組み込まれたE. Meyers and W. Miller (CABIOS, 4: 11-17 (1989)) のアルゴリズムを使用して、決定される。

30

【0096】

配列番号1、2、または3またはその断片のタンパク質に相同なRHOAドミナントネガティブポリペプチドをコードする単離された核酸分子は、配列番号4、5、6、7、8、9、10、または11、またはその断片のヌクレオチド配列、または1つ以上のアミノ酸置換、付加、または欠失がコードされたタンパク質に導入されるような相同ヌクレオチド配列に、1つ以上のヌクレオチド置換、付加または欠失を導入することにより作成できる。変異は、部位特異的変異誘発およびPCR媒介変異誘発などの標準的な技術により、配列番号4、5、6、7、8、9、10、もしくは11、またはその断片、または相同ヌクレオチド配列に導入することができる。好ましくは、保存的アミノ酸置換は、1つ以上の予測される非必須アミノ酸残基で行われる。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が同様の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されるものである。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野で定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖 (例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖 (例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖 (例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セ

40

50

リン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、ベト217-420ランチト(bet217-420ranch ed)側鎖(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)、を有するアミノ酸が含まれる。したがって、RHODAドミナントネガティブポリペプチドの予測される非必須アミノ酸残基は、好ましくは同じ側鎖ファミリーからの別のアミノ酸残基で置換される。あるいは、別の実施形態では、飽和変異誘発などによりRHODAドミナントネガティブポリペプチドコード配列の全部または一部に沿ってランダムに変異を導入することができ、得られた変異体を本明細書に記載のRHODAドミナントネガティブポリペプチド活性についてスクリーニングして、RHODAドミナントネガティブポリペプチド活性を保持する変異体を特定することができる。配列番号4、5、6、7、8、9、10、または11またはその断片の変異誘発に続いて、コードされたタンパク質を組換えで発現させ(本明細書に記載のように)、タンパク質の活性を、例えば、本明細書に記載のアッセイを使用して決定することができる。

10

【0097】

RHODAドミナントネガティブポリペプチドレベルは、転写された分子またはタンパク質の発現を検出するための多種多様な周知の方法のいずれかによって評価され得る。そのような方法の非限定的な例には、タンパク質の検出のための免疫学的方法、タンパク質精製法、タンパク質機能または活性アッセイ、核酸ハイブリダイゼーション法、核酸逆転写法、および核酸増幅法が含まれる。

20

【0098】

好ましい実施形態では、RHODAドミナントネガティブポリペプチドレベルは、遺伝子転写物(例えば、mRNA)を測定することにより、翻訳されたタンパク質の量の測定により、または遺伝子産物の活性の測定により確認される。発現レベルは、いずれも標準的な技術を使用して測定できるmRNAレベル、タンパク質レベル、またはタンパク質活性の検出によることを含めた様々な方法で監視できる。検出には、遺伝子発現レベルの定量化(例えば、ゲノムDNA、cDNA、mRNA、タンパク質、または酵素活性)を含むことができ、あるいはまたは、特に対照レベルと比較した、遺伝子発現レベルの定性的評価であってもよい。検出されているレベルのタイプは、文脈から明らかにであろう。

【0099】

特定の実施形態では、RHODAドミナントネガティブポリペプチドmRNA発現レベルは、当該分野で既知の方法を使用して、生体試料中のインサイチュおよびインビトロ形式の両方によって決定され得る。「生体試料」という用語は、対象から単離された組織、細胞、生体液およびその単離物、ならびに対象内に存在する組織、細胞および体液を含むことを意図している。多くの発現検出方法では、単離されたRNAが使用される。インビトロの方法では、mRNAの単離に対しては選択しない任意のRNA単離技術は、細胞からのRNAの精製に利用できる(例えば、Ausubel et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York 1987-1999を参照されたい)。さらに、多数の組織試料は、例えば、Chomczynskiの一段階RNA単離プロセス(1989、米国特許第4,843,155号)など、当業者に周知の技術を使用して容易に処理できる。

30

40

【0100】

単離されたmRNAは、サザン分析またはノーザン分析、ポリメラーゼ連鎖反応分析およびプローブアレイを含むがこれらに限定されないハイブリダイゼーションまたは増幅アッセイで使用できる。mRNAレベルの検出のための1つの好ましい診断方法は、検出される遺伝子によりコードされるmRNAにハイブリダイズできる核酸分子(プローブ)と単離されたmRNAを接触させることを包含する。核酸プローブは、例えば、全長cDNA、またはその部分であって、少なくとも7、15、30、50、100、250または500の長さのヌクレオチドのオリゴヌクレオチドなど、RHODAドミナントネガティブ

50

ポリペプチドをコードするmRNAまたはゲノムDNAに対するストリンジェントな条件下に特異的にハイブリダイズするのに十分なもの、であり得る。本発明の診断アッセイで使用するための他の適切なプローブは、本明細書に記載されている。mRNAとプローブのハイブリダイゼーションは、RHOAドミナントネガティブポリペプチドが発現されていることを示す。

【0101】

1つの形式では、例えば単離されたmRNAをアガロースゲル上で泳動させ、mRNAをゲルからニトロセルロースなどの膜に移すことにより、mRNAを固体表面に固定し、プローブと接触させる。別の形式では、プローブ（複数可）は固体表面に固定され、mRNAは、例えば、遺伝子チップアレイ、例えばAffymetrix（商標）遺伝子チップアレイでプローブ（複数可）と接触される。当業者は、RHOAドミナントネガティブmRNA発現レベルのレベルを検出するために使用するための既知のmRNA検出方法を容易に適合させることができる。

【0102】

試料中のRHOAドミナントネガティブmRNA発現レベルを決定する代替方法は、例えば、rtPCR（Mullis、1987、米国特許第4,683,202号に記載された実験的实施形態）、リガーゼ連鎖反応（Barany、1991、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、88:189-193）、自家持続配列複製法（Guatelli et al.、1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878）、転写増幅システム（Kwoh et al.、1989、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177）、Q-ベータレプリカーゼ（Lizardi et al.、1988、Bio/Technology 6:1197）、ローリングサークル複製（Lizardi et al.、米国特許第5,854,033号）、または他の任意の核酸増幅法、による核酸増幅のプロセス、それに続く当業者に周知の技術を使用する増幅分子の検出、を含む。これらの検出スキームは、核酸分子が非常に少ない数で存在する場合、核酸分子の検出に特に役立つ。本明細書で使用する増幅プライマーは、遺伝子の5'または3'領域（それぞれプラス鎖とマイナス鎖、またはその逆）にアニールし、間に短い領域を含むことができる一対の核酸分子として定義される。一般に、増幅プライマーは約10~30の長さのヌクレオチドであり、約50~200の長さのヌクレオチドの領域に隣接する。適切な条件下で、適切な試薬を使用して、そのようなプライマーは、プライマーが隣接するヌクレオチド配列を含む核酸分子の増幅を可能にする。

【0103】

インサイチュ法の場合、mRNAは検出前に細胞から分離する必要は無い。そのような方法において、細胞または組織試料は、既知の組織学的方法を使用して調製/処理される。次に、試料を支持体、通常、スライドガラスに固定し、RHOAドミナントネガティブmRNAにハイブリダイズできるプローブと接触させる。

【0104】

絶対的RHOAドミナントネガティブポリペプチド発現レベルに基づいて決定を行う代わりに、決定は正規化されたRHOAドミナントネガティブポリペプチド発現レベルに基づいてもよい。発現レベルは、その発現を非RHOAドミナントネガティブポリペプチド遺伝子、例えば構成的に発現されるハウスキーピング遺伝子の発現と比較することにより絶対的RHOAドミナントネガティブポリペプチド発現レベルを補正することにより正規化される。正規化に適した遺伝子には、アクチン遺伝子などのハウスキーピング遺伝子、または上皮細胞特異的遺伝子が含まれる。この正規化により、ある試料（例えば、対象試料）の発現レベルを別の試料（例えば、正常な試料）で、または異なる出所の試料間で比較できる。

【0105】

RHOAドミナントネガティブ変異体のレベルまたは活性は、発現されたポリペプチドを検出または定量化することにより検出および/または定量化することもできる。RHO

Aドミナントネガティブポリペプチドは、当業者に周知の多数の手段のいずれかによって検出および定量化することができる。これらには、電気泳動、キャピラリー電気泳動、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、薄層クロマトグラフィー（TLC）、超拡散クロマトグラフィーなどの分析生化学的方法、または流体またはゲル沈降反応、免疫拡散（単純または二重）、免疫電気泳動、放射免疫測定法（RIA）、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、免疫蛍光分析、ウエスタンブロット法などの免疫学的方法が含まれる。当業者は、細胞がRHOAドミナントネガティブポリペプチドを発現するかどうかを決定する際に使用するための既知のタンパク質／抗体検出方法を容易に適合させることができる。

【0106】

b. 組換え発現ベクターと宿主細胞

本発明の別の態様は、RHOAドミナントネガティブポリペプチド（またはその一部）をコードする核酸を含むベクター、好ましくは発現ベクターの使用に関する。本明細書で使用される「ベクター」という用語は、それが連結されている別の核酸を輸送することができる核酸分子を指す。ベクターの1つのタイプは「プラスミド」で、追加のDNAセグメントを連結できる環状の二本鎖DNAループを指す。別のタイプのベクターはウイルスベクターであり、追加のDNAセグメントをウイルスゲノムに連結することができる。特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞内で自律複製が可能である（例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソード哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソード哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それにより、宿主ゲノムとともに複製される。さらに、特定のベクターは、それらに作動可能に連結されている遺伝子の発現を指示することができる。そのようなベクターは、本明細書において「発現ベクター」と呼ばれる。一般に、組換えDNA技術で有用な発現ベクターは、多くの場合、プラスミドの形をしている。本明細書では、プラスミドがベクターの最も一般的に使用される形態であるため、「プラスミド」および「ベクター」を交換可能に使用することができる。しかし、本発明は、同等の機能を果たす、ウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス）などの発現ベクターの他の形態を含むことを意図している。一実施形態では、ドミナントネガティブRHOA核酸分子を含むアデノウイルスベクターが使用される。

【0107】

本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞における核酸の発現に適した形態の本発明の核酸を含み、このことは、組換え発現ベクターが、発現される核酸配列に作動可能に連結されている、発現に使用される宿主細胞に基づいて選択される、1つ以上の調節配列を含むことを意味する。組換え発現ベクター内で、「作動可能に連結されている」とは、目的のヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列の発現を可能にする方法で（例えば、インビトロ転写／翻訳システムにおいてまたは宿主細胞にベクターが導入された場合の宿主細胞内で）、調節配列（複数可）に連結されていることを意味することを意図する。「調節配列」という用語は、プロモーター、エンハンサー、および他の発現制御要素（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことを意図している。そのような調節配列は、例えば、Gooden et al.; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)に記載されている。調節配列には、多くのタイプの宿主細胞でヌクレオチド配列の構成的発現を指示するもの、および特定の宿主細胞でのみヌクレオチド配列の発現を指示するもの（例えば、組織特異的調節配列）が含まれる。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベルなどの要因に依存する可能性があることを当業者は理解するであろう。本発明の発現ベクターを宿主細胞に導入することにより、本明細書に記載の核酸によってコードされる融合タンパク質またはペプチドを含むタンパク質またはペプチドを産生することができる。

【0108】

本発明の組換え発現ベクターは、原核細胞または真核細胞におけるドミナントネガティブ

ブRHOAの発現のために設計することができる。例えば、ドミナントネガティブRHOAは、大腸菌などの細菌細胞、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを使用して）酵母細胞、または哺乳動物細胞で発現できる。適切な宿主細胞については、Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)でさらに説明されている。あるいは、組換え発現ベクターは、例えば、T7プロモーター調節配列およびT7ポリメラーゼを使用して、インビトロで転写および翻訳され得る。

【0109】

原核生物におけるタンパク質の発現は、ほとんどの場合、融合タンパク質または非融合タンパク質の発現を指示する構成的または誘導性プロモーターを含むベクターを用いて大腸菌で行われる。融合ベクターは、そこにコードされるタンパク質、通常は組換えタンパク質のアミノ末端に多くのアミノ酸を追加する。そのような融合ベクターは、通常、次の3つの目的に役立つ。1) 組換えタンパク質の発現を増加させる、2) 組換えタンパク質の溶解度を高める、3) アフィニティー精製のリガンドとして作用することにより、組換えタンパク質の精製を支援する。多くの場合、融合発現ベクターでは、タンパク質分解切断部位が融合部分と組換えタンパク質の接合部に導入され、融合タンパク質の精製後に融合部分から組換えタンパク質を分離できるようにする。そのような酵素、およびそれらの同族認識配列には、Xa因子、トロンビンおよびエンテロキナーゼが含まれる。典型的な融合発現ベクターには、融合するpGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D. B. and Johnson, K. S. (1988) Gene 67: 31-40)、pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) およびpRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) が含まれ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST)、マルトース結合タンパク質、またはプロテインAを、それぞれ標的組換えタンパク質に結合する。一実施形態では、ドミナントネガティブRHOAのコード配列をpGEX発現ベクターにクローニングして、N末端からC末端まで、および/またはGSTトロンビン切断部位ドミナントネガティブRHOAを含む融合タンパク質をコードするベクターを作成する。融合タンパク質は、グルタチオン-アガロース樹脂を使用したアフィニティークロマトグラフィーで精製できる。GSTに融合されていない組換えRHOAドミナントネガティブポリペプチドは、トロンビンによる融合タンパク質の切断によって回収することができる。

【0110】

適切な誘導性非融合大腸菌発現ベクターの例には、pTrc (Amann et al., (1988) Gene 69: 301-315) およびpET 11d (Studier et al., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89) が含まれる。pTrcベクターからの標的遺伝子発現は、ハイブリッドtrp-lac融合プロモーターからの宿主RNAポリメラーゼ転写に依存している。pET 11dベクターからの標的遺伝子発現は、共発現されたウイルスRNAポリメラーゼ (T7 gnl) によって媒介されるT7 gnl0-lac融合プロモーターからの転写に依存している。このウイルスポリメラーゼは、lacUV 5プロモーターの転写制御下にあるT7 gnl遺伝子を内在するλプロファージから宿主株BL21 (DE3) またはHMS174 (DE3) によって供給される。

【0111】

大腸菌での組換えタンパク質の発現を最大にするための1つの戦略は、組換えタンパク質をタンパク質分解的に切断する能力が損なわれた宿主細菌でタンパク質を発現させることである (Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128)

。別の戦略は、各アミノ酸の個々のコドンが大腸菌で優先的に利用されるように、発現ベクターに挿入される核酸の核酸配列を変更することである (Wada et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118)。本発明の核酸配列のそのような変更は、標準的なDNA合成技術により実施することができる。

【0112】

別の実施形態では、ドミナントネガティブRHOA発現ベクターは酵母発現ベクターである。酵母 *S. cerevisiae* での発現用ベクターの例には、pYepSec1 (Baldari, et al., (1987) *EMBO J.* 6:229-234)、pMFa (Kurjan and Herskowitz, (1982) *Cell* 30:933-943)、pJRY88 (Schultz et al., (1987) *Gene* 54:113-123)、および pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA) が含まれる。

10

【0113】

あるいは、バキュロウイルス発現ベクターを使用して、ドミナントネガティブRHOAを昆虫細胞で発現させることができる。培養昆虫細胞 (Sf9細胞など) でのタンパク質の発現に利用可能なバキュロウイルスベクターには、pAcシリーズ (Smith et al. (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) および pVLシリーズ (Lucklow and Summers (1989) *Virology* 170:31-39) が含まれる。

【0114】

さらに別の実施形態では、本発明の核酸は、哺乳動物発現ベクターを使用して哺乳動物細胞で発現される。哺乳動物発現ベクターの例には、pCDM8 (Seed, B. (1987) *Nature* 329:840) および pMT2PC (Kaufman et al. (1987) *EMBO J.* 6:187-195) が含まれる。哺乳動物細胞で 사용되는場合、発現ベクターの制御機能は多くの場合、ウイルスの調節要素によって提供される。例えば、一般的に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、およびシミアンウイルス40に由来する。原核細胞および真核細胞の両方に適した他の発現システムについては、Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989の16章と17章を参照されたい。

20

30

【0115】

別の実施形態では、組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型において優先的に核酸の発現を指示することができる (例えば、組織特異的調節エレメントを使用して核酸を発現させる)。組織特異的な調節エレメントは、当技術分野で知られている。適切な組織特異的プロモーターの非限定的な例には、アルブミンプロモーター (肝臓特異的; Pinkert et al. (1987) *Genes Dev.* 1:268-277)、リンパ特異的プロモーター (Calame and Eaton (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275)、特にT細胞受容体のプロモーター (Winoto and Baltimore (1989) *EMBO J.* 8:729-733) および免疫グロブリン (Banerji et al. (1983) *Cell* 33:729-740; Queen and Baltimore (1983) *Cell* 33:741-748)、ニューロン特異的プロモーター (例えば、ニューロフィラメントプロモーター; Byrne and Ruddle (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477)、膵臓特異的プロモーター (Edlund et al. (1985) *Science* 230:912-916)、および乳腺特異的プロモーター (例えば、乳漿乳清プロモーター; 米国特許第4, 873, 316号およびヨーロッパ特許出願第264, 166号) が含まれる。発達的に調節されたプロモーター、

40

50

例えばマウスホックス (hox) プロモーター (Kessel and Gruss (1990) Science 249:374-379) および α -フェトプロテインプロモーター (Campes and Tilghman (1989) Genes Dev. 3:537-546) も包含される。

【0116】

本発明の別の態様は、本発明の組換え発現ベクターまたは核酸が導入された宿主細胞に関する。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書で互換的に使用される。そのような用語は、特定の対象細胞だけでなく、そのような細胞の子孫または潜在的な子孫を指すことが理解される。変異または環境の影響のいずれかにより、後続の世代で特定の変更が発生する可能性があるため、そのような子孫は実際には親細胞と同一ではないかもしれないが、本明細書で使用される用語の範囲内に含まれる。

10

【0117】

宿主細胞は、任意の原核細胞または真核細胞であり得る。例えば、RHOAドミナントネガティブポリペプチドは、大腸菌などの細菌細胞、昆虫細胞、酵母または哺乳動物細胞 (Fa o 肝細胞癌細胞、初代肝細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) またはCOS細胞) で発現できる。他の適切な宿主細胞は、当業者に周知である。

【0118】

ベクターDNAは、従来の形質転換またはトランスフェクション技術により原核細胞または真核細胞に導入できる。本明細書で使用する「形質転換」および「トランスフェクション」という用語は、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウムの共沈、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションを含む、外来核酸 (例えば、DNA) を宿主細胞に導入するための様々な技術的に認められた技術を指すことを意図する。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトするための適切な方法は、Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) および他の実験室マニュアルに記載されている。

20

【0119】

細胞培養には、宿主細胞、培地、その他の副産物が含まれる。細胞培養に適した培地は、当技術分野で周知である。RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその断片は、細胞およびポリペプチドを含む培地の混合物から分泌および単離され得る。あるいは、RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその断片は、細胞質的に保持され、細胞が収集され、溶解され、タンパク質またはタンパク質複合体が単離され得る。RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその断片は、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、限外ろ過、電気泳動、およびドミナントネガティブRHOAまたはその断片の特定のエピトープに特異的な抗体を用いる免疫親和性による精製を含む、タンパク質を精製するための当技術分野で既知の技術を使用して、細胞培養培地、宿主細胞、またはその両方から単離され得る。

30

【0120】

いくつかの実施形態において、RHOAドミナントネガティブポリペプチド、またはその生物学的に活性な断片は、異種ポリペプチドに融合され得る。特定の実施形態では、融合ポリペプチドは、対応する非融合RHOAドミナントネガティブポリペプチド、またはその生物学的に活性な断片よりも長い半減期および/または細胞透過性を有する。例えば、RHOAドミナントネガティブポリペプチドを細胞透過性ペプチドに融合させて、RHOAドミナントネガティブポリペプチドの無傷細胞への送達を容易にすることができる。タンパク質伝達ドメイン (PTD) としても知られる細胞透過性ペプチドは、細胞膜を自由に通過できる小さなペプチドドメインを持つキャリアである。融合タンパク質がタンパク質形質導入として知られるプロセスで細胞膜を効率的に通過できるようにするいくつかのPTDが特定されている。研究により、HIV TATタンパク質に由来するTATペ

40

50

プチドは、ペプチドまたはタンパク質を様々な細胞に伝達する能力があることが実証されている。PTDは抗癌戦略で利用されており、例えば、細胞透過性Bcl-2結合ペプチドcpm1285は、マウスのヒト骨髄性白血病の成長を遅らせる活性を示す。特定のSH2ドメイン含有タンパク質の受容体結合部位を模倣するFGFR730pYなどの細胞透過性リンペプチドは、癌研究および細胞シグナル伝達機構研究の有望なツールである。他の実施形態では、異種タグは、当該分野で既知の標準方法に従って、精製目的に使用され得る（例えば、エピトープタグおよびFC融合タグ）。

【0121】

したがって、RHOAドミナントネガティブポリペプチドのすべてまたは選択された部分をコードするヌクレオチド配列を使用して、微生物または真核生物の細胞プロセスを介してタンパク質の組換え形態を生成することができる。配列を発現ベクターなどのポリヌクレオチド構築物に連結し、真核生物（酵母、鳥類、昆虫または哺乳動物）または原核生物（細菌細胞）のいずれかの宿主に形質転換またはトランスフェクトすることが標準的な手順である。本発明による微生物手段または組織培養技術により、組換えRHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその断片を調製するために、同様の手順またはその改変を使用することができる。

【0122】

別の変形では、タンパク質の産生は、インビトロ翻訳システムを使用して達成され得る。インビトロ翻訳システムは、一般に、RNA分子のタンパク質への翻訳に必要な少なくとも最小限の要素を含む無細胞抽出物である翻訳システムである。インビトロ翻訳システムには、通常、少なくともリボソーム、tRNA、イニシエーターメチオニル-tRNA Met、翻訳に関与するタンパク質または複合体、例えば、eIF2、eIF3、キャップ結合タンパク質（CBP）を含むキャップ結合（CB）複合体、および真核生物開始因子4F（eIF4F）が含まれる。様々なインビトロ翻訳システムが当技術分野で周知であり、市販のキットが含まれる。インビトロ翻訳システムの例には、ウサギ網状赤血球溶解物、ウサギ卵母細胞溶解物、ヒト細胞溶解物、昆虫細胞溶解物および小麦胚芽抽出物などの真核生物溶解物が含まれる。溶解物は、Promega Corp., Madison, Wis., Stratagene, La Jolla, Calif, Amersham, Arlington Heights, Ill., およびGIBCO/BRL, Grand Island, N. Y.などの製造者から市販されている。インビトロ翻訳システムは通常、酵素、翻訳、開始および伸長因子、化学試薬、およびリボソームなどの高分子を含んでいる。さらに、インビトロ転写システムを使用できる。そのようなシステムは、通常、少なくともRNAポリメラーゼホロ酵素、リボヌクレオチド、および任意の必要な転写開始、伸長および終結因子を含む。インビトロ転写および翻訳は、ワンポット反応で結合されて、1つ以上の単離されたDNAからタンパク質を産生し得る。

【0123】

特定の実施形態では、RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその断片は、化学的に、無細胞系でリボソーム的に、または細胞内でリボソーム的に合成され得る。化学合成は、段階的な固相合成、ペプチド断片の立体配座支援再ライゲーシオン（conformationally-assisted re-ligation）による半合成、クローン化または合成ペプチドセグメントの酵素的ライゲーシオン、化学的ライゲーシオンなど、様々な技術で認識されている方法を使用して実行できる。天然の化学的ライゲーシオンは、2つの非保護ペプチドセグメントの化学選択的反応を使用して、一過性のチオエステル連結中間体を産生する。次いで、一過性のチオエステル連結中間体は、自然に転位を受けて、ライゲーシオン部位に天然のペプチド結合を有する完全長のライゲーシオン産物を提供する。完全長のライゲーシオン産物は、無細胞合成で生成されたタンパク質と化学的に同一である。全長のライゲーシオン産物は、許容されるようにリフォールディングおよび／または酸化されて、天然型のジスルフィド含有タンパク質分子を形成し得る。（例えば、米国特許第6,184,344号および同第6,174,530号、を参照されたいおよびT. W. Muir et al., Curr. Opin. Biotech

. (1993): vol. 4, p420、M. Miller, et al., Science (1989): vol. 246, p1149、A. Wlodawer, et al., Science (1989): vol. 245, p616、L. H. Huang, et al., Biochemistry (1991): vol. 30, p7402、M. Schmolzer, et al., Int. J. Pept. Prot. Res. (1992): vol. 40, p180-193、K. Rajarathnam, et al., Science (1994): vol. 264, p90、R. E. Offord, "Chemical Approaches to Protein Engineering", in Protein Design and the Development of New therapeutics and Vaccines, J. B. Hook, G. Poste, Eds., (Plenum Press, New York, 1990) pp. 253-282、C. J. A. Wallace, et al., J. Biol. Chem. (1992): vol. 267, p3852、L. Abrahmsen, et al., Biochemistry (1991): vol. 30, p4151、T. K. Chang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91:12544-12548、M. Schnlzer, et al., Science (1992): vol. , 3256, p221、およびK. Akaji, et al., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) (1985) 33:184を参照されたい)。

10

【0124】

20

哺乳動物細胞の安定したトランスフェクションのために、使用される発現ベクターとトランスフェクション技術に応じて、細胞のごく一部のみが外来DNAをゲノムに組み込むことが知られている。これらの組み込み体を特定および選択するために、選択可能なマーカー（例えば、抗生物質に対する耐性）をコードする遺伝子は、一般に関心のある遺伝子とともに宿主細胞に導入される。好ましい選択マーカーには、G418、ハイグロマイシン、およびメトトレキサートなどの薬物に対する耐性を付与するマーカーが含まれる。選択マーカーをコードする核酸は、ドミナントネガティブRHOAをコードするものと同じベクター上の宿主細胞に導入するか、別のベクターに導入することができる。導入された核酸で安定的にトランスフェクトされた細胞は、薬物選択によって特定できる（例えば、選択マーカー遺伝子を組み込んだ細胞は生き残るが、他の細胞は死ぬ）。

30

【0125】

培養中の原核生物または真核生物宿主細胞などの本発明の宿主細胞を使用して、RHOAドミナントネガティブポリペプチドを産生（すなわち発現）することができる。したがって、本発明はさらに、本発明の宿主細胞を使用してRHOAドミナントネガティブポリペプチドを産生する方法を提供する。一実施形態では、本方法は、RHOAドミナントネガティブポリペプチドが産生されるまで、本発明の宿主細胞（ドミナントネガティブRHOAをコードする組換え発現ベクターが導入されている）を適切な培地で培養することを含む。別の実施形態において、本方法は、培地または宿主細胞からRHOAドミナントネガティブポリペプチドを単離することをさらに含む。

【0126】

40

本発明の宿主細胞はまた、例えば、RHOAドミナントネガティブポリペプチドを過剰発現するか、またはRHOAドミナントネガティブポリペプチドを過剰分泌するヒトまたは非ヒトトランスジェニック動物および／または細胞を産生するために使用できる。非ヒトトランスジェニック動物は、びまん性胃癌（DGC）、乳小葉癌、または他のタイプのEMT癌などの選択した障害の有害な症状を寛解させることができる薬剤または化合物などを特定するために設計されたスクリーニングアッセイで使用できる。例えば、一実施形態では、本発明の宿主細胞は、ドミナントネガティブRHOAコード配列またはその断片が導入されている受精卵母細胞または胚性幹細胞である。次いで、そのような宿主細胞を使用して、外因性ドミナントネガティブRHOA配列がそのゲノムに導入された非ヒトトランスジェニック動物または内在性RHOA配列が変更された相同組換え動物を作成する

50

ことができる。そのような動物は、ドミナントネガティブRHOAまたはその断片の機能および／または活性の研究、ならびにドミナントネガティブRHOA活性のモジュレーターの特定および／または評価に有用である。本明細書で使用する「トランスジェニック動物」は、その動物の細胞の1つ以上が導入遺伝子を含む非ヒト動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはラットまたはマウスなどのげっ歯類である。トランスジェニック動物の他の例には、非ヒト霊長類、羊、犬、牛、ヤギ、鶏、両生類などが含まれる。導入遺伝子は、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノムに組み込まれ、成熟動物のゲノムに残る外因性DNAであり、それにより、トランスジェニック動物の1つ以上の細胞型または組織におけるコードされた遺伝子産物の発現を指示する。本明細書で使用する「相同組換え動物」は、内在性RHOA遺伝子が、内在性遺伝子と動物の細胞、例えば動物の発生前の動物の胚細胞に導入された外因性DNA分子との間の相同組換えによって変更されている、非ヒト動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはマウスである動物、である。

10

【0127】

本発明のトランスジェニック動物は、例えばマイクロインジェクション、レトロウイルス感染により受精卵母細胞の雄性前核にドミナントネガティブRHOAまたはその断片をコードする核酸を導入し、偽妊娠した雌の里親動物で卵母細胞を発達させることにより作製することができる。ヒトドミナントネガティブRHOA cDNA配列は、トランスジェンとして非ヒト動物のゲノムに導入できる。あるいは、ヒトドミナントネガティブRHOA遺伝子の非ヒト相同体を導入遺伝子として使用することができる。イントロン配列およびポリアデニル化シグナルも導入遺伝子に含めて、導入遺伝子の発現効率を高めることができる。組織特異的調節配列（複数可）をドミナントネガティブRHOAトランスジェンに操作可能に連結させて、特定の細胞にRHOAドミナントネガティブポリペプチドの発現を指示することができる。胚操作およびマイクロインジェクションを介してトランスジェニック動物、特にマウスなどの動物を生成する方法は、当技術分野で慣行になっており、例えば、両方ともLeder et al. による米国特許第4,736,866号および同第4,870,009号に、およびWagner et al. による米国特許第4,873,191号に、およびHogan, B., Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1986)に記載されている。他のトランスジェニック動物の生産にも同様の方法が使用される。トランスジェニックファウンダー動物は、そのゲノムにおけるドミナントネガティブRHOAトランスジェンの存在および／または動物の組織または細胞におけるドミナントネガティブRHOA mRNAの発現に基づいて特定できる。次に、トランスジェニックファウンダー動物を使用して、導入遺伝子を保有する追加の動物を繁殖させることができる。さらに、ドミナントネガティブRHOAをコードする導入遺伝子を保有するトランスジェニック動物は、他の導入遺伝子を保有する他のトランスジェニック動物とさらに交配させることができる。

20

30

【0128】

相同組換え動物を作成するために、ドミナントネガティブRHOA遺伝子の少なくとも一部を含むベクターが調製される。ドミナントネガティブRHOA遺伝子は、ヒト遺伝子、またはヒトドミナントネガティブRHOA遺伝子の非ヒト相同体であり得る。例えば、ヒトドミナントネガティブRHOA遺伝子を使用して、マウスゲノム中の内在性RHOA遺伝子を改変するのに適した相同組換えベクターを構築することができる。相同組換えベクターでは、ドミナントネガティブRHOA遺伝子のドミナントネガティブ変異は、その5'および3'末端に追加のRHOA遺伝子の核酸が隣接しており、ベクターによって運ばれる外因性遺伝子と胚性幹細胞の内在性RHOA遺伝子の間に相同組換えが起こるようにする。追加の隣接RHOA核酸は、内在性遺伝子との相同組換えを成功させるのに十分な長さである。通常、数千ベースの隣接DNA（5'および3'末端の両方）がベクターに含まれる（相同組換えベクターの説明については、例えば、Thomas, K. R. and Capecchi, M. R. (1987) Cell 51:503を参照された

40

50

い)。ベクターを（例えば、エレクトロポレーションにより）胚性幹細胞株に導入し、導入されたドミナントネガティブRHOA遺伝子が内在性RHOA遺伝子と相同的に組換えられた細胞を選択する（例えば、Li, E. et al. (1992) Cell 69: 915を参照されたい）。その後、選択した細胞を動物（マウスなど）の胚盤胞に注入して凝集キメラを形成する（例えば、Bradley, A. in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987) pp. 113-152を参照されたい）。次いで、キメラ胚を適切な偽妊娠の雌の里親動物に移植し、胚を出産させることができる。生殖細胞に相同的に組換えられたDNAを持つ子孫は、動物のすべての細胞が導入遺伝子の生殖細胞系列伝達により相同的に組換えられたDNAを含む動物を繁殖させるのに使用できる。相同組換えベクターおよび相同組換え動物を構築する方法は、Bradley (1991) Current Opinion in Biotechnology 2: 823-829およびLe Mouellec et al. によるPCT国際公開番号WO90/11354、Smitthies et al. によるWO91/01140、Zijlstra et al. によるWO92/0968、およびBerns et al. によるWO93/04169にさらに記載される。

【0129】

別の実施形態では、導入遺伝子の調節された発現を可能にする選択されたシステムを含むトランスジェニック非ヒト動物を作製することができる。そのようなシステムの一例は、バクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼシステムである。cre/loxPリコンビナーゼシステムの説明については、例えば、Lakso et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6232-6236を参照されたい。リコンビナーゼシステムの別の例は、Saccharomyces cerevisiaeのFLPリコンビナーゼシステムである（O'Gorman et al. (1991) Science 251: 1351-1355。cre/loxPリコンビナーゼシステムを使用して導入遺伝子の発現を調節する場合、Creリコンビナーゼと選択したタンパク質の両方をコードする導入遺伝子を含む動物が必要である。そのような動物は、例えば、一方は選択されたタンパク質をコードする導入遺伝子を含み、他方はリコンビナーゼをコードする導入遺伝子を含む2つのトランスジェニック動物を交配させることによる、「二重」トランスジェニック動物の構築を通じて提供することができる。

【0130】

本明細書に記載の非ヒトトランスジェニック動物のクローンは、Wilmut, I. et al. (1997) Nature 385: 810-813およびPCT国際公開番号WO97/07668およびWO97/07669に記載の方法に従って作製することもできる。手短に言えば、トランスジェニック動物からの細胞、例えば体細胞を単離し、成長サイクルを終了してG0期に入るように誘導することができる。次いで、静止細胞は、例えば、電気パルスの使用を介して、静止細胞が単離されるのと同じ種の動物からの除核卵母細胞に融合され得る。次に、再構成された卵母細胞は、桑実胚または胚盤胞に発達するように培養され、その後、偽妊娠の雌の里親動物に移される。この雌の里親動物から生まれた子孫は、細胞、例えば体細胞が単離される動物のクローンになる。

【0131】

c. 単離されたRHOAドミナントネガティブポリペプチド

本発明はまた、本明細書に記載の方法に従って使用するための、可溶性、精製および／または単離されたRHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその断片を提供する。

【0132】

一態様では、RHOAドミナントネガティブポリペプチドは、全長ドミナントネガティブRHOAアミノ酸配列または1～約20個の保存的アミノ酸置換を有する全長ドミナント

トネガティブRHOAアミノ酸配列を含み得る。本明細書に記載の任意のRHOAドミナントネガティブポリペプチドのアミノ酸配列は、本明細書に記載の当該分野で周知の目的のRHOAドミナントネガティブポリペプチド配列、またはその断片と、少なくとも50、55、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または99.5%同一であってもよい。加えて、本明細書に記載の任意のRHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその断片は、以下の生物学的活性：癌細胞生存、癌細胞増殖、および腫瘍サイズ／体積、の1つ以上を調節（例えば、減少）することができる。

【0133】

別の態様では、本発明は、単離されたRHOAドミナントネガティブポリペプチドおよび約25%、あるいは15%、あるいは5%未満の混入生体高分子またはポリペプチドを含む組成物を企図する。

【0134】

本発明はさらに、核酸、ベクター、宿主細胞などのRHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその断片の産生、検出、または特徴付けに関する組成物を提供する。そのような組成物は、アンチセンス核酸など、RHOAドミナントネガティブポリペプチドの発現および／または活性を調節する化合物として役立ち得る。

【0135】

特定の実施形態において、本発明のRHOAドミナントネガティブポリペプチドは、その溶解性および生物学的利用能を増大させ、および／またはその精製、特定、検出、および／または構造的な特徴付けを容易にするドメインを含む融合タンパク質であり得る。いくつかの実施形態では、融合パートナーが血漿中の融合タンパク質の安定性を高め、および／または全身の生物学的利用能を高めるRHOAドミナントネガティブ融合ポリペプチドを発現させることが有用であり得る。例示的なドメインには、例えば、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、プロテインA、プロテインG、カルモジュリン結合ペプチド、チオレドキシン、マルトース結合タンパク質、HA、myc、ポリアルギニン、ポリHis、ポリHis-AspまたはFLAG融合タンパク質およびタグ、が含まれる。追加の例示的なドメインには、シグナルペプチド、タイプ2I分泌系ターゲットペプチド、トランスサイトシスドメイン、核局在化シグナルなど、インビボでタンパク質の局在化を変化させるドメインが含まれる。種々の実施形態では、本発明のRHOAドミナントネガティブポリペプチドは、1つ以上の異種融合を含み得る。ポリペプチドは、同じ融合ドメインの複数のコピーを含んでも、2つ以上の異なるドメインへの融合を含んでもよい。融合は、ポリペプチドのN末端、ポリペプチドのC末端、またはポリペプチドのN末端とC末端の両方で起こり得る。融合タンパク質の構築を容易にするため、または融合タンパク質のタンパク質発現または構造的制約を最適化するために、本発明のポリペプチドと融合ドメインとの間にリンカー配列を含めることも本発明の範囲内である。一実施形態では、リンカーは、本明細書に記載のリンカー、例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20またはそれ以上のアミノ酸のリンカーである。リンカーは、例えば、非構造化組換えポリマー（URP）、例えば、9、10、11、12、13、14、15、20の長さのアミノ酸であるURPであってよく、すなわち、リンカーは、二次構造、例えばChou-Fasmanアルゴリズム、を制限されているかまたは欠く。例示的なリンカーは、アミノ酸配列GGGGAAGGGGを含む（例えば、アミノ酸配列GGGGAAGGGGからなる）。別の実施形態では、タンパク質発現後またはその後にはタグを除去するために、融合ポリペプチドと本発明のポリペプチドとの間にプロテアーゼ切断部位を含むようにポリペプチドを構築することができる。適切なエンドプロテアーゼの例には、例えば、第Xa因子およびTEVプロテアーゼが含まれる。

【0136】

いくつかの実施形態では、RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその断片は、抗体（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）断片（例えば、Fcポリペプチド）に融合される。これらの融合タンパク質を調製するための技術は知られており、

例えば、WO 99/31241 および Cosman et. al. (2001) Immunity 14:123-133 に記載されている。Fc ポリペプチドへの融合は、プロテイン A または プロテイン G カラムでのアフィニティークロマトグラフィーによる精製を容易にするという追加の利点を提供する。

【0137】

さらに別の実施形態では、RHOA ドミナントネガティブポリペプチドは、それらの検出、精製、または構造的特徴付けを容易にするために蛍光標識で標識され得る。例示的な実施形態では、本発明の RHOA ドミナントネガティブポリペプチドは、例えば、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、高感度 (enhanced) 緑色蛍光タンパク質 (EGFP)、Renilla Reniformis 緑色蛍光タンパク質、GFPmut2、GFPuv4、高感度黄色蛍光タンパク質 (EYFP)、高感度シアン蛍光タンパク質 (ECFP)、高感度青色蛍光タンパク質 (EBFP)、discosoma からのシトリンおよび赤色蛍光タンパク質 (dsRED) を含む検出可能な蛍光シグナルを生成する異種ポリペプチド配列に融合され得る。

【0138】

「単離された」または「精製された」タンパク質またはその生物学的に活性な部分は、組換え DNA 技術によって生成される場合、細胞物質を実質的に含まない、または化学合成される場合、化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない。「細胞物質を実質的に含まない」という言葉には、天然または組換えにより産生される細胞の細胞成分からポリペプチドが分離されている RHOA ドミナントネガティブポリペプチドの調製物が含まれる。一実施形態では、「細胞物質を実質的に含まない」という言葉は、約 30% 未満 (乾燥重量で) の非 RHOA ドミナントネガティブポリペプチド (本明細書では「混入タンパク質」とも呼ばれる)、より好ましくは約 20% 未満の非 RHOA ドミナントネガティブポリペプチド、さらにより好ましくは約 10% 未満の非 RHOA ドミナントネガティブポリペプチド、最も好ましくは約 5% 未満の非 RHOA ドミナントネガティブポリペプチド、を有する、RHOA ドミナントネガティブポリペプチドの調製物を含む。RHOA ドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分が組換えにより産生される場合、それはまた、好ましくは培地を実質的に含まない、すなわち、培地は、タンパク質調製物の体積の約 20% 未満、より好ましくは約 10% 未満、最も好ましくは約 5% 未満に相当する。「化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」という言葉には、ポリペプチドが、そのポリペプチドの合成に関与する化学前駆体または他の化学物質から分離されている RHOA ドミナントネガティブポリペプチドの調製物が含まれる。一実施形態では、「化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」という用語には、約 30% 未満 (乾燥重量で) の非 RHOA ドミナントネガティブポリペプチド化学物質の化学前駆体、より好ましくは約 20% 未満の非 RHOA ドミナントネガティブポリペプチド化学物質の化学前駆体、さらにより好ましくは約 10% 未満の非 RHOA ドミナントネガティブポリペプチド化学物質の化学前駆体、最も好ましくは約 5% 未満の非 RHOA ドミナントネガティブポリペプチド化学物質の化学前駆体、を有する RHOA ドミナントネガティブポリペプチドの調製物が含まれる。好ましい態様において、単離されたポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分は、RHOA ドミナントネガティブポリペプチドが由来する同じ動物からの混入ポリペプチドを欠く。通常、そのようなポリペプチドは、例えば非ヒト細胞におけるヒト RHOA ドミナントネガティブポリペプチドの組換え発現により産生される。

【0139】

好ましい実施形態では、タンパク質またはその部分は、配列番号 1、2、または 3 のアミノ酸配列またはその断片と十分に相同なアミノ酸配列を含み、その結果、タンパク質またはその部分は、以下の生物学的活性：癌細胞の生存、癌細胞の増殖、および腫瘍の大きさ/体積の 1 つ以上を、または複合して維持し、前記の生物学的活性の 1 つ以上を調節 (例えば、減少) する。タンパク質の部分は、本明細書に記載の生物学的に活性な部分であることが好ましい。別の好ましい実施形態では、RHOA ドミナントネガティブポリペ

チドは、それぞれ配列番号1、2、もしくは3に示されるアミノ酸配列、またはその断片、または、配列番号1、2、もしくは3に示されるアミノ酸配列、またはその断片と、少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上相同であるアミノ酸配列を有する。さらに別の好ましい実施形態では、RHODAドミナントネガティブポリペプチドは、配列番号4、5、6、7、8、9、10、もしくは11のヌクレオチド配列、またはその断片にハイブリダイズする、例えばストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列、または配列番号4、5、6、7、8、9、10、もしくは11に示されるヌクレオチド配列またはその断片と、少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、より好ましくは少なくとも約70%、さらに
10
より好ましくは少なくとも約80%、さらにまた好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%、またはそれ以上相同であるヌクレオチド配列、によってコードされるアミノ酸配列を有する。本発明の好ましいRHODAドミナントネガティブポリペプチドはまた、好ましくは、本明細書に記載のRHODAドミナントネガティブポリペプチドの生物学的活性の少なくとも1つを有する。

【0140】

RHODAドミナントネガティブタンパク質の生物学的に活性な部分には、RHODAドミナントネガティブタンパク質のアミノ酸配列、例えば、配列番号1、2、もしくは3に示されるアミノ酸配列、またはその断片に由来する、または、RHODAドミナントネガティブタンパク質に相同なタンパク質のアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列を含むペプチド
20
が含まれ、全長RHODAドミナントネガティブタンパク質、またはRHODAドミナントネガティブタンパク質に相同な全長ポリペプチドよりも少ないアミノ酸を含み、RHODAドミナントネガティブタンパク質の少なくとも1つの活性を示す。通常、生物学的に活性な部分（ペプチド、例えば、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100またはそれ以上の長さのアミノ酸であるペプチド）は、ドメインまたはモチーフ（例えば、全長タンパク質マイナス、シグナルペプチド）を含む。好ましい実施形態では、本明細書に記載の1つ以上のドメイン／モチーフを含むタンパク質の生物学的に活性な部分は、1つ以上の以下の生物学的活性：癌細胞生存、癌細胞増殖、および腫瘍サイズ／体積、を調節（例えば、減少）することができる。さらに、タンパク質の他の領域が欠失している他の生物学的に活性な部分は、組換え技術により調製し、本明細書に記載の活
30
性の1つ以上について評価することができる。好ましくは、RHODAドミナントネガティブタンパク質の生物学的に活性な部分は、生物学的活性を有する1つ以上の選択されたドメイン／モチーフまたはその部分を含む。一実施形態では、関心のあるドミナントネガティブRHODA断片は、240、230、220、210、200、195、190、185、180、175、170、165、160、155、150、145、140、135、130、125、120、115、110、105、100、95、90、85、80、75、または70未満の長さのアミノ酸である全長ドミナントネガティブRHODAタンパク質の部分からなる。

【0141】

RHODAドミナントネガティブタンパク質は、組換えDNA技術によって産生できる。
40
例えば、（上記のように）タンパク質をコードする核酸分子が発現ベクターにクローン化され、（上記のように）発現ベクターが宿主細胞に導入され、RHODAドミナントネガティブタンパク質が宿主細胞で発現される。RHODAドミナントネガティブタンパク質は、次に標準的なタンパク質精製技術を使用した適切な精製スキームによって細胞から単離できる。組換え発現の代わりに、RHODAドミナントネガティブタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドは、標準的なペプチド合成技術を使用して化学的に合成できる。さらに、天然のRHODAドミナントネガティブタンパク質は、例えば抗RHODA抗体を使用して、細胞（例えば、RHODAドミナントネガティブ変異を含む癌細胞）から単離できる。

【0142】

本発明はまた、ドミナントRHOKキメラまたは融合タンパク質を提供する。本明細書

10

20

30

40

50

で使用される場合、ドミナントRHOA「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、非RHOAドミナントネガティブポリペプチドに作動可能に連結されているRHOAドミナントネガティブポリペプチドを含む。「RHOAドミナントネガティブポリペプチド」とは、ドミナントネガティブRHOAに対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドを指し、「非RHOAドミナントネガティブポリペプチド」とは、ドミナントネガティブRHOAタンパク質、例えば、RHOAドミナントネガティブタンパク質とは異なり、同じまたは異なる生物に由来するタンパク質と、実質的に相同でないタンパク質に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドを指す。融合タンパク質内で、「作動可能に連結されている」という用語は、RHOAドミナントネガティブポリペプチドと非RHOAドミナントネガティブポリペプチドが互いにインフレームで融合していることを示すことを意図している。非RHOAドミナントネガティブポリペプチドは、RHOAドミナントネガティブポリペプチドのN末端またはC末端に融合させることができる。例えば、一実施形態では、融合タンパク質は、ドミナントネガティブRHOA-GSTおよび／またはドミナントネガティブRHOA-Fc融合タンパク質であり、ドミナントネガティブRHOA配列は、それぞれGSTまたはFc配列のN末端に融合している。そのような融合タンパク質は、ドミナントネガティブRHOAポリペプチドを使用して作製することができる。そのような融合タンパク質はまた、組換えドミナントネガティブRHOAの精製、発現、および／または生物学的利用能を容易にすることができる。別の実施形態では、融合タンパク質は、そのC末端に異種シグナル配列を含むドミナントネガティブRHOAタンパク質である。特定の宿主細胞（例えば、哺乳動物宿主細胞）では、異種シグナル配列を使用することにより、ドミナントネガティブRHOAの発現および／または分泌を増加させることができる。

【0143】

好ましくは、本発明のドミナントネガティブRHOAキメラまたは融合タンパク質は、標準的な組換えDNA技術によって産生される。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするDNA断片は、従来の技術に従って、例えば、ライゲーションのため平滑末端またはスタグガ末端（*stagger-ended*）終端、適切な終端を提供する制限酵素消化、必要に応じて粘着末端の充填、望ましくない結合を回避するためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素的ライゲーション、を使用することによって、インフレームで一緒にライゲーションされる。別の実施形態において、融合遺伝子は、自動化DNA合成装置を含む従来の技術により合成され得る。あるいは、遺伝子断片のPCR増幅はアンカープライマーを使用して実行でき、アンカープライマーは2つの連続した遺伝子断片の間に相補的なオーバーハングを生じさせ、その後、アニールしおよび再増幅してキメラ遺伝子配列を生成できる（例えば、*Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992を参照されたい）。さらに、融合部分（例えば、GSTポリペプチド）をすでにコードしている多くの発現ベクターが市販されている。ドミナントネガティブRHOAをコードする核酸は、融合部分がインフレームでRHOAドミナントネガティブタンパク質に連結されるように、そのような発現ベクターにクローニングすることができる。

【0144】

本発明はまた、RHOAドミナントネガティブタンパク質の相同体に関する。ドミナントネガティブRHOAタンパク質の相同体は、変異誘発、例えば、それぞれドミナントネガティブRHOAタンパク質の個別の点変異またはランケーションによって生成され得る。本明細書で使用する「相同体」という用語は、ドミナントネガティブRHOAタンパク質のバリエーションを指す。一実施形態では、天然に存在する形態のタンパク質の生物学的活性のサブセットを有する相同体による対象の治療は、ドミナントネガティブRHOAタンパク質の天然に存在する形態による治療に比べて、対象における副作用が少ない。

【0145】

別の実施形態では、ドミナントネガティブRHOAタンパク質の相同体は、ドミナント

ネガティブRHOAタンパク質の変異体、例えばトランケーション変異体のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることにより特定することができる。一実施形態では、ドミナントネガティブRHOAバリエーションの多彩なライブラリーは、核酸レベルでのコンビナトリアル変異誘発により生成され、多彩な遺伝子ライブラリーによりコードされる。ドミナントネガティブRHOAバリエーションの多彩なライブラリーは、例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物を遺伝子配列に酵素的に連結して、有望なドミナントネガティブRHOA配列の縮重 (degenerate) セットが個々のポリペプチドとして発現できるようにすることにより、または代わりに、その中にドミナントネガティブRHOA配列のセットを含有するより大きな融合タンパク質のセット (例えば、ファージディスプレイのための) として、作成することができる。縮重オリゴヌクレオチド配列から有望なドミナントネガティブRHOA相同体のライブラリーを作成するために使用できる様々な方法がある。縮重遺伝子配列の化学合成は、自動DNAシンセサイザーで実行でき、合成遺伝子は適切な発現ベクターに連結される。遺伝子の縮重セットを使用すると、有望なドミナントネガティブRHOA配列の望ましいセットをコード化するすべての配列を1つの混合物で提供できる。縮重オリゴヌクレオチドの合成方法は、当技術分野で知られている (例えば、Narang, S. A. (1983) Tetrahedron 39:3, Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323, Itakura et al. (1984) Science 198:1056, Ike et al. (1983) Nucleic Acid Res. 11:477を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0146】

さらに、ドミナントネガティブRHOAタンパク質コーディングの断片のライブラリーを使用して、RHOAドミナントネガティブタンパク質の相同体のスクリーニングおよびその後の選択のために、ドミナントネガティブRHOA断片の多彩な集団を生成できる。一実施形態では、コード化配列断片のライブラリーは、ドミナントネガティブRHOAコード化配列の二本鎖PCR断片を、分子当たり約1回だけニックングが発生する条件下、ヌクレアーゼで処理し、二本鎖DNAを変性させ、DNAを再生することにより生成できる異なるニック生成物からのセンス/アンチセンスペアを含むことができる二本鎖DNAを形成し、S1ヌクレアーゼで処理することにより改質二本鎖から一本鎖部分を除去し、得られた断片ライブラリーを発現ベクターに連結する。この方法により、様々なサイズのドミナントネガティブRHOAタンパク質のN末端、C末端、および内部断片をコードする発現ライブラリーを導き出すことができる。

【0147】

点変異またはトランケーションによって作成されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするための、および選択された特性を有する遺伝子産物についてcDNAライブラリーをスクリーニングするためのいくつかの技術が当技術分野で知られている。そのような技術は、ドミナントネガティブRHOA相同体のコンビナトリアル変異誘発によって生成された遺伝子ライブラリーの迅速なスクリーニングに適応可能である。大規模な遺伝子ライブラリーをスクリーニングするための、ハイスループット分析に適した最も広く使用されている技術には、通常、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクターにクローニングし、得られたベクターのライブラリーで適切な細胞を形質転換し、所望の活性の検出によりその産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離を容易にするという条件下で、コンビナトリアル遺伝子を発現させることが含まれる。ライブラリー中の機能的変異体の頻度を高める新しい技術である再帰的アンサンブル変異誘発 (Recursive ensemble mutagenesis) (REM) をスクリーニングアッセイと組み合わせて、ドミナントネガティブRHOA相同体を特定することができる (Arkin and Youvan (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815)。

【0148】

III. 薬剤と組成物の選択方法

本発明の別の態様は、減少したCDH1レベルを含む癌細胞の生存率または増殖を減少させる薬剤（例えば、RHOA変異体ポリペプチド）を選択する方法に関する。そのような方法は、細胞ベースおよび非細胞ベースのアッセイを含むスクリーニングアッセイを使用できる。

【0149】

一実施形態において、本発明は、減少したCDH1レベルを含む癌細胞の生存率または増殖を減少させる候補または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイに関する。そのような化合物には、制限なしに、RHOA変異体ポリペプチドが含まれる。

【0150】

一実施形態では、アッセイは、減少したCDH1レベルを含む癌細胞の生存率または増殖を低下させる薬剤をスクリーニングするための細胞ベースのアッセイであって、a) 癌細胞を、1) RHOA変異体、またはその生物学的に活性な断片をコードする核酸、および2) RHOA変異体ポリペプチド、またはその生物学的に活性な断片からなる群から選択される試験薬剤と接触させることと、b) 対照と比較して癌細胞の減少した生存率または増殖を決定し、それによって癌細胞の生存率または増殖を減少させる試験薬剤を特定することと、を含む。例えば、細胞増殖または浸潤は、本明細書でさらに説明されるように、細胞数カウント、細胞運動、マトリゲルアッセイ、増殖および／または浸潤関連遺伝子発現の誘導などを監視することにより決定できる。

【0151】

別の実施形態では、本発明のアッセイは、RHOA変異体ポリペプチド、またはその生物学的に活性な断片をGTPと接触させ、試験RHOA変異体ポリペプチドがGTPを組み込む能力を決定する無細胞アッセイである。試験RHOA変異体ポリペプチドへのGTPの取り込みは、様々な方法で決定できる。例えば、蛍光ヌクレオチドアナログN-メチルアントラニロイル-GTP (mant-GTP) のRHOAへの取り込みを、遊離のものとRHOA結合mant-GTPとの分光学的差異を測定することにより、分析する、RhogEF交換アッセイキット (cytoskeleton, Inc.) が使用できる。RHOAの存在下でのmant-GTP蛍光強度の増強は、GTPaseによるヌクレオチドの取り込みを示している。

【0152】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載のアッセイの2つ以上の組み合わせに関する。例えば、調節薬は、細胞ベースまたは無細胞アッセイを使用して特定でき、減少したCDH1レベルを含む癌細胞の生存率または増殖を減少させる薬剤の能力は、例えば、細胞形質転換および／または腫瘍形成の動物モデルなどの動物においてインビボで確認できる。

【0153】

本発明はさらに、上記のスクリーニングアッセイにより特定された新規薬剤に関する。したがって、本明細書に記載のように特定された薬剤を適切な動物モデルでさらに使用することは本発明の範囲内である。例えば、本明細書に記載されるように特定された薬剤は、そのような薬剤による治療の有効性、毒性、または副作用を決定するために動物モデルで使用するができる。あるいは、本明細書に記載のように特定された薬剤を動物モデルで使用して、そのような薬剤の作用メカニズムを決定することができる。さらに、本発明は、本明細書に記載の治療のための上記スクリーニングアッセイにより特定された新規薬剤の使用に関する。

【0154】

IV. 対象

一実施形態では、減少したCDH1レベルを有する癌細胞の生存率または増殖を減少させる薬剤が投与される対象（例えば、1) RHOAドミナントネガティブポリペプチドをコードする核酸またはその生物学的に活性な断片および2) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片からなる群から選択される少なくとも1つの薬剤）、または減少したCDH1レベルを有する癌を治療するための薬剤の有効性の

予測可能性がある対象は、哺乳動物（例えばマウス、ラット、霊長類、非ヒト哺乳動物、イヌ、ネコ、ウシ、ウマなどの家畜）であり、および好ましくはヒトである。別の実施形態では、対象は癌の動物モデルである。例えば、動物モデルは、ヒト由来の癌の同所性異種移植動物モデルであり得る。

【0155】

本発明の方法の別の実施形態では、対象は、化学療法、放射線療法、標的療法、および／または免疫療法などの治療を受けていない。さらに別の実施形態では、対象は、化学療法、放射線療法、標的療法、および／または免疫療法などの治療を受けている。

【0156】

特定の実施形態では、対象は、癌性または前癌性組織を除去する手術を受けている。他の実施形態では、癌性組織は除去されていず、例えば、癌性組織は、生命に不可欠な組織、または外科的処置が患者にかなりの危害を及ぼす可能性のある領域など、身体の手術不能領域に位置し得る。

【0157】

V. 治療方法

本発明は、減少したCDH1レベルを有する癌のリスクがある（または癌にかかりやすい）対象を治療する予防的および治療的方法の両方を提供する。いくつかの実施形態では、癌はCDH1発現の喪失、例えばCDH1-null癌を有する。いくつかの実施形態では、癌は、上皮間葉転換（EMT）を起こしつつあるか、既に起こしている。特定の実施形態では、癌はびまん性胃癌（DGC）または乳小葉癌である。

【0158】

1. 予防方法

一態様では、本発明は、1) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片をコードする核酸、および2) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片、からなる群から選択される少なくとも1つの薬剤の治療有効量を対象に投与することによる、減少したCDH1レベルを有する癌に罹患した対象を予防する方法を提供する。予防薬の投与は、癌を予防するか、あるいは癌の進行を遅らせるように、減少したCDH1レベルを有する癌に特徴的な症状が現れる前に行うことができる。

【0159】

2. 治療法

本発明の別の態様は、1) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片をコードする核酸、および2) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片、からなる群から選択される少なくとも1つの薬剤の治療有効量を対象に投与することによる、減少したCDH1レベルを有する癌に罹患した対象を治療する方法に関する。

【0160】

本発明の調節方法は、減少したCDH1レベルを有する癌細胞を、1) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片をコードする核酸、および2) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片、からなる群から選択される少なくとも1つの薬剤と接触させることを含む。

【0161】

これらの調節方法は、インビトロで（例えば、細胞を薬剤と接触させることにより）、あるいは、薬剤をインビボで細胞と接触させることにより（例えば、薬剤を対象に投与することにより）実施することができる。一実施形態では、本方法は、薬剤（例えば、本明細書に記載の薬剤、または本明細書に記載のスクリーニングアッセイにより特定された薬剤）、または1) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片をコードする核酸、および2) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片、からなる群から選択される薬剤の組み合わせを投与することを含む。

【0162】

さらに、これらの調節薬は、例えば、化学療法剤、ホルモン、抗血管新生剤、放射性標識、化合物との、または手術、凍結療法、および／または放射線療法との併用療法で投与することもできる。前述の治療方法は、他の形態の従来の治療（例えば、当業者に周知の癌の標準治療）と併用して、従来の治療の前後に連続して投与することができる。例えば、これらの調節薬は、治療有効量の化学療法剤とともに投与することができる。別の実施形態では、これらの調節薬は化学療法と併用して投与され、化学療法剤の活性および有効性を高める。Physicians' Desk Reference (PDR) は、様々な癌の治療に使用されてきた化学療法薬の投与量を開示している。治療的に有効なこれらの前述の化学療法薬のレジメンおよび投与量は、治療される特定の癌、疾患の程度、および当業者に周知である他の要因に依存し、医師によって決定され得る。

10

【0163】

「標的療法」という用語は、選択された生体分子と選択的に相互作用し、それによって癌を治療する薬剤の投与を指す。例えば、免疫チェックポイント阻害剤の阻害に関する標的療法は、本発明の方法と組み合わせて有用である。「免疫チェックポイント阻害剤」という用語は、抗腫瘍免疫応答を下方調節または阻害することにより免疫応答を微調整するCD4+および／またはCD8+T細胞の細胞表面上の分子群を意味する。免疫チェックポイントタンパク質は当技術分野で周知であり、CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、2B4、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIRファミリー受容体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、BTLA、SIRPalpha (CD47)、CD48、2B4 (CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、およびA2aR（例えば、WO2012/177624を参照）が含まれるがこれらに限定されない。1つ以上の免疫チェックポイント阻害剤の阻害は、阻害性シグナル伝達をブロックまたは中和して、免疫応答をアップレギュレートし、癌をより効果的に治療することができる。

20

【0164】

免疫療法は、例えば、癌ワクチンおよび／または感作抗原提示細胞の使用を含み得る標的療法の1つの形態である。例えば、腫瘍溶解性ウイルスは、正常な細胞を傷つけずに癌細胞に感染して溶解することができるウイルスであり、癌治療に有用な可能性がある。腫瘍溶解性ウイルスの複製は、腫瘍細胞の破壊を容易にするとともに、腫瘍部位での用量増幅を引き起こす。それらはまた、抗癌遺伝子のベクターとしても機能し、腫瘍部位に特異的に送達され得る。免疫療法は、癌抗原または疾患抗原に対する事前形成された抗体の投与によって達成される、宿主の短期保護のための受動免疫を含むことができる（例えば、腫瘍抗原に対する、化学療法剤または毒素に任意に連結されたモノクローナル抗体の投与）。例えば、抗VEGFおよびmTOR阻害剤は腎細胞癌の治療に有効であることが知られている。免疫療法は、癌細胞株の細胞傷害性リンパ球認識エピトープの使用にも焦点を当てることができる。あるいは、アンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム、RNA干渉分子、三重らせんポリヌクレオチドなどを使用して、腫瘍または癌の開始、進行、および／または病理に関連する生体分子を選択的に調節することができる。

30

40

【0165】

「非標的療法」という用語は、選択された生体分子と選択的に相互作用しないが、癌を治療する薬剤の投与を指す。非標的療法の代表例には、化学療法、遺伝子療法、および放射線療法が含まれるが、これらに限定されない。

【0166】

一実施形態では、化学療法が使用される。化学療法には、化学療法剤の投与が含まれる。そのような化学療法剤は、以下の化合物群から選択されるものであり得るが、これらに限定されない：白金化合物、細胞傷害性抗生物質、代謝拮抗剤、抗有糸分裂剤、アルキル化剤、ヒ素化合物、DNAトポイソメラーゼ阻害剤、タキサン、ヌクレオシド類似体、植物アルカロイド、および毒素、ならびにそれらの合成誘導体。例示的な化合物には、アル

50

キル化剤：シスプラチン、トレオフルファン、およびトロホスファミド、植物アルカロイド：ビンブラスチン、パクリタキセル、ドセタキソール、DNAトポイソメラーゼ阻害剤：テニポシド、クリスナトール、およびマイトマイシン、葉酸拮抗剤：メトトレキサート、ミコフェノール酸、およびヒドロキシ尿素、ピリミジン類似体：5-フルオロウラシル、ドキシフルリジン、およびシトシンアラビノシド、プリン類似体：メルカプトプリンおよびチオグアニン、DNA代謝拮抗剤：2'-デオキシ-5-フルオロウリジン、アフィジコリングリシナート、およびピラゾロイミダゾール、ならびに抗有糸分裂剤：ハリコンドリン、コルヒチン、およびリゾキシシン、が含まれるが、これらに限定されない。1つ以上の化学療法剤を含む組成物（例えば、FLAG、CHOP）も使用され得る。FLAGは、フルダラビン、シトシンアラビノシド（Ara-C）、およびG-CSFを含む。CHOPは、シクロホスファミド、ビンクリスチン、ドキソルビシン、およびプレドニゾンを含む。別の実施形態では、PARP（例えば、PARP-1および/またはPARP-2）阻害剤が使用され、そのような阻害剤は当技術分野で周知である（例えば、オラパリブ、ABT-888、BSI-201、BGP-15（N-Gene Research Laboratories, Inc.）、INO-1001（Inotek Pharmaceuticals Inc.）、PJ34（Soriano et al. (2001) Circ. Res. 89 (8) : 684-91; Pachter et al. (2002) Br. J. Pharmacol. 135 (6) : 1347-1350）、3-アミノベンズアミド（Trevigen）、4-アミノ-1, 8-ナフタルイミド（Trevigen）、6（5H）-フェナントリジノン（Trevigen）、ベンズアミド（米国特許再発行（U. S. Pat. Re.）第36, 397号）、およびNU1025（Bowman et al. (2001) Br. J. Cancer 84 (1) : 106-12）。作用メカニズムは、一般に、PARP阻害剤がPARPに結合してその活性を低下させる能力に関連している。PARPは、 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD⁺）のニコチンアミドおよびポリADPリボース（PAR）への変換を触媒する。ポリ（ADPリボース）とPARPの両方は、転写、細胞増殖、ゲノム安定性、発癌の調節にリンクされている（Bouchard V. J. et al. Experimental Hematology, Volume 31, Number 6, June 2003, pp. 446-454 (9)、Herceg Z.; Wang Z.-Q. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Volume 477, Number 1, 2 Jun. 2001, pp. 97-110 (14)）ポリ（ADP-リボース）ポリメラーゼ1（PARP1）は、DNA一本鎖切断（SSB）の修復における重要な分子である（de Murcia et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94 : 7303-7307、Schreiber et al. (2006) Nat Rev Mol Cell Biol 7 : 517-528、Wang et al. (1997) Genes Dev 11 : 2347-2358）。PARP1機能の阻害によるSSB修復のノックアウトは、DNA二重鎖切断（DSB）を誘発し、相同性指向のDSB修復に欠陥がある癌細胞で合成致死を引き起こす可能性がある（Bryant et al. (2005) Nature 434 : 913-917、Farmer et al. (2005) Nature 434 : 917-921）。化学療法剤の前述の例は例示であり、限定することを意図していない。

【0167】

別の実施形態では、放射線療法が使用される。放射線療法で使用される放射線は電離放射線である。放射線療法は、ガンマ線、X線、陽子線でもある。放射線療法の例には、体外照射療法、放射性同位体（I-125、パラジウム、イリジウム）の組織内移植、ストロンチウム89などの放射性同位体、胸部放射線療法、腹腔内P-32放射線療法および/または全腹部および骨盤の放射線療法が含まれるが、これらに限定されない。放射線療法の一般的な概要については、Hellman, Chapter 16 : Principles of Cancer Management : Radiation Thera

py, 6th edition, 2001, DeVita et al., eds., J. B. Lippencott Company, Philadelphia. を参照されたい。放射線療法は、放射線が遠隔ソースから向けられる体外照射療法または遠隔療法として施与することができる。放射線治療は、放射線源を癌細胞または腫瘍塊の近くの体内に配置する内科療法または密封小線源治療としても実施できる。また、ヘマトポルフィリンおよびその誘導体、ベルトポルフィン (Vertoporphin) (BPD-MA)、フタロシアニン、光感受性物質 Pc 4、デメトキシヒポクレリン A (demethoxy-hypocrelin A) および 2BA-2-DMHA などの光感受性物質の投与を含む光線力学療法の使用も含まれる。

【0168】

別の実施形態では、ホルモン療法が使用される。ホルモン治療的処置は、例えば、ホルモンアゴニスト、ホルモンアンタゴニスト (例えば、フルタミド、ビカルタミド、タモキシフェン、ラロキシフェン、酢酸ロイプロリド (LUPRON)、LH-RH アンタゴニスト)、ホルモン生合成およびプロセシングの阻害剤、およびステロイド (例えば、デキサメタゾンレチノイド、デルトイド (deltoid)、ベタメタゾン、コルチゾル、コルチゾン、プレドニゾン、デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、ミネラルコルチコイド、エストロゲン、テストステロン、プロゲステロン)、ビタミン A 誘導体 (例えば、全トランス型レチノイン酸 (ATRA))、ビタミン D 3 類似体、抗ゲスターゲン (例、ミフェプリストン、オナプリストン)、または抗アンドロゲン (例えば、酢酸シプロテロン) を含む得る。

【0169】

別の実施形態では、体の組織が高温 (106 °F まで) にさらされる手順である温熱療法が使用される。熱は、細胞に損傷を与えたり、細胞から生きるために必要な物質を奪ったりすることにより、腫瘍を縮小するのに役立つ。温熱療法は、外部および内部加熱デバイスを使用した局所、領域、全身温熱療法である。温熱療法は、ほとんどの場合、その効果の増強しようとするため他の治療法 (放射線療法、化学療法、生物学的療法など) と一緒に使用される。局所温熱療法とは、腫瘍などの非常に小さな領域に加えられる熱のことである。体外のデバイスから腫瘍に向けられた高周波で、その領域を外部から加熱してよい。内部加熱を実現するには、いくつかのタイプの滅菌プローブのうちの 1 つが使用でき、細い加熱線または温水で満たされた中空管、埋め込みマイクロ波アンテナ、および高周波電極が含まれる。領域温熱療法では、臓器または四肢が加熱される。高エネルギーを生成する磁石とデバイスは、加熱される領域の上に配置される。灌流と呼ばれる別のアプローチでは、患者の血液の一部が取り出され、加熱され、内部で加熱される領域にポンプで送られる (灌流される)。全身加熱は、全身に広がった転移癌の治療に使用される。それは、温水毛布、ホットワックス、誘導コイル (電気ブランケットのようなもの)、または熱室 (大型インキュベーターと同様) を使用して実現できる。温熱療法は、放射線の副作用や合併症の顕著な増加を引き起こさない。しかし、皮膚に直接熱を加えると、治療を受けた患者の約半数に不快感が生じたり、局所的な痛みが生じることがある。また、一般に急速に治癒する水疱を引き起こす可能性がある。

【0170】

さらに別の実施形態では、光線力学療法 (PDT、光線照射療法、光線療法、または光化学療法とも呼ばれる) は、いくつかのタイプの癌の治療に使用される。それは、単細胞生物が特定の種類の光にさらされる場合、光感作薬として知られる特定の化学物質がこの生物を死滅させることができるという発見に基づいている。PDT は、固定周波数のレーザー光を光感作薬と組み合わせて使用することにより、癌細胞を破壊する。PDT では、光感作薬が血流に注入され、全身の細胞に吸収される。この薬剤は、正常細胞よりも長い時間癌細胞にとどまる。治療された癌細胞がレーザー光にさらされると、光感作薬は光を吸収し、処理された癌細胞を破壊する活性酸素を生成する。ほとんどの光感作薬が健康な細胞を離れたが、癌細胞にまだ存在しているときに起こるように、光の照射は慎重に時間を計る必要がある。PDT で使用されるレーザー光は、光ファイバー (非常に細いガラス

ストランド)を介して導くことができる。光ファイバーは、適切な量の光を送達するために癌の近くに配置される。光ファイバーは、肺癌の治療のために気管支鏡を介して肺に向けられ、食道癌の治療のために内視鏡を介して食道に向けられる。PDTの利点は、健康な組織への損傷を最小限に抑えることである。しかし、現在使用中のレーザー光は約3センチメートル以上の組織(1と1/8インチを少し超える)を通過できないため、PDTは主に、皮膚またはそのすぐ下または臓器の上皮の腫瘍の治療に使用される。光線力学療法は、治療後6週間以上、皮膚と目が光に敏感になる。患者は、直射日光と明るい屋内照明を少なくとも6週間避けることが勧められる。患者が屋外に出なければならない場合、サングラスを含む保護服を着用する必要がある。PDTの他の一時的な副作用は、特定の領域の治療に関連しており、咳、嚥下障害、腹痛、痛みを伴う呼吸または息切れが含まれ得る。1995年12月、米国食品医薬品局(FDA)は、閉塞を引き起こしている食道癌の症状を軽減し、レーザーだけでは十分に治療できない食道癌の症状を軽減するために、ポルフィマーナトリウムまたはPhotofrin(登録商標)と呼ばれる光感作薬を承認した。1998年1月、FDAは、肺癌の通常の治療が適切ではない患者の早期非小細胞肺癌の治療のためにポルフィマーナトリウムを承認した。国立癌研究所およびその他の機関は、膀胱、脳、喉頭、口腔の癌を含むいくつかの種類の癌に対する光線力学療法の使用を評価するための臨床試験(調査研究)を支援している。

【0171】

さらに別の実施形態では、高強度の光を利用して癌細胞を破壊するためにレーザー療法が使用される。この技術は、特に他の治療では癌を治療できない場合に、出血や閉塞などの癌の症状を軽減するためによく使用される。また、腫瘍を縮小または破壊することにより、癌を治療するために使用され得る。「レーザー」という用語は、誘導放出による光増幅を表す。電球などの通常の光は、多くの波長を持ち、あらゆる方向に広がる。一方、レーザー光は特定の波長を持ち、狭いビームに集束される。このタイプの高輝度ライトには、多くのエネルギーが含まれている。レーザーは非常に強力で、スチールを切断したり、ダイヤモンドを成形したりするために使用できる。レーザーは、眼の損傷した網膜の修復や組織の切断(メスの代わりに)など、非常に正確な外科手術にも使用できる。レーザーにはいくつかの異なる種類があるが、医学で広く使用されているのは3種類のみである。二酸化炭素(CO₂)レーザー—このタイプのレーザーは、より深い層に浸透することなく、皮膚の表面から薄い層を除去できる。この技術は、皮膚や特定の癌状態に深く広がっていない腫瘍の治療に特に有用である。従来のメス手術の代替として、CO₂レーザーは皮膚を切断することもできる。このように皮膚癌を除去するのに、レーザーが使用される。ネオジウム：イットリウム—アルミニウム—ガーネット(Nd：YAG)レーザー—このレーザーからの光は、他のタイプのレーザーからの光よりも組織に深く浸透し、血液が急速に凝固する可能性がある。光ファイバーを介して身体のアksesしにくい部分に運ぶことができる。このタイプのレーザーは、喉の癌の治療に時々使用される。アルゴンレーザー—このレーザーは組織の表層のみを通過できるため、皮膚科や眼科手術に役立つ。また、光線力学療法(PDT)として知られる手順で腫瘍を治療するために、感光性色素とともに使用される。レーザーには、次のような標準的な外科用ツールに勝るいくつかの利点がある：レーザーはメスよりも正確である。周囲の皮膚または他の組織との接触がほとんどないため、切開の近くの組織は保護される。レーザーが発生する熱は手術部位を滅菌し、感染のリスクを減少させる。レーザーの精度が小さい切開を可能にするため、より短い手術時間が必要になり得る。レーザーは血管を熱で密封するので、出血、腫れ、または瘢痕が少ないため、治療時間は、多くの場合、短縮される。レーザー手術はそれほど複雑ではない。例えば、光ファイバーを使用すると、大きく切開することなくレーザー光を体の一部に向けることができる。より多くの手順が外来患者ベースで行われる場合がある。レーザーは、癌を治療するために2つの方法で使用できる。熱で腫瘍を縮小または破壊することによる方法、または癌細胞を破壊する化学物質(光感作薬として知られる)を活性化することによる方法である。PDTでは、光感作薬は癌細胞に保持され、光によって刺激されて癌細胞を死滅させる反応を引き起こすことができる。CO₂およびNd：YAG

10

20

30

40

50

レーザーは、腫瘍を縮小または破壊するために使用される。それらは内視鏡、医師が膀胱などの体の特定の領域を見ることができる管と一緒に使用できる。一部のレーザーからの光は、光ファイバーを備えた柔軟な内視鏡を介して伝達できる。これにより、医師は手術以外の方法では到達できなかった身体の部分を見て作業することができるため、レーザービームの非常に正確な照準が可能になる。レーザーは低倍率の顕微鏡でも使用でき、医者は治療中の部位をはっきりと見ることができる。レーザーシステムは、他の機器と併用すると、直径200ミクロンの非常に細い糸の幅よりも小さい切断領域を生成できる。レーザーは、多くの種類の癌の治療に使用される。レーザー手術は、声門（声帯）、子宮頸部、皮膚、肺、膣、外陰部、陰茎癌の特定の段階の標準治療である。癌を破壊するために使用することに加えて、レーザー手術は、癌によって引き起こされる症状を軽減するためにも使用される（緩和ケア）。例えば、レーザーを使用して、患者の気管（気管）を塞いでいる腫瘍を縮小または破壊し、呼吸しやすくすることができる。また、大腸癌および肛門癌の緩和に使用されることもある。レーザー誘起間質温熱療法（Laser-induced interstitial thermotherapy）（LITT）は、レーザー療法の最新の開発の1つである。LITTは、温熱療法と呼ばれる癌治療と同じ考え方を使用しており、その熱は、細胞に損傷を与えたり、生きるために必要な物質を奪ったりすることにより、腫瘍を縮小するのに役立つ。この治療では、レーザーは体内の間質性領域（臓器間の領域）に向けられる。その後、レーザー光は腫瘍の温度を上昇させ、癌細胞を損傷または破壊する。

10

【0172】

20

本明細書に記載の調節薬を用いた治療の期間および／または用量は、特定のモジュレーターまたはその組み合わせに応じて変化し得る。特定の癌治療薬の適切な治療時間は、当業者には理解されるであろう。本発明は、各癌治療薬の最適な治療スケジュールの継続的な評価を企図し、本発明の方法により決定される対象の癌の表現型が最適な治療用量およびスケジュールを決定する際の要因である。

【0173】

VI. 臨床効果

臨床的有効性は、当該分野で既知の任意の方法によって測定され得る。例えば、癌療法（例えば、1）RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片をコードする核酸、および2）RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片からなる群から選択される少なくとも1つの薬剤）に対する応答は、療法に対する癌、例えば腫瘍、の任意の応答、好ましくはネオアジュバントまたはアジュバント化学療法の開始後の腫瘍の質量および／または体積の変化に関係している。腫瘍応答は、ネオアジュバントまたはアジュバント状況で評価することができ、全身治療介入後の腫瘍のサイズをCT、PET、マンモグラム、超音波または触診によって測定される初期サイズおよび寸法と比較することができ、腫瘍の細胞充実性は組織学的に推定でき、治療開始前に採取した腫瘍生検の細胞充実性と比較することができる。生検または外科的切除後の腫瘍のキャリパー測定または病理学的検査によって、応答を評価することもできる。腫瘍体積や細胞充実性の変化率などの定量的な方法で、または半定量的スコアリングシステム、例えば残存癌負荷量（Symmans et al. (2007) J. Clin. Oncol. 25:4414-4422）を使用して、または「病理学的完全奏効」（pCR）、「臨床的完全寛解」（cCR）、「臨床的部分寛解」（cPR）、「臨床的安定疾患」（cSD）、「臨床進行性疾患」（cPD）もしくはその他の定性的基準などの定性的な方法におけるミラーペイネスコア（Miller-Payne score）（Ogston et al. (2003) Breast (Edinburgh, Scotland) 12:320-327）を使用して、応答を記録することができる。腫瘍応答の評価は、ネオアジュバント療法またはアジュバント療法の開始後早期に、例えば、数時間後、数日後、数週間後、または好ましくは数ヶ月後に実施され得る。応答評価の典型的なエンドポイントは、ネオアジュバント化学療法の終了時、または残存腫瘍細胞および／または腫瘍床の外科的除去時である。

30

40

50

【0174】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の治療的処置の臨床的有効性は、臨床的有益率 (clinical benefit rate) (CBR) を測定することにより決定され得る。臨床的有益率は、治療の終了から少なくとも6ヵ月後の時点で、完全寛解状態にある患者 (CR)、部分寛解状態にある患者数 (PR)、および安定疾患にある患者数 (SD) の割合の合計を決定することにより測定される。この式の記号は、6ヵ月間の $CBR = CR + PR + SD$ である。いくつかの実施形態では、表1、2、および/または3の治療レジメンに列挙されたバイオマーカーの特定のモジュレーターの CBR は、少なくとも25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、またはそれ以上である。

10

【0175】

癌治療 (例えば、1) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片をコードする核酸、および2) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片からなる群から選択される少なくとも1つの薬剤) に対する応答を評価するための追加の基準は、「生存」に関連し、これには以下のすべてが含まれる: 全生存としても知られる、死亡までの生存 (原因に関係ないかまたは腫瘍に関連するかのいずれかであってよい)、「無再発生存」 (再発という用語には、局在再発と遠隔再発の両方が含まれる)、転移のない生存、無疾患生存 (疾患という用語には、癌およびそれに関連する疾患が含まれる)。前記生存の長さは、定義された開始点 (例えば、診断の時間または治療の開始) および終了点 (例えば、死、再発または転移) を参照することにより計算され得る。さらに、治療の有効性の基準は、化学療法への応答、生存の可能性、所定の期間内の転移の可能性、および腫瘍の再発の可能性を含むように拡大することができる。

20

【0176】

例えば、適切な閾値を決定するために、本発明に包含される特定の薬剤を対象の集団に投与することができ、結果は、癌治療 (例えば、1) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片をコードする核酸、および2) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片からなる群から選択される少なくとも1つの薬剤) の投与前に決定されたバイオマーカー測定値と相関させることができる。結果計測は、ネオアジュバント設定行われた療法に対する病理学的奏効であり得る。あるいは、全生存期間や無疾患生存期間などの結果尺度は、バイオマーカーの測定値がわかっている癌治療 (例えば、1) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片をコードする核酸、および2) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片からなる群から選択される少なくとも1つの薬剤) 後の対象について、一定期間監視することができる。特定の実施形態では、同じ用量の薬剤が各対象に投与される。関連する実施形態では、投与される用量は、薬剤について当該技術分野で既知の標準用量である。対象を監視する期間は様々である。例えば、少なくとも2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55、または60ヵ月間、対象を監視できる。癌治療 (例えば、1) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片をコードする核酸、および2) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片からなる群から選択される少なくとも1つの薬剤) の結果に相関するバイオマーカー測定閾値は、実施例セクションに記載されているような方法を使用して決定することができる。

30

40

【0177】

VII. 医薬組成物

別の態様において、本発明は、1つ以上の薬学的に許容される担体 (添加剤) および/または希釈剤および/または追加の有効成分とともに製剤化される、1) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片をコードする核酸、および2) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片からな

50

る群から選択される少なくとも1つの薬剤の治療有効量、を含む薬学的に許容される組成物を提供する。以下に詳細に説明するように、本発明の薬学的組成物は、以下に適合したものを含む固体または液体形態で投与するために特別に製剤化することができる：(1)経口投与、例えば、水薬（水性または非水性の溶液または懸濁液）、錠剤、ボラス、粉末、顆粒、ペースト、(2)非経口投与、例えば、無菌溶液または懸濁液などの皮下、筋肉内または静脈内注射による、(3)局所塗布、例えば、皮膚に塗布するクリーム、軟膏またはスプレー、(4)腔内または直腸内、例えばベッサリー、クリームまたはフォームとして、または(5)エアゾール、例えば、水性エアゾール、リボソーム製剤、または化合物を含む固体粒子として。

【0178】

本明細書で使用される「治療有効量」という語句は、1) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片をコードする核酸、および2) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片からなる群から選択される薬剤の量、または1) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片をコードする核酸、および2) RHOAドミナントネガティブポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片からなる群から選択される薬剤を含む組成物の量であって、ある程度望ましい治療効果、例えば、合理的な利益／リスク比で、癌中の生存細胞または増殖細胞の数を減少させる、および／または癌細胞を含む腫瘍の体積またはサイズを減少させる、効果を生み出すのに有効である、薬剤または組成物の量を意味する。

【0179】

「薬学的に許容される」という語句は、健全な医学的判断の範囲内で、合理的な利益／リスク比に見合った、過度に毒性、刺激、アレルギー反応、またはその他の問題や合併症のない、ヒトおよび動物の組織と接触して使用するのに適する、これらの薬剤、材料、組成物、および／または剤形を指すために本明細書で使用される。

【0180】

本明細書で使用される「薬学的に許容される担体」という語句は、1つの臓器、もしくは身体の一部、から別の臓器、もしくは身体の一部への本発明の化学物質の運搬または輸送に参与する、液体または固体充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒またはカプセル化材料などの薬学的に許容される材料、組成物またはビヒクルを意味する、各担体は、製剤の他の成分と適合性があり、対象に有害でないという意味で「許容される」ものでなければならない。薬学的に許容される担体として機能できる材料のいくつかの例には：(1)糖類、例えばラクトース、グルコースおよびスクロース、(2)デンプン類、例えばコーンスターチおよびジャガイモデンプン、(3)セルロース、およびその誘導体、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロースおよび酢酸セルロース、(4)トラガカント末、(5)麦芽、(6)ゼラチン、(7)タルク、(8)賦形剤、例えばカカオバターおよび坐剤ワックス、(9)油類、例えば落花生油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油、および大豆油、(10)グリコール類、例えばプロピレングリコール、(11)ポリオール類、例えばグリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコール、(12)エステル類、例えばオレイン酸エチルおよびラウリン酸エチル、(13)寒天、(14)緩衝剤、例えば水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム(15)アルギン酸、(16)発熱物質を含まない水、(17)等張食塩水、(18)リンゲル液、(19)エチルアルコール、(20)リン酸緩衝液、および(21)薬学的製剤に使用される他の非毒性適合物質、が含まれる。

【0181】

「薬学的に許容される塩」という用語は、本発明に包含される薬剤の比較的非毒性の無機および有機酸付加塩を指す。これらの塩は、治療薬の最終的な単離および精製中にインサイチュで、またはその遊離塩基形態の精製治療薬を適切な有機酸または無機酸と別々に反応させ、形成された塩を単離することにより調製できる。代表的な塩には、臭化水素酸塩、塩酸塩、硫酸塩、硫酸水素塩、リン酸塩、硝酸塩、酢酸塩、吉草酸塩、オレイン酸塩、パルミチン酸塩、ステアリン酸塩、ラウリン酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、リン酸塩、ト

10

20

30

40

50

シル酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、ナフチル酸塩、メシル酸塩、グルコヘプトン酸塩、ラクトビオン酸塩、およびラウリルスルホン酸塩などが含まれる（例えば、Berge et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19を参照されたい）。

【0182】

他の事例では、本発明の方法に有用な薬剤は、1つ以上の酸性官能基を含んでもよく、したがって、薬学的に許容される塩基と薬学的に許容される塩を形成することができる。これらの場合の「薬学的に許容される塩」という用語は、本発明に包含される薬剤の比較的非毒性の無機および有機塩基付加塩を指す。同様に、これらの塩は、治療薬の最終単離および精製中にインサイチュで、またはその遊離酸形態の精製治療薬を、薬学的に許容される金属カチオンの水酸化物、炭酸塩もしくは重炭酸塩などの適切な塩基と、アンモニアと、または薬学的に許容される有機一級、二級、もしくは三級アミンと、別々に反応させることにより調製できる。代表的なアルカリまたはアルカリ土類塩には、リチウム、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、およびアルミニウム塩などが含まれる。塩基付加塩の形成に有用な代表的な有機アミンには、エチルアミン、ジエチルアミン、エチレンジアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、ピペラジンなどが含まれる（例えば、上記のBerge et al. を参照）。

【0183】

湿潤剤、乳化剤および滑沢剤、例えばラウリル硫酸ナトリウムおよびステアリン酸マグネシウム、ならびに着色剤、放出剤（release agent）、コーティング剤、甘味料、香味料および芳香剤、保存剤および抗酸化剤もまた、組成物中に存在し得る。

【0184】

薬学的に許容される抗酸化剤の例には：（1）水溶性抗酸化剤、例えばアスコルビン酸、塩酸システイン、硫酸水素ナトリウム、メタ亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど、（2）油溶性抗酸化剤、例えばパルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール（BHA）、ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）、レシチン、没食子酸プロピル、 α -トコフェロールなど、および（3）金属キレート剤、例えばクエン酸、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ソルビトール、酒石酸、リン酸など、が含まれる。

【0185】

本発明の方法において有用な製剤には、経口、経鼻、局所（頬側および舌下を含む）、直腸、膣、エアロゾルおよび／または非経口投与に適した製剤が含まれる。製剤は、単位投与形態で都合良く提供されてもよく、薬学の分野で周知の任意の方法によって調製されてもよい。単回投与形態を生成するために担体材料と組み合わせることができる有効成分の量は、治療される宿主、特定の投与様式に応じて変化する。単回投与形態を生成するために担体材料と組み合わせることができる有効成分の量は、一般に、治療効果を生成する化合物の量になる。一般に、100パーセントのうち、この量は、有効成分の約1パーセント～約99パーセント、好ましくは約5パーセント～約70パーセント、最も好ましくは約10パーセント～約30パーセントの範囲である。

【0186】

これらの製剤または組成物を調製する方法は、本発明に包含される薬剤を、担体および任意で1つまたは複数の副成分と会合させるステップを含む。一般に、製剤は、治療薬を液体担体、または微粉化した固体担体、またはその両方と均一かつ密接に会合させ、次いで必要に応じて製品を成形することにより調製される。

【0187】

経口投与に適した製剤は、カプセル剤、カシェ剤、丸剤、錠剤、ロゼンジ（フレーバーベースを使用、通常スクロースおよびアカシアまたはトラガカントを使用）、粉末、顆粒の形態で、または水性または非水性液体の溶液または懸濁液として、または水中油型または油中水型液体エマルジョンとして、またはエリキシル剤またはシロップ剤として、またはトローチ剤（ゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアカシアなどの不活性基剤を使用）としておよび／または口腔洗浄剤などとして、それぞれが有効成分として

所定量の治療薬を含んで、あってよい。化合物は、ボーラス、舐剤またはペーストとして投与することもできる。

【0188】

経口投与用の固体投与形態（カプセル、錠剤、丸薬、糖衣錠、粉末、顆粒など）では、有効成分は、1つ以上の薬学的に許容される担体、例えばクエン酸ナトリウムまたはリン酸二カルシウム、および／または以下のいずれか、（1）充填剤または増量剤、例えばデンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、および／またはケイ酸、（2）結合剤、例えば、例としてカルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロースおよび／またはアカシア、（3）保湿剤、例えばグリセロール、（4）崩壊剤、例えば寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモまたはタピオカデンプン、アルギン酸、特定のケイ酸塩、および炭酸ナトリウム、（5）溶解妨害剤（solution retarding agent）、例えばパラフィン、（6）吸収促進剤、例えば四級アンモニウム化合物、（7）湿潤剤、例えば、例としてセチルアルコールおよびモノステアリン酸グリセロール、（8）吸着剤、例えばカオリンおよびベントナイト粘土、（9）滑沢剤、例えばタルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、およびそれらの混合物、および（10）着色剤、と混合する。カプセル、錠剤および丸薬の場合、薬学的組成物は緩衝剤も含み得る。同様のタイプの固体組成物はまた、ラクトースまたは乳糖、ならびに高分子量ポリエチレングリコールなどのような賦形剤を使用して、軟および硬充填ゼラチンカプセルの充填剤として使用されてもよい。

10

20

【0189】

錠剤は、任意に1つ以上の副成分とともに、圧縮または成形することにより作成できる。圧縮錠剤は、結合剤（例えば、ゼラチンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース）、滑沢剤、不活性希釈剤、保存剤、崩壊剤（例えば、デンプングリコール酸ナトリウムまたは架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム）、表面活性剤または分散剤を使用して調製できる。成形錠剤は、不活性液体希釈剤で湿らせた粉末ペプチドまたはペプチド模倣薬の混合物を適切な機械で成形することにより作製することができる。

【0190】

錠剤、および糖衣錠、カプセル、丸薬および顆粒などの他の固体投与形態は、任意に刻み目を付けるかまたは腸溶性コーティングおよび薬学的製剤技術分野で周知の他のコーティングなどのコーティングおよびシェルで調製することができる。それらはまた、例えば、所望の放出プロファイルを提供するために様々な割合でヒドロキシプロピルメチルセルロース、他のポリマーマトリックス、リポソームおよび／またはミクロスフェアを使用して、その中の有効成分の徐放または制御放出を提供するように製剤化され得る。それらは、例えば、細菌保持フィルターによるろ過により、または使用直前に滅菌水、または他の滅菌注射媒体に溶解できる滅菌固体組成物の形態の滅菌剤を組み込むことにより滅菌することができる。これらの組成物はまた、任意に不透明剤（opacifying agent）を含有していてもよく、任意選択的に遅延様式で、胃腸管の特定の部分でのみ、または優先的に、有効成分（複数可）を放出する組成物であってもよい。使用できる包埋組成物の例には、ポリマー物質およびワックスが含まれる。有効成分は、適切な場合、上記の賦形剤の1つ以上を含むマイクロカプセル化形態であってもよい。

30

40

【0191】

経口投与用の液体投与形態には、薬学的に許容されるエマルジョン、マイクロエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップおよびエリキシル剤が含まれる。有効成分に加えて、液体投与形態は、例えば水もしくは他の溶媒、可溶化剤および乳化剤、例えばエチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1, 3-ブチレングリコール、油（特に綿実油、落花生油、トウモロコシ油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油、ゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコールおよびソルビタンの脂肪酸エステル、およびそれらの混合物など、当技術分野で一般的に使用される不活性希釈剤を含有して

50

いてもよい。

【0192】

不活性希釈剤に加えて、経口組成物は、湿潤剤、乳化剤および懸濁化剤、甘味料、香味料、着色料、芳香剤および保存剤などのアジュバントも含むことができる。

【0193】

懸濁液は、活性薬剤に加えて、例えば、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールおよびソルビタンエステル、微結晶性セルロース、メタ水酸化アルミニウム、ベントナイト、寒天およびトラガカント、およびそれらの混合物などの懸濁化剤を含んでもよい。

【0194】

直腸または腔投与用の製剤は、1つ以上の治療薬を、例えばココアバター、ポリエチレングリコール、坐薬ワックスまたはサリチル酸塩、を含む1つ以上の適切な非刺激性賦形剤または担体と混合することにより調製できる坐剤として提供することができ、およびこれらは室温では固体であるが、体温では液体であるため、直腸または腔で融解して活性薬剤を放出する。

【0195】

腔内投与に適した製剤には、適切であることが当技術分野で知られているような担体を含有するペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォームまたはスプレー製剤も含まれる。

【0196】

本発明に包含される薬剤の局所または経皮投与のための投与形態には、粉末、スプレー、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、溶液、パッチおよび吸入剤が含まれる。活性成分は、無菌条件下で、薬学的に許容される担体、および必要とされる可能性のある保存剤、緩衝液、または噴射剤と混合することができる。

【0197】

軟膏、ペースト、クリーム、およびゲルには、治療薬に加えて、動物性および植物性脂肪、油、ワックス、パラフィン、デンプン、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコン、ベントナイト、ケイ酸、タルクおよび酸化亜鉛、またはそれらの混合物などの賦形剤を含有してよい。

【0198】

粉末およびスプレーは、本発明に包含される薬剤に加えて、ラクトース、タルク、ケイ酸、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウムおよびポリアミド粉末、またはこれらの物質の混合物などの賦形剤を含有することができる。スプレーは、クロロフルオロ炭化水素などの通常の噴射剤、およびブタンやプロパンなどの揮発性非置換炭化水素を追加で含有することができる。

【0199】

本発明に包含される薬剤は、代わりにエアロゾルによって投与することができる。これは、化合物を含有する水性エアロゾル、リボソーム製剤または固体粒子を調製することにより達成される。非水性（例えば、フルオロカーボン噴射剤）懸濁液を使用できる。音波ネブライザーは、化合物の分解を引き起こす可能性がある薬剤のせん断への暴露を最小限に抑えるため、好ましい。

【0200】

通常、水性エアロゾルは、薬剤の水溶液または懸濁液を従来の薬学的に許容される担体および安定剤と一緒に製剤化することにより作成される。担体と安定剤は特定の化合物の要件によって異なるが、通常、非イオン性界面活性剤（Tween、Pluronic、またはポリエチレングリコール）、血清アルブミンなどの無害なタンパク質、ソルビタンエステル、オレイン酸、レシチン、およびグリシンなどのアミノ酸、緩衝液、塩、糖または糖アルコールが含まれる。エアロゾルは一般に等張液から調製される。

【0201】

経皮パッチは、身体への治療薬の制御された送達を提供するという追加の利点を有する

10

20

30

40

50

。そのような投与形態は、適切な媒体に薬剤を溶解または分散させることにより作成できる。吸収促進剤を使用して、皮膚を通るペプチド模倣薬の流れを増加させることもできる。そのような流れの速度は、速度制御膜を提供するか、またはペプチド模倣薬をポリマーマトリックスまたはゲルに分散させることにより制御することができる。

【0202】

眼科製剤、眼軟膏、粉末、溶液なども、本発明の範囲内にあると考えられる。

【0203】

非経口投与に適した本発明の薬学的組成物は、1つ以上の薬学的に許容される滅菌等張水性もしくは非水性溶液、分散液、懸濁液もしくはエマルジョン、または使用直前に滅菌注射液もしくは分散液に再構成できる滅菌粉末と組み合わせた1つ以上の治療薬を含み、これらは抗酸化剤、緩衝液、静菌剤、製剤を対象レシピエントの血液と等張にする溶質、または懸濁化剤または増粘剤を含有していてもよい。

10

【0204】

本発明の薬学的組成物に使用できる適切な水性および非水性担体の例には、水、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、およびそれらの適切な混合物、オリーブ油などの植物油、ならびにオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルなどが含まれる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用、分散液の場合は必要な粒子サイズの維持、および界面活性剤の使用により維持できる。

【0205】

これらの組成物は、保存剤、湿潤剤、乳化剤、および分散剤などのアジュバントを含んでもよい。微生物の活動の防止は、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸などの様々な抗菌剤および抗真菌剤を含めることによって確実にできる。糖類、塩化ナトリウムなどの等張剤を組成物に含めることも望ましくあり得る。さらに、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの吸収を遅延させる薬剤を含めることにより、注射可能な薬剤形態の長期吸収がもたらされ得る。

20

【0206】

場合によっては、薬物の効果を長引かせるために、皮下注射または筋肉内注射からの薬物の吸収を遅らせることが望ましい。これは、難水溶性である結晶性または非晶質の液体懸濁液を使用することにより実現できる。その場合、薬物の吸収速度は溶解速度に依存し、次いで溶解速度は結晶サイズと結晶形に依存する可能性がある。あるいは、非経口投与された薬物形態の遅延吸収は、薬物を油性ビヒクルに溶解または懸濁することにより達成される。

30

【0207】

注射可能なデポの形態は、ポリラクチド-ポリグリコリドなどの生分解性ポリマーに、本発明に包含される薬剤のマイクロカプセル化マトリックスを形成することにより作成される。薬物とポリマーの比率、および使用する特定のポリマーの性質に応じて、薬物放出の速度を制御できる。他の生分解性ポリマーの例には、ポリ（オルトエステル）およびポリ（無水物）が含まれる。デポ注射製剤は、体組織に適合するリポソームまたはマイクロエマルジョンに薬物を包括させることによっても調製される。

40

【0208】

本発明の治療薬を医薬としてヒトおよび動物に投与する場合、それらはそれ自体で、または例えば0.1～99.5%（より好ましくは0.5～90%）の有効成分を薬学的に許容される担体と組み合わせて含有する薬学的組成物として投与することができる。

【0209】

本発明の薬学的組成物中の有効成分の実際の投与レベルは、特定の対象、組成物および投与様式で、対象に対して毒性なく、所望の治療応答を達成するのに有効な量の有効成分を得るために、本発明の方法により決定され得る。

【0210】

本発明の核酸分子をベクターに挿入し、遺伝子治療ベクターとして使用することができ

50

る。遺伝子治療ベクターは、例えば、静脈内注射、局所投与（米国特許第5,328,470号を参照）または定位的注射（例えば、Chen et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91:3054-3057を参照）によって対象に送達することができる。遺伝子治療ベクターの薬学的製剤は、許容可能な希釈剤中に遺伝子治療ベクターを含めることができ、または遺伝子送達ビヒクルが埋め込まれた徐放性マトリックスを含むことができる。あるいは、組換え細胞から完全な遺伝子送達ベクター、例えばレトロウイルスベクターを無傷で産生できる場合、薬学的製剤は、遺伝子送達システムを産生する1つ以上の細胞を含むことができる。

【0211】

VIII. 薬剤の投与

「投与する」という用語は、薬剤がその意図された機能を実行できるようにする投与経路を含むことを意図している。使用できる投与経路の例には、注射（皮下、静脈内、非経口、腹腔内、くも膜下腔内）、経口、吸入、および経皮が含まれる。注射は、ボーラス注射でも連続注入でもよい。投与経路に応じて、選択された材料で薬剤をコーティングまたは配置して、意図した機能を実行する能力に悪影響を及ぼす可能性がある自然条件から保護することができる。薬剤は、単独で、または薬学的に許容される担体と組み合わせて投与されてもよい。薬剤はプロドラッグとして投与することもでき、これは生体内でその活性型に変換される。薬剤はまた、1つ以上の追加の治療薬と組み合わせて（例えば、その前、後、または同時に）投与されてもよい。

【0212】

個々の投与量は、主治医の判断における対象の要件、治療される状態の重症度、および使用される特定の化合物に応じて変化し得ることが理解されよう。治療上有効な量または用量を決定する際に、特定の治療薬の薬学的特性およびその投与方法と投与経路、治療の望ましい時間経過、哺乳動物の種、その大きさ、年齢、および全体的な健康、関係する特定の病気、疾患の程度または関与または重症度、個々の対象の応答、投与される特定の化合物、投与方法、投与された製剤の生物学的利用能特性、選択された用法、並行治療の種類およびその他の関連する状況、を含むがこれらに限定されない、多くの追加要因が担当医によって考慮されてもよい。

【0213】

治療は、化合物の有効用量よりも少ない投与量で開始することができる。その後、一実施形態では、状況下で最適な効果に達するまで、投与量を少しずつ増加させる必要がある。便宜上、1日の総投与量を分割し、必要に応じて1日の間に分割して一部ずつ投与することができる。

【0214】

一般に、治療を開始する前に対象から最初の試料を取得し、治療中に1つ以上の試料を取得することが好ましい。そのような使用において、治療前に障害のある対象からの細胞の発現のベースラインが決定され、次いで、障害のある対象からの細胞の発現のベースライン状態の変化が治療過程中に監視される。あるいは、治療中に得られた2つ以上の連続試料を、治療前のベースライン試料を必要とせずに使用できる。そのような使用では、対象から得られた最初の試料が、障害のある対象からの細胞の発現が増加しているか減少しているかを決定するためのベースラインとして使用される。

【0215】

ポリヌクレオチドを哺乳動物、ヒトまたは非ヒト、またはその細胞に導入するための任意の手段は、本発明の様々な構築物を意図するレシピエントに送達するための本発明の実施に適合させることができる。本発明の一実施形態では、DNA構築物は、トランスフェクションにより、すなわち「裸の」DNAの送達により、またはコロイド分散系との複合体で、細胞に送達される。コロイド系には、高分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ、および水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、リボソームなどの脂質ベースの系が含まれる。本発明の好ましいコロイド系は、脂質複合化またはリボソーム製剤化されたDNAである。前者のアプローチでは、脂質などのDNAの製剤化の前に、目

10

20

30

40

50

的のDNA構造を持つトランスジーンを含むプラスミドを最初に発現のため実験的に最適化することができる（例えば、5'非翻訳領域へのイントロンの包含と不必要な配列の除去（Felgner, et al., (1995) Ann NY Acad Sci 126-139））。次に、例えば様々な脂質またはリポソーム材料を用いたDNAの製剤化が、既知の方法および材料を使用して達成され、レシピエント哺乳動物に送達され得る。例えば、Canónico et al (1994) Am J Respir Cell Mol Biol 10:24-29、Tsan et al. (1995) Am J Physiol 268:L1052-L1056、Alton et al. (1993) Nat Genet. 5:135-142、および米国特許第5,679,647号を参照されたい。

10

【0216】

リポソームのターゲティングは、解剖学および機械的要因に基づいて分類できる。解剖学的分類は、選択性のレベル、例えば臓器特異性、細胞特異性、オルガネラ特異性に基づいている。機械的ターゲティングは、受動的か能動的かに基づいて区別できる。受動的ターゲティングでは、リポソームの自然な傾向を利用して、洞様毛細血管を含む器官の細網内皮系（RES）の細胞に分布する。一方、能動的ターゲティングには、リポソームをモノクローナル抗体、糖、糖脂質、タンパク質などの特定のリガンドに結合させることによるリポソームの変更、または自然発生する局在部位以外の臓器および細胞型へのターゲティングを達成するためにリポソームの組成またはサイズを変更することによるリポソームの変更、が含まれる。

20

【0217】

標的送達システムの表面は、様々な方法で修飾されてもよい。リポソーム標的送達システムの場合、脂質二重層と安定に会合するターゲティングリガンドを維持するために、脂質基をリポソームの脂質二重層に組み込むことができる。脂質鎖をターゲティングリガンドに結合するために、様々な連結基を使用できる。裸のDNAまたは送達媒体、例えばリポソームに関連するDNAを、対象のいくつかの部位に投与することができる（以下を参照されたい）。

【0218】

核酸は、任意のベクターで送達できる。これらには、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、プラスミドベクターなどの、ウイルスまたは非ウイルスベクターが含まれる。例示的な種類のウイルスには、HSV（単純ヘルペスウイルス）、AAV（アデノ随伴ウイルス）、HIV（ヒト免疫不全ウイルス）、BIV（ウシ免疫不全ウイルス）、およびMLV（マウス白血病ウイルス）が含まれる。核酸は、ウイルス粒子、リポソーム、ナノ粒子、ポリマー複合体など、十分に効率的な送達レベルを提供する任意の望ましい形式で投与できる。

30

【0219】

関心のあるタンパク質または核酸をコードする核酸は、プラスミドまたはウイルスベクター、または当技術分野で知られている他のベクター内にあり得る。そのようなベクターは周知であり、特定の用途に合わせて任意のものを選択できる。本発明の一実施形態では、遺伝子送達ビヒクルは、プロモーターおよびデメチラーゼコード配列を含む。好ましいプロモーターは、組織特異的プロモーターおよび細胞増殖により活性化されるプロモーター、例えばチミジンキナーゼおよびチミジル酸シンターゼプロモーターである。他の好ましいプロモーターには、 α -および β -インターフェロンプロモーターなどのウイルス感染により活性化可能なプロモーター、およびエストロゲンなどのホルモンにより活性化可能なプロモーターが含まれる。使用できる他のプロモーターには、モロニーウイルスLTR、CMVプロモーター、およびマウスアルブミンプロモーターが含まれる。プロモーターは構成的または誘導的であり得る。

40

【0220】

別の実施形態では、国際公開第90/11092号および米国特許第5,580,859号に記載されているように、裸のポリヌクレオチド分子が遺伝子送達ビヒクルとして使

50

用される。そのような遺伝子送達ビヒクルは、成長因子DNAまたはRNAのいずれかであり得、特定の実施形態では、死滅したアデノウイルスに連結される (Curie et al. (1992) Hum. Gene. Ther. 3:147-154)。任意に使用できる他のビヒクルには、DNA-リガンド (Wu et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:16985-16987)、脂質-DNAの組み合わせ (Felgner et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417)、リボソーム (Wang et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84:7851-7855) およびマイクロプロジェクタイル (Williams et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88:2726-2730) が含まれる。

10

【0221】

遺伝子送達ビヒクルは、ウイルス複製起点またはパッケージングシグナルなどのウイルス配列を任意選択的に含むことができる。これらのウイルス配列は、アストロウイルス、コロナウイルス、オルソミクソウイルス、パポバウイルス、パラミクソウイルス、パルボウイルス、ピコルナウイルス、ポックスウイルス、レトロウイルス、トガウイルスまたはアデノウイルスなどのウイルスから選択することができる。好ましい実施形態では、成長因子遺伝子送達ビヒクルは組換えレトロウイルスベクターである。組換えレトロウイルスおよびその様々な使用は、例えば、Mann et al. (1983) Cell 33:153、Cane and Mulligan (1984) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81:6349、Miller et al. (1990) Human Gene Therapy 1:5-14、米国特許第4,405,712号、第4,861,719号、および第4,980,289号、ならびにPCT出願WO89/02,468号、WO89/05,349号、およびWO90/02,806号を含む多くの参考文献に記載されている。本発明では、例えばEP0,415,731、WO90/07936、WO94/03622、WO93/25698、WO93/25234、米国特許第5,219,740号、WO9311230、WO9310218、Vile and Hart (1993) Cancer Res. 53:3860-3864、Vile and Hart (1993) Cancer Res. 53:962-967、Ram et al. (1993) Cancer Res. 53:83-88、高宮他 (1992) J. Neurosci. Res. 33:493-503、Baba et al. (1993) J. Neurosurg. 79:729-735 (米国特許第4,777,127号、GB2,200,651、EP0,345,242およびWO91/02805) に記載されているものを含む、多数のレトロウイルス遺伝子送達ビヒクルを利用することができる。

20

30

【0222】

本発明のポリヌクレオチドを送達するために使用することができる他のウイルスベクター系は、ヘルペスウイルス、例えば単純ヘルペスウイルス (1997年5月20日発行された、Woo et al. による米国特許第5,631,236号、およびNeurovexによるWO00/08191)、ワクシニアウイルス (Ridgeway (1988) "Mammalian expression vectors," In: Rodriguez R L, Denhardt D T, ed. Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses. Stoneham: Butterworth; Baichwal and Sugden (1986) "Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses: Transient and stable expression of transferred genes," In: Kucherlapati R, ed. Gene transfer. New York: Plenum Press, Coupar et al. (1988) Gene, 68:1-10)、およびいくつかのRNAウイルス、に由来している。好ましいウイルスには、アルファウイルス、ポキシウイルス (poxivirus)、ア

40

50

レナウイルス、ワクシニアウイルス、ポリオウイルスなどが含まれる。それらは、様々な哺乳動物細胞にいくつかの魅力的な特徴を提供する（Friedmann（1989）Science 244：1275-1281、Ridgeway, 1988 上記参照、Baichwal and Sugden, 1986 上記参照、Coupar et al., 1988 上記参照、Horwich et al.（1990）J. Virol. 64：642-650）。

【0223】

他の実施形態において、ゲノム中の標的DNAは、当該分野で周知の方法を使用して操作され得る。例えば、ゲノム内の標的DNAは、レトロウイルス挿入、人工染色体技術、遺伝子挿入、組織特異的プロモーターを用いたランダム挿入、遺伝子ターゲティング、転位因子、および／または外来DNAの導入するまたは修飾DNA／修飾核DNAを産生するための他の方法により、欠失、挿入、および／または変異によって操作することができる。他の修飾技術には、ゲノムからのDNA配列の欠失および／または核DNA配列の変更が含まれる。例えば、核DNA配列は、部位特異的突然変異誘発により変更され得る。

【0224】

他の実施形態において、組換えRHOAドミナントネガティブポリペプチド、およびその断片は、対象に投与され得る。いくつかの実施形態では、増強された生物学的特性を有する融合タンパク質を構築および投与することができる（例えば、上述のFc融合タンパク質）。加えて、RHOAドミナントネガティブポリペプチドおよびその断片は、生物学的利用能の増強とタンパク質分解の低下などの望ましい生物学的活性をさらに高めるために、当該技術分野で周知の薬理学的方法（例えば、ペグ化、グリコシル化、オリゴマー化など）に従って修飾することができる。

【実施例】

【0225】

例示

本発明を、限定と解釈されるべきではない以下の実施例によりさらに説明する。

【0226】

実施例1：実施例2の材料および方法

a. マウスコロニー

Mist1-CreERT2、Cdh1lox／lox、Tomato／GFPマウスは、Cdh1のエクソン2-3に隣接するloxPサイトを持つ条件付き対立遺伝子を持ち、コロンビア大学のTimothy C. Wang氏から快く提供された。Creリコンビナーゼは、タモキシフェン（Sigma、T5648）TAM（1～5mg／0.2mlコーン油、示されたとおり）の経口投与によって活性化された。すべての動物実験と手順は、ダナーファーバー癌研究所の倫理委員会によって承認された。

【0227】

b. マウス胃オルガノイドの単離と培養

Miyoshi et al.（2013）Nat. Prot. 8：2471-2482で先に説明されたプロトコルを次のように実行した。化学試薬を使用してマウスを安楽死させ、縦方向に胃を開き、ペーパータオルで内容物を大まかに取り除く。90mmペトリ皿にある氷冷PBSで組織をすすぎ、50mlの遠心管内で約20mlの氷冷PBSと激しく振とうして組織を洗浄する。洗浄後、組織を35mmペトリ皿に置き、皿を生物学的フード（biological hood）に持って行き、細いハサミで組織を刻む。

1,000μlのピペットを使用して1mlのコラゲナーゼ溶液（Invitrogen、17100-0017、2mg／ml）を加え、組織断片を溶液に懸濁させ、細胞培養インキュベーターでペトリ皿をインキュベートし、1,000μlのピペットを使用して、組織混合物を5～10分ごとに勢いよくピペッティング（pipette）する。ピペッティング後、位相差顕微鏡または解剖顕微鏡を使用して、個々の上皮ユニット（陰窩（crypt）／窩（pit））が大きな組織片から分離されているかどうかを確認する。

50mlの遠心管に70μmのセルストレーナーをセットし、1,000μlのピペット

を使用してセルストレーナーを通して組織混合物をろ過する。ストレーナーを9 mlの洗浄培養液で洗浄し、ろ過した細胞懸濁液を15 mlの遠心管に移し、次いで $20 \times g$ で5分間遠心分離する。500 μ l～1 mlの洗浄培養液を加えて、管内の細胞を再懸濁する。適切な量の懸濁液を1.5 ml管に移し（管あたり1,000～3,000個の無傷の上皮ユニット）、 $200 \times g$ で5分間遠心分離する。管を氷上に置き、マトリゲル（BD、356234、管あたり15 μ l）に上皮ユニットを再懸濁する。管と24ウェルプレートを氷上に置き、20 μ lピペットを使用して各ウェルの中心に15 μ lの細胞マトリゲル懸濁液を加え、ピペットチップでそれを慎重に広げる。細胞培養インキュベーターでプレートをインキュベートしてマトリゲルを重合させる。上皮ユニットがプレートの表面に付着しないように、プレートを上下逆さまにする。500 μ lの50%馴化培地を各ウェルに加える。小腸と盲腸の場合、500 μ lの50%馴化培地（組換えWnt3a（（R&D Systems、5036-WN-010）（100 ng/ml）およびR-spondin 1（（R&D Systems、3474-RS-050）（500 ng/ml）を、10 μ MのY27632（R&D Systems、1254）および10 μ MのSB431542（R&D Systems、1614）を含むAdvanced DMEM/F-12（（Invitrogen、12634-010）に添加）を追加する。少なくとも2日ごとに培地を交換する。

【0228】

c. オルガノイドのレンチウイルス感染

以下のプロトコルを使用した。2～3日間、24ウェルでオルガノイドを成長させ、p1000ピペットでマトリゲルを引っ搔いて培養液に懸濁させる。オルガノイド懸濁液を15 ml管に移し、アッセイの規模に応じて複数のウェルの懸濁液を組み合わせる。管を $200 \times g$ で5分間遠心分離し、約100 μ lを残して上清を吸引する。200 μ lのトリプシン-EDTAでオルガノイドを再懸濁し、37℃で5分間管をインキュベートする。1 mlの洗浄培養液を加え、激しいピペッティングによりオルガノイドを解離させる。管を200 gで5分間遠心分離してから、250 μ lのレンチウイルス溶液（Lenti X（商標）Concentrator（Clontech、カタログ番号631231）で、8 μ g/mlポリブレン（Sigma、TR-1003）、10 μ MのY27632とともに濃縮された）で細胞を再懸濁させる。48ウェルプレート上のウェルに懸濁液を移す。プレートをパラフィルムで密封し、プレートを600 $\times g$ 、32℃で1時間遠心分離することによりスピンドレーション（spincollation）を実行する。プレートを37℃で6時間、インキュベートして形質導入させる。1 mlの馴化培地をウェルに加え、再懸濁し、懸濁液を1.5 ml管に移す。管を $200 \times g$ で5分間遠心分離し、細胞を15 μ lのマトリゲルに再懸濁し、続いてオルガノイドの培養手順を行い、適切な抗生物質で選択する。

【0229】

d. 細胞生存率アッセイ

Cell Titer-Glo（登録商標）（Promega、カタログ番号G7570）のプロトコルに従って、細胞生存率アッセイを実施した。

【0230】

e. 異種移植腫瘍の成長

4週齢のオスのヌードマウス（BALB/c Anu（nu/nu））の各側腹部に、dox誘導性対照またはRHOA変異体ウイルスに感染した細胞を皮下注射した。すべての動物は、ダンナーファーバー癌研究所の施設内動物管理使用委員会のガイドラインに従って維持および使用された。

【0231】

実施例2：RHOAドミナントネガティブ変異体は、CDH1-null癌細胞を死滅させる。

びまん性胃癌（DGC）は、胃癌の非常に致命的なバリエーションであり、早期の浸潤および転移を起こしやすく、効果的な分子標的療法を欠く。DGCの開始は、通常、細胞接着

10

20

30

40

50

タンパク質 E-カドヘリンをコードする腫瘍抑制因子 C D H 1 の喪失に続いておこる。E-カドヘリン (C D H 1) の減少および／または喪失は浸潤性乳小葉癌の重要な特徴であり、C D H 1 を標的とする機能喪失型変異は浸潤性小葉乳癌の 5 0 % ～ 6 0 % に存在し、インサイチュでの小葉癌のマッチングで、多くの場合、観察される初期事象であると考えられている (M c C a r t R e e d e t a l . (2 0 1 5) B r e a s t C a n c e r R e s . 1 7 : 1 2) 。本明細書では、T 1 9 N、G 1 7 V、G 1 7 E などの低分子量 G T P a s e R H O A ドミナントネガティブフォームの異所性発現が、C D H 1 - n u l l 細胞では増殖の有意な阻害と細胞死の誘導をもたらしたが、無傷の C D H 1 を有する細胞では起こらないことが実証された。これらの結果は、同質遺伝子の胃オルガノイドモデル (E-カドヘリンの有無にかかわらず) および同質遺伝子の乳房上皮細胞モデル (E-カドヘリンの有無にかかわらず) および E-カドヘリン喪失 N U G C 4 および M K N 4 5 びまん性胃細胞株を含む異種移植腫瘍成長モデルを使用して確認された。上皮間葉転換 (E M T)、びまん性胃癌、および乳小葉癌についての癌は、E-カドヘリンが喪失および／またはダウンレギュレートされるという点で類似している。これらの発見は、R H O A ドミナントネガティブフォームが、D G C および乳小葉癌、ならびに E M T 表現型を伴う他の癌の効果的な治療法として使用できることを示している。

10

【0232】

参照による組み込み

本出願を通して引用されたすべての参考文献、特許出願、特許、および公開された特許出願、ならびに図および配列表の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

20

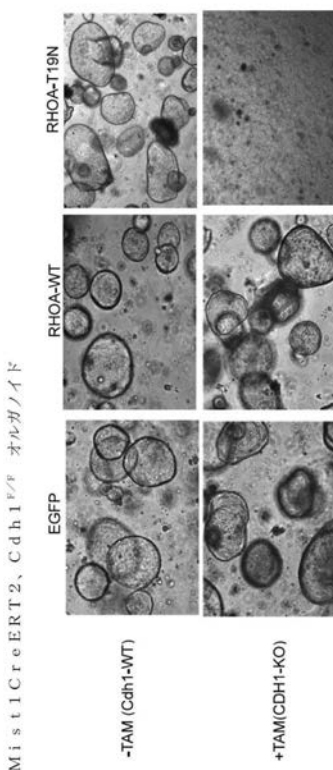
【0233】

均等物

当業者は、本明細書に記載される本発明の特定の実施形態に対する多くの均等物を認識し、または日常的な実験のみを使用して確認することができるであろう。そのような均等物は、添付の特許請求の範囲に含まれることが意図される。

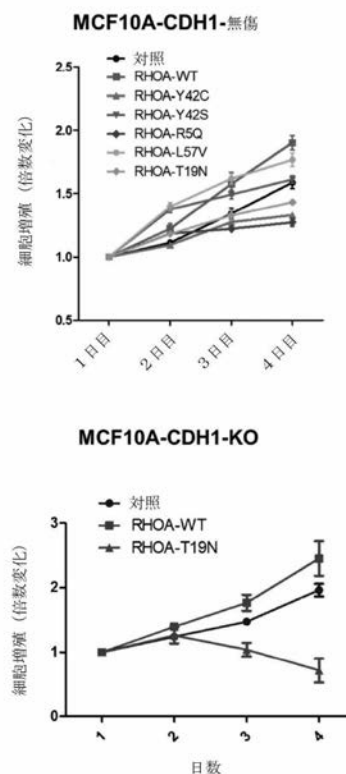
【図1】

【図1】



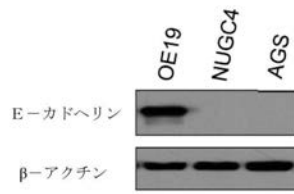
【図2】

【図2】



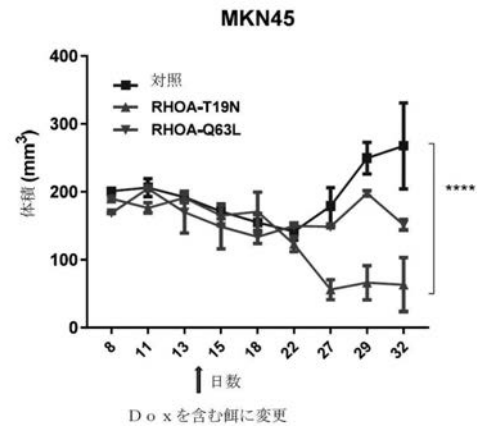
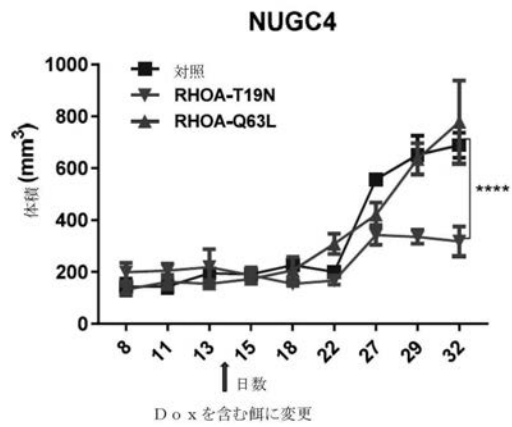
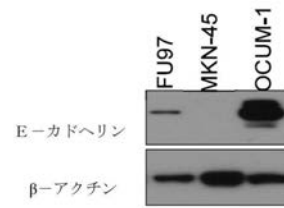
【図 3】

【図 3】



【図 4】

【図 4】



【配列表】

[2021502329000001.app](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2018/059188

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 31/513; A61K 45/06; A61P 35/00; C07K 1/00; G01N 33/53; G01N 33/574 (2019.01)
CPC - C12N 5/0693; C12N 5/0695; C12N 2501/58; C12Q 1/6886; G01N 33/57484; G01N 33/6887;
G01N 2333/705 (2019.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC - 424/130.1; 435/6.12 (keyword delimited)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2007/0161060 A1 (ANDERSON et al) 12 July 2007 (12.07.2007) entire document	1-3, 19-21, 35-37, 48-51
Y	SHANKAR et al. "Actin Cytoskeleton Regulation of Epithelial Mesenchymal Transition in Metastatic Cancer Cells," PLoS One, 10 March 2015 (10.03.2015), Vol. 10, Iss. 3, Pgs. 1-12. entire document	1-3, 19-21, 35-37, 48-51
Y	US 2009/0220985 A1 (PECK et al) 03 September 2009 (03.09.2009) entire document	35-37
A	BHOWMICK et al. "Transforming Growth Factor-b1 Mediates Epithelial to Mesenchymal Transdifferentiation through a RhoAdependent Mechanism," Molecular Biology of the Cell, 01 January 2001 (01.01.2001), Vol. 12, Iss. 1, Pgs. 27-36. entire document	1-3, 19-21, 35-37, 48-51
A	ZHOU et al. "RhoA Mutations Identified In Diffuse Gastric Cancer," Cancer Cell, 14 July 2014 (14.07.2014), Vol. 26, Iss. 1, Pgs. 9-11. entire document	1-3, 19-21, 35-37, 48-51

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"G" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 January 2019

Date of mailing of the international search report

14 FEB 2019

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Blaine R. Copenheaver

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2018/059188

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 4-18, 22-34, 38-47, 52
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/12
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 0 7 K	14/47
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00
C 0 7 K	16/00	(2006.01)	C 0 7 K	16/00
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02
C 1 2 Q	1/68	(2018.01)	C 1 2 Q	1/68

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

2. P L U R O N I C

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 バス, アダム

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 4, サマービル, バンクス ストリート 2 4

(72)発明者 ジャン, ハイシェン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 5 9, ニュートン, ラングリー ロード 3 8 3
 , アpartmentメント 1 2

Fターム(参考) 4B063 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR72 QR77

QS36 QX01

4C084 AA02 AA19 BA01 BA08 BA22 BA23 MA02 NA05 NA14 ZB261

ZB262

4C085 AA03 EE03

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 EA20 EA50 FA74