

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：96108338

C12N 15/12 (2006.01)

※ 申請日期：96.7.9

※IPC 分類：C07H; C07K; C12N; A61K

C12N 15/81 (2006.01)

C07K 14/82 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

RAS 突變及與其相關之組合物及方法

RAS MUTATION AND COMPOSITIONS AND METHODS RELATED
THERE TO

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商環球免疫公司

GLOBEIMMUNE, INC.

代表人：(中文/英文)

提摩西 C 羅迪爾

RODELL, TIMOTHY C.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國科羅拉多州路易維耳市無限街1450號

1450 INFINITE DRIVE, LOUISVILLE, CO 80027, U.S.A.

國籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

三、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 郭志敏
GUO, ZHIMIN
2. 艾力克斯 法蘭族梭夫
FRANZUSOFF, ALEX
3. 魯迎年
LU, YINGNIAN
4. 唐納德 貝爾葛洛
BELLGRAU, DONALD

國 籍：(中文/英文)

1. 中華人民共和國 P.R.C.
2. 美國 U.S.A.
3. 中華人民共和國 P.R.C.
4. 美國 U.S.A.

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2006年03月27日；60/786,568

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☒ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☒ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於RAS突變及與其相關之組合物及方法。

【先前技術】

腫瘤形成或導致新的異常生長之細胞快速增殖之過程為多種可為嚴重的且有時可威脅生命之疾病的特徵。通常，細胞及組織之贅生性生長的特徵在於其超過細胞之正常增殖，其中細胞持續生長，即使激發因素(例如，腫瘤誘發物、致癌物、病毒)已不再存在。該細胞生長傾向於展示缺乏組織結構性及/或與正常組織之協調性，且通常產生可能為良性的或惡性的組織塊。

Ras突變常見於人類、小鼠、大鼠及倉鼠之肺腺癌中。實際上，ras原致癌基因家族中之突變為人類癌症及實驗動物腫瘤中之最常見的致癌基因相關突變。已知在本質上與腫瘤細胞表型相關之ras基因家族致癌基因中存在若干種不同的突變。在78%的胰腺癌、34%的結腸直腸癌、40%的非小細胞肺腺癌及24%的卵巢癌中均在Ras蛋白質中編碼胺基酸12的密碼子處發現突變。在多種癌症中亦在胺基酸13、59及61處發現Ras突變(例如，參見Lu等人，*Cancer Res.* 2004年8月1日；64 (15):5084-8；Abrams等人，*Sem Oncol*1996 23，118-134；Friday及Adjei，*Biochim Biophys Acta* 2005 1756, 127-144)。在失控的細胞增殖及腫瘤發生中，經由Ras致癌基因產物途徑的異常信號轉導起重要作用。該等經明確鑑定之在密碼子12、13及61處之突變導致

組成性Ras活化。

惡性細胞生長或惡性腫瘤為世界範圍內死亡的主要原因，且開發贅生性疾病的有效療法成為大量研究的對象。儘管已提出多種治療及預防癌症的創新方法，但多種癌症仍導致高死亡率且可能難以治療或對習知療法相對無反應。因此，在此項技術中仍存在對其他癌症風險因素之鑑別以及對癌症之早期診斷及治療之方法的持續需要。

【發明內容】

本發明之一實施例係關於一種包含編碼包含突變體Ras蛋白中之至少5個連續胺基酸之胺基酸序列的核酸序列的分離核酸分子。該胺基酸序列含有相應於野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的胺基酸位置76，且其中位置76處之胺基酸與野生型蛋白質相比係經突變。在一態樣中，位置76處之胺基酸由麩胺酸突變為選自由甘胺酸、離胺酸及麩醯胺酸組成之群的非麩胺酸胺基酸殘基。在一態樣中，該非麩胺酸胺基酸殘基為甘胺酸。在一態樣中，該胺基酸序列因SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13中之該位置76處之麩胺酸經非麩胺酸胺基酸取代而與SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13中之任一者不同。在一態樣中，該胺基酸序列進一步包含突變體Ras蛋白之至少5個連續胺基酸殘基，其中該胺基酸序列含有選自由相對於野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白中之12、13、59及61組成之群的胺基酸位

置，且其中該位置處之胺基酸與野生型蛋白質相比係經突變。

在該實施例之一態樣中，該胺基酸序列進一步包含突變體Ras蛋白之至少5個連續胺基酸，其中該胺基酸序列含有相對於野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白中之位置12處的胺基酸，且其中位置12處之胺基酸與野生型蛋白質相比係經突變。在一態樣中，位置12或13處之胺基酸已由甘胺酸突變為非甘胺酸胺基酸殘基。在一態樣中，該非甘胺酸胺基酸殘基係選自：纈胺酸、半胱胺酸、天冬胺酸、精胺酸、絲胺酸及丙胺酸。

在該實施例之另一態樣中，該核酸序列編碼包含兩個或兩個以上域的融合蛋白，其中一域包含包括位置76處之突變之突變體Ras蛋白之至少5個胺基酸，且其中其他各域係由免疫原組成。在一態樣中，該免疫原為腫瘤抗原。在一態樣中，該腫瘤抗原為Ras蛋白或其免疫原性片段，其相對於野生型Ras胺基酸序列包含至少一個突變。在一態樣中，該腫瘤抗原為Ras蛋白或其免疫原性片段，其包含相對於野生型Ras胺基酸序列的位置12或13，其中位置12或13處之胺基酸已由甘胺酸殘基突變為非甘胺酸殘基。在另一態樣中，該腫瘤抗原係選自由以下肽組成之群：(a)包含Ras蛋白中之至少位置8-16的肽，其中相對於野生型Ras蛋白位置12處之胺基酸殘基係經突變；(b)包含Ras蛋白中之至少位置9-17的肽，其中相對於野生型Ras蛋白位置13處之胺基酸殘基係經突變；(c)包含Ras蛋白中之至少位置55-

63的肽，其中相對於野生型Ras蛋白位置59處之胺基酸殘基係經突變；(d)包含Ras蛋白中之至少位置57-65的肽，其中相對於野生型Ras蛋白位置61處之胺基酸殘基係經突變；(e)包含Ras蛋白中之至少位置69-77的肽，其中相對於野生型Ras蛋白位置73處之胺基酸殘基係經突變；(f)包含Ras蛋白中之至少位置70-78的肽，其中相對於野生型Ras蛋白位置74處之胺基酸殘基係經突變；(g)包含Ras蛋白中之至少位置71-79的肽，其中相對於野生型Ras蛋白位置75處之胺基酸殘基係經突變；(h)包含Ras蛋白中之至少位置73-81的肽，其中相對於野生型Ras蛋白位置77處之胺基酸殘基係經突變；及(i)包含Ras蛋白中之至少位置74-82的肽，其中相對於野生型Ras蛋白位置78處之胺基酸殘基係經突變。

在該實施例之一態樣中，該核酸序列編碼包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列的融合蛋白。在另一態樣中，該核酸序列編碼包含SEQ ID NO:15之胺基酸序列的融合蛋白。

本發明之另一實施例係關於一種分離核酸分子，其包含編碼Ras(H-Ras、N-Ras或K-Ras)之核酸序列中之至少5個連續胺基酸，其中在Ras胺基酸序列之位置73處之脯胺酸(P73)、位置74處之蘇胺酸(T74)、位置75處之甘胺酸(G75)、位置77處之甘胺酸(G77)及/或位置78處之苯丙胺酸(F78)係經突變。本發明亦包括編碼包含該等突變中之任一或多個之Ras任一片段的核酸分子，該核酸分子適用於任何篩檢、診斷性或治療性應用。該等位置中之任一或多

處之胺基酸較佳經與存在於Ras野生型序列中之該位置處的胺基酸不同的胺基酸取代。

在另一實施例中，本發明提供包含編碼含有位置59、61、73、74、75、76、77或78處突變中之任一或多個(或其部分)及Ras中不同位置處之一或多個其他突變的Ras蛋白(H-ras、N-ras或K-ras)之核酸序列的分離核酸分子。較佳突變組合為G12突變及/或G13突變與位置59、61、73、74、75、76、77或78處突變中之任一或多個的組合。在另一實施例中，本發明提供不同核酸分子(其中至少一個核酸分子編碼含有一或多個選自以下位置處之突變的Ras(或其部分)：59、61、73、74、75、76、77或78(且較佳選自位置73-78中之任一處)與一或多個含有一或多個其他突變(包括但不限於G12處之突變及G13處之突變)之其他核酸分子的組合。

在本發明之一實施例中，上述任一核酸分子可為寡核苷酸探針或引子。

本發明之另一實施例係關於包含上述任一核酸分子、與至少一個表現控制序列操作性連接的重組核酸分子。

本發明之又一實施例係關於已經上述任一重組核酸分子轉染的重組細胞。在一態樣中，如請求項20之重組細胞，其中該細胞為酵母。

本發明之另一實施例係關於由上述任一核酸分子之分離核酸分子編碼的分離蛋白質或肽。在一實施例中，該分離蛋白質或肽為融合蛋白之部分。

本發明之另一實施例係關於與上述任一核酸序列完全互補的分離核酸分子。

本發明之又一實施例係關於包含上述任一核酸分子的疫苗。

本發明之另一實施例係關於包含上述任一蛋白質或肽的疫苗。在一態樣中，該疫苗進一步包含酵母媒介。在另一態樣中，該酵母媒介重組表現該蛋白質或肽。在一態樣中，該疫苗進一步包含樹突狀細胞，其中該樹突狀細胞在細胞內已負載有該酵母媒介及該蛋白質或肽。

本發明之又一實施例係關於一種疫苗，其包含：(a)酵母媒介；及(b)包含突變體Ras蛋白或其片段的融合蛋白，其中該蛋白質或其片段含有相對於野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的胺基酸位置76，且其中位置76處之胺基酸與野生型蛋白質相比係經突變，其中融合蛋白之表現係在*Cup1*啟動子控制下進行。融合蛋白係由酵母媒介表現。在一態樣中，融合蛋白進一步包含第二突變體Ras蛋白或其片段，其中該第二蛋白質或其片段包含相對於野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的胺基酸位置12，且其中位置12處之胺基酸與野生型蛋白質相比係經突變。

在一態樣中，該融合蛋白包含同框融合之以下蛋白質或片段：(i)突變體Ras蛋白或其片段，其中該蛋白質或片段含有相對於野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白中之胺基酸位置12，且其中位置12處之甘胺酸已經半胱胺酸取代；(ii)突變體Ras蛋白或其片段，其中該蛋白質或片段含有相對

於野生型 K-ras、N-ras 或 H-ras 蛋白中之胺基酸位置 61，且其中位置 61 處之麩醯胺酸已經精胺酸取代；(iii) 突變體 Ras 蛋白或其片段，其中該蛋白質或片段含有相對於野生型 K-ras、N-ras 或 H-ras 蛋白中之胺基酸位置 12，且其中位置 12 處之甘胺酸已經天冬胺酸取代；(iv) 突變體 Ras 蛋白或其片段，其中該蛋白質或片段含有相對於野生型 K-ras、N-ras 或 H-ras 蛋白中的胺基酸位置 12，且其中位置 12 處之甘胺酸已經纈胺酸取代；(v) 突變體 Ras 蛋白或其片段，其中該蛋白質或片段含有相對於野生型 K-ras、N-ras 或 H-ras 蛋白中的胺基酸位置 12，且其中位置 12 處之甘胺酸已經精胺酸取代；及 (vi) 突變體 Ras 蛋白或其片段，其中該蛋白質或片段含有相對於野生型 K-ras、N-ras 或 H-ras 蛋白中的胺基酸位置 76，且其中位置 76 處之麩胺酸已經甘胺酸取代。

在一態樣中，該融合蛋白包含同框融合之以下蛋白質或片段：(i) 突變體 Ras 蛋白或其片段，其中該蛋白質或片段含有相對於野生型 K-ras、N-ras 或 H-ras 蛋白中的胺基酸位置 12，且其中位置 12 處之甘胺酸已經精胺酸取代；及 (ii) 突變體 Ras 蛋白或其片段，其中該蛋白質或片段含有相對於野生型 K-ras、N-ras 或 H-ras 蛋白中的胺基酸位置 76，且其中位置 76 處之麩胺酸已經甘胺酸取代。

在一態樣中，該融合蛋白包含 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列。在另一態樣中，該融合蛋白包含 SEQ ID NO:15 之胺基酸序列。

本發明之又一實施例係關於一種選擇性結合上述任一突

變體Ras蛋白或肽的抗體或其抗原結合片段。

本發明之另一實施例係關於一種選擇性結合上述任一突變體Ras蛋白或肽的適體(aptamer)。

本發明之又一實施例係關於一種siRNA分子，其催化選擇性裂解由上述任一核酸分子所轉錄之RNA或由編碼上述任一突變體Ras蛋白(且特定言之，包含因至少一個在相對於野生型胺基酸序列位置76處之突變而與野生型K-ras、N-ras或H-ras胺基酸序列不同之胺基酸序列的突變體Ras蛋白)之ras基因所轉錄之RNA。

本發明之另一實施例係關於一種選擇性催化上述核酸分子或編碼上述任一突變體Ras蛋白(且特定言之，包含因至少一個在相對於野生型胺基酸序列位置76處之突變而與野生型K-ras、N-ras或H-ras胺基酸序列不同之胺基酸序列的突變體Ras蛋白)之ras基因失活的核糖核酸酶。

本發明之又一實施例係關於一種在極高嚴謹條件下與上述任一核酸分子或編碼上述任一突變體Ras蛋白(且特定言之，包含因至少一個在相對於野生型胺基酸序列位置76處之突變而與野生型K-ras、N-ras或H-ras胺基酸序列不同之胺基酸序列的突變體Ras蛋白)之ras基因雜交且抑制上述任一核酸分子或編碼上述任一突變體Ras蛋白之ras基因表現的反義核酸分子。

本發明之另一實施例係關於上述任一核酸分子或上述任一蛋白質或肽在製備用於預防或治療癌症之組合物中的用途。

本發明之另一實施例係關於上述任一疫苗在製備用於預防或治療癌症之藥物中的用途。

本發明之另一實施例係關於上述任一適體、上述任一 siRNA、上述任一核糖核酸酶或上述任一反義核酸分子在製備用於預防或治療癌症之藥物中的用途。

本發明之另一實施例係關於一種診斷腫瘤的方法，其包含偵測來自欲診斷之患者之測試樣本中突變體 Ras 蛋白或編碼該 Ras 蛋白之核酸序列的表現或活性，其中該 Ras 蛋白包含相對於野生型 Ras 胺基酸序列中之位置 76 處的突變。對測試樣本中突變體 Ras 蛋白或編碼該 Ras 蛋白之核酸序列之偵測指示測試樣本中腫瘤細胞之存在或其可能性。在一態樣中，Ras 蛋白包含用甘胺酸取代野生型蛋白質中位置 76 處之麩胺酸。在一態樣中，該方法進一步包含偵測 Ras 蛋白是否亦包含相對於野生型 Ras 胺基酸序列中位置 12 處的突變，其中對位置 76 處及位置 12 處之突變的偵測指示測試樣本中腫瘤細胞之存在或其可能性，且另外指示患者中與含有在該等位置僅具有一個突變或無突變之 Ras 蛋白的腫瘤細胞相比具有更強侵入性之腫瘤。在一態樣中，偵測步驟包含偵測測試樣本中編碼 Ras 突變的核酸序列。在一態樣中，偵測步驟包含 PCR 擴增編碼該突變之基因組 DNA 模板或原位 PCR 擴增編碼該突變之 DNA 序列。在一態樣中，偵測步驟係藉由選自由以下方法組成之群的方法進行：聚合酶鏈反應 (PCR)、逆轉錄酶-PCR (RT-PCR)、原位雜交、北方墨點法 (Northern blot)、序列分析法、基因微

陣列分析法及偵測報導基因法。在一態樣中，編碼突變體Ras蛋白之核酸序列的含量係藉由使自測試樣本中分離之核酸與選擇性結合編碼突變體Ras蛋白之核酸序列的引子或探針接觸且偵測編碼突變型Ras蛋白的核酸序列是否由引子或探針結合來測定。在一態樣中，突變體Ras蛋白之含量係藉由使測試樣本與選擇性特異性結合突變體Ras蛋白的抗體或其片段或適體接觸且偵測該抗體或其片段或適體是否結合於突變體Ras蛋白來測定。在一態樣中，該測試樣本係來自診斷為癌症的患者，且其中將該測試樣本與陰性對照樣本加以比較。在一態樣中，測試樣本係固定於基板上。在一態樣中，該方法係用於診斷患者之癌症。在一態樣中，該方法係用於判定患者癌症之預後。在另一態樣中，該方法係用於判定患者對治療性治療之敏感性。

本發明之另一實施例係關於用於本發明之診斷方法中的套組。該套組較佳含有適用於偵測測試樣本中本發明之Ras (蛋白質)或*ras* (核酸)突變存在或不存在的任何試劑，且較佳包括與生物標記(亦即，突變型*ras*基因、RNA、cDNA或由其所編碼之蛋白質)結合的寡核苷酸探針、PCR引子或抗體、抗原結合肽或適體。該套組可包括執行本文中設想之診斷方法所需要的任何試劑。該套組亦可包括用於偵測其他癌症生物標記(諸如前述Ras突變)或任何其他適用於癌症診斷(甚至與本文中所述之Ras突變無關之原因所導致的癌症)之標靶的試劑。

本發明之又一實施例係關於一種鑑別用於預防或治療癌

症之化合物的方法，其包含鑑別靶Ras蛋白或編碼該靶Ras蛋白之核酸分子的抑制劑，其中該靶Ras蛋白包含相對於野生型Ras蛋白中位置76處的突變。在一態樣中，該突變為野生型蛋白質中位置76處之麩胺酸經選自由甘胺酸、離胺酸及麩醯胺酸組成之群之非麩胺酸胺基酸取代。在一態樣中，鑑別步驟包含鑑別靶Ras蛋白之表現或活性的抑制劑。在一態樣中，偵測步驟係選自由以下步驟組成之群：在推測之調節化合物的存在下偵測靶Ras蛋白的轉譯或活性；及在推測之調節化合物的存在下偵測編碼靶Ras蛋白之基因的表現。在一態樣中，該方法包括如下步驟：(a)使宿主細胞與推測之調節化合物接觸，其中該宿主細胞表現靶Ras蛋白或其生物學活性片段；及(b)偵測推測之調節化合物是否引發靶Ras蛋白或其生物學活性片段之GTP水解，其中指示與推測之調節化合物不存在時相比引發靶Ras蛋白之GTP水解的推測之調節化合物為預防或治療癌症的候選化合物。在一態樣中，該宿主細胞為腫瘤細胞株。

本發明之另一實施例係關於一種鑑別用於預防或治療癌症之化合物的方法，其包含鑑別在表現突變型靶Ras蛋白之細胞中而非在表現野生型Ras蛋白之細胞中引發GTP水解的化合物，其中該突變型靶Ras蛋白相對於野生型Ras蛋白在位置76處包含突變。

在以上任一鑑別方法之一態樣中，該推測之調節化合物可選自：適體、siRNA分子、反義核酸分子、核糖核酸

酶、抗體或其抗原結合片段、構形拮抗劑及小分子抑制劑。

【實施方式】

本發明一般係關於本發明人在人類Ras中新發現之據信在某些具有該突變之個體中造成或導致癌症之突變的發現，該突變包括此特定突變之多個變異體。特定言之，本發明人已發現，可在顯著百分比之患者腫瘤中鑑別出在人類Ras序列(K-Ras、N-Ras或H-Ras)中第76號胺基酸(亦即，由密碼子76所編碼)處的突變且該突變增加腫瘤之致癌性。本發明人已盡全力瞭解，此特定Ras突變在先前未曾鑑別。本發明亦係關於本發明人之以下發現：當此新發現之突變與先前所述之第二個Ras突變(尤其密碼子12突變)同時存在於腫瘤細胞內時，該突變組合協同增強含有該等突變之腫瘤的致癌性。詳言之，該突變組合與單一突變相比，就強化腫瘤生長而言具有協同效應，其在活體外與活體內均已得到證明。因此，本發明提供利用該等發現的核酸分子及蛋白質，以及基於該等發現的多種研究、診斷及治療工具及使用方法，如下文中所詳述。

特定言之，在表現突變型Ras蛋白(本文亦稱為Tarmogen)之完整熱殺死酵母之第I期免疫治療試驗中，藉由對來自患有胰腺癌(68%偵測到密碼子12、13或61發生*ras*突變)、結腸直腸癌(40%偵測到密碼子12、13或61發生*ras*突變)或非小細胞肺癌(NSCLC)(9%偵測到密碼子12、13或61發生*ras*突變)之149個受檢者之腫瘤的外顯子2及3進行巢式PCR擴

增及直接測序來對K-ras、N-ras及H-ras DNA序列鑑定是否存在腫瘤相關突變。在患有全部3種癌症類型之24名受檢者中，偵測到密碼子76處之新ras突變，其中22名為E76G突變，同時1名受檢者之腫瘤含有E76K突變且1名受檢者之腫瘤含有E76Q突變。在8名受檢者之腫瘤中鑑別出E76加上前述在密碼子12或13處之突變之雙組合。

更特定言之，如表1(參見實例1)中所示，肺腫瘤33個中有5個(~15%)、結腸直腸腫瘤85個中有12個(~14%)及胰腺腫瘤31個中有7個(~22.5%)(已獲得全部三種Ras基因(外顯子2及3)的完整測序資訊)在人類Ras序列之第76號胺基酸(亦即，由密碼子76所編碼)處呈現突變(Ras E76突變)。肺腫瘤、結腸直腸腫瘤中之一者在K-ras與H-ras之胺基酸76處具有突變。在結腸直腸腫瘤之情形中，在胺基酸76處之突變中12個中有10個為麩胺酸突變為甘胺酸(E76G)，1個突變為麩胺酸突變為離胺酸(E76K)且1個突變為麩胺酸突變為麩醯胺酸(E76Q)。肺腫瘤及胰腺腫瘤中所有E76突變均為E76G突變。總而言之，在第I期試驗所研究之腫瘤中，在Ras胺基酸76處的突變發生率僅次於在Ras胺基酸12處的突變發生率(參見圖1)。先前已知之在該同組腫瘤樣本中位置12、13及61處的Ras突變的頻率展示於表2中(參見實例1)。儘管E76K突變存在N-ras基因之外顯子3中，但E76突變主要發生於K-ras或H-ras外顯子3基因中。又，如上所述，在8名受檢者之腫瘤中鑑別出E76加上前述在密碼子12或13處之突變之雙組合。該等資料共同指示Ras基因

之密碼子76處的突變在該等個體中造成或導致癌症。

本發明人之其他研究已證明，實際上鼠K-ras之密碼子76 Ras突變在Balb3T3細胞中之表現增加軟瓊脂中該等細胞活體外之集落形成。特定言之，在非臨床研究中已證明Ras E76G及E76K突變正轉化。尤其值得關注的是，偶合密碼子76及12突變產生腫瘤生長協同作用(亦即，突變組合協同作用以顯著增強含有具有該等雙突變之Ras之腫瘤的致癌性)。此外，當將各種突變體K-ras基因注射入BALB/c裸鼠中時，雙G12-E76 Ras突變(特定言之，在該實驗中為G12V-E76G突變)與含有任何單突變的腫瘤細胞相比導致腫瘤生長顯著加快。得到該等發現，本發明人相信(不受理論束縛)，E76突變可產生活化之Ras癌蛋白。

分別地，上述在密碼子12或密碼子61處之突變阻礙 γ 磷酸根自GTP中釋出或阻止結合於Ras之Ras-GAP蛋白引發GTP水解。當本發明人檢查已知Ras晶體結構之胺基酸76之位置時，發現該殘基位於命名為開關2或環4之環的末端(參見圖4)。參考圖4，胺基酸12、13、61及76之估計位置突出展示於蛋白質三級結構中(例如，關於位於Ras晶體結構內的胺基酸定位，請參見RSSB蛋白質資料庫(Protein Data Bank) (PDB)或Franken, SM等人，*Biochemistry* 1993, 32:8411-20中的多個結構)。該示意圖突出展示與野生型(G12)序列之彼域(右圖)相比，因H-Ras (G12D)中之密碼子12突變所致之Ras蛋白晶體結構改變(左圖)。此外，含有密碼子61突變體形式之H-Ras (Q61L)之域的結構改變藉由與

野生型序列之彼域(左圖)比較而得以明顯。環4之近端含有胺基酸61，其中突變在本發明之前已定義為活化動物及人類癌症中之Ras癌蛋白(例如，參見Lu等人，Cancer Res. 2004年8月1日；64 (15):5084-8；亦參見諸多臨床研究-同樣實例1中所述之當前試驗中的兩名結腸直腸癌患者在Ras密碼子61處具有突變)。Ras蛋白中之該環與結合GTP酶活化蛋白(Ras-GAP)相關，該等GTP酶活化蛋白引發與活化之Ras蛋白結合之GTP的水解，以使Ras轉化為非活性GDP結合形式。不能引發GTP水解使得Ras蛋白維持在活化狀態(與GTP結合)，且因此組成性傳送細胞增殖信號。因此，密碼子61處之突變阻止相互作用之蛋白質退出活化狀態。密碼子12處之突變干擾末端磷酸根之釋放，使得該蛋白質保持於活化狀態。該活化狀態因此為Ras蛋白(結合有GTP)能夠與下游效應蛋白質結合以傳送來自上游活化因子之增殖信號或在突變型Ras蛋白質之情形下傳遞組成性活化信號的構形。

關鍵開關2/環4 (GAP結合)域中另一'鉸鏈'處之胺基酸76之定位符合本發明人的看法：該胺基酸之突變類似地干擾Ras功能。舉例而言，麩胺酸突變為甘胺酸(Ras E76G突變)例如將Ras序列由甘胺酸-麩胺酸-甘胺酸(密碼子74-76之單字母代碼為GEG)改變為甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸('突變型'密碼子74-76之單字母代碼為GGG)。已知將甘胺酸引入 α -螺旋結構在生物化學上有礙 α -螺旋狀環結構之維持。因此，預計GEG改變為GGG使環4/開關2之 α -螺旋中斷，且

干擾為促進GTP水解所需的構形變化。類似地，在胺基酸76處麩胺酸改變為離胺酸或麩胺酸改變為麩醯胺酸(分別為E76K或E76Q)會改變胺基酸之電荷，若麩胺酸之負電荷對於分子內或分子間蛋白質-蛋白質相互作用為重要的，則此改變亦具有破壞蛋白質結構及功能之可能性。因此，本發明人之大部分人類腫瘤具有Ras E76突變之觀測結果可由Ras結構及功能研究來說明。因此對人類腫瘤中之密碼子76 *ras*突變之鑑別代表了癌症治療的新標靶。

該等觀測結果使得本發明人在本文中另外提出，在E76相關鉸鏈區中所關注之突變亦可包括在胺基酸P73、T74、G75、E76、G77及F78處之突變，且該等位置處之突變對於Ras GTP水解且從而對細胞增殖(腫瘤生長)具有與本文中所述E76突變類似的效應。因此，密碼子73、74、75、77及78處之突變亦代表癌症治療的新標靶。

本發明人之結果亦指示，含有雙突變的腫瘤更可能展現侵入性生長特徵。因此，患者腫瘤中雙密碼子12與76 *ras*突變之基因型據信可預示加速之惡性表型，其已由本文中所提供之資料表明。因此對包含密碼子76 *ras*突變在內之組合突變的鑑別代表了癌症治療的又一新標靶。此外，由於本發明人之實例1中之資料亦指示Ras之A59或Q61處之突變亦可連同G12或G13突變一起存在，本發明人在本文中提出，G12或G13處之突變(干擾末端磷酸根之釋放)與A59、Q61或E76中任一者或多者之其他組合，或實際上與在與E76同一鉸鏈區中之其他胺基酸中任一者(亦即，

P73、T74、G75、E76、G77、F78)之其他組合，亦經由抑制Ras GTP水解來增強細胞增殖之信號轉導，且因此產生更具侵入性之腫瘤表型，使轉移可能性增強。此係基於本發明人之以下觀點：減弱釋放裂解之GTP之能力(位置12/13處突變之影響)與不能傳輸GTP酶活性信號(開關2/環4區域任一側上位置59、61、73-78處突變之影響)的組合使細胞增殖信號轉導增強一個數量級，如由針對G12與E76處突變之組合所提供之資料所表明。儘管本發明人之資料表明，同一DNA分子上存在之突變之組合產生更具侵入性之表型且會加強惡性轉移，但該表型可經由同一DNA分子(同一基因)中的兩個突變及/或經由Ras各等位基因上單獨存在之突變來出現。因此，本發明包括具有位置12或13處之突變與位置59、61、73、74、75、76、77或78處之突變之任何組合的核酸分子，其中位置12或13處與位置59、61或76處之組合為本發明之特定實施例。如下文中更詳細描述，包含該等組合之蛋白質或肽以及該等核酸分子及蛋白質(及相關工具)之用途均涵蓋於本發明。

因此，本發明之一實施例係關於一種包含編碼Ras (H-Ras、N-Ras或K-Ras)之核酸序列的分離核酸分子，其中Ras胺基酸序列之位置76處的麩胺酸(E76)係經突變。本發明亦涵蓋編碼包含位置76突變之Ras任何片段的核酸分子，該核酸分子適用於任何篩檢、診斷或治療應用中。較佳地，位置76處之胺基酸係經另一胺基酸(非麩胺酸之胺基酸，或"非麩胺酸胺基酸")取代，其可包括(但不限於)甘胺酸取代、

離胺酸取代或麩醯胺酸取代。在另一實施例中，本發明提供包含編碼含有E76突變(或其部分)及Ras中不同位置處之一或多個其他突變之Ras (H-ras、N-ras或K-ras)之核酸序列的分離核酸分子。較佳突變組合為E76突變與G12突變，儘管如上所述，本發明之該態樣不限於此組合。在另一實施例中，本發明提供不同核酸分子(其中至少一個核酸分子編碼含有E76突變的Ras (或其部分))與一或多個含有一或多個其他突變(包括但不限於G12處之突變、G13處之突變、A59處之突變及/或Q61處之突變)之其他核酸分子的組合。編碼單獨或連同該等其他突變包含位置76突變之Ras蛋白或肽的核酸分子例如作為供研究或診斷工具用之探針或引子適用於製備作為診斷或治療試劑的反義或siRNA分子(如下所述)及/或編碼用作研究、診斷及/或治療試劑的Ras蛋白及肽，所有內容於下文中更詳細描述。

本發明之另一實施例係關於一種包含編碼Ras (H-Ras、N-Ras或K-Ras)之核酸序列的分離核酸分子，其中Ras胺基酸序列中Ras位置73處之脯胺酸(P73)、位置74處之蘇胺酸(T74)、位置75處之甘胺酸(G75)、位置77處之甘胺酸(G77)及/或位置78處之苯丙胺酸(F78)係經突變。本發明亦涵蓋編碼包含該等突變中任一或多者之Ras之任何片段的核酸分子，該核酸分子適用於任何篩檢、診斷或治療應用中。該等位置中任一或多者處之胺基酸較佳經與Ras之野生型序列中該位置處所存在之胺基酸不同的胺基酸取代。

在另一實施例中，本發明提供包含編碼含有位置59、

61、73、74、75、76、77或78處之突變中任一或多者(或其部分)及Ras中不同位置處之一或多個其他突變的Ras蛋白(H-ras、N-ras或K-ras)之核酸序列的分離核酸分子。較佳突變組合為G12突變及/或G13突變與位置59、61、73、74、75、76、77或78處突變中之任一或多者的組合。在另一實施例中，本發明提供不同核酸分子(其中至少一個核酸分子編碼含有一或多個選自以下位置處之突變的Ras(或其部分)：59、61、73、74、75、76、77或78(且較佳選自位置73-78中之任一者))與一或多個含有一或多個其他突變(包括(但不限於)G12處之突變及G13處之突變)之其他核酸分子的組合。

編碼包含上述任一突變及其組合之Ras蛋白或肽的核酸分子例如作為供研究或診斷工具用之探針或引子適用於製備作為診斷或治療試劑的反義或siRNA分子(如下所述)及/或編碼用作研究、診斷及/或治療試劑的Ras蛋白及肽，所有內容於下文中更詳細描述。

本發明亦包括由以上鑑別之任一核酸分子所編碼的蛋白質，其包括單獨或連同其他突變包含位置76突變(或位置73、74、75、77或78處突變中之任一或多者)且適用於任何研究、診斷或治療應用中的任何Ras蛋白之片段。

Ras E76突變的用途，以及位置73、74、75、77或78處之突變或本文中所述之Ras突變之任一組合的用途可經進一步擴展以涵蓋多種研究、診斷及治療工具，其包括：開發選擇性結合具有該特定突變或該等突變之Ras蛋白的抗

體；開發選擇性結合具有該特定突變或該等突變之Ras蛋白的適體；開發適用作用於抑制含有該特定突變或該等突變之Ras之表現之診斷試劑或治療工具的siRNA或反義核酸序列；開發包括構形拮抗劑之引發GTP水解或就此另外補償該等突變體Ras蛋白之缺乏或活性過高的治療分子；及/或開發包括轉殖基因動物及細胞株之表現該或該等突變的動物模型。

本發明之另一實施例係關於Ras E76突變或位置73、74、75、77或78處之突變或本文中所述Ras突變之任一組合在癌症的診斷或預後性檢定中作為標記之用途。舉例而言，生物樣本可獲自欲就癌症或產生癌症之風險接受測試的患者，且可在基因、RNA或蛋白質水平分析含有E76突變(或位置73、74、75、77或78處之突變)之Ras的表現。與無該突變者相比，預測表現具有該突變之Ras的患者處於患有癌症或診斷為更可能患上癌症之較高風險中。此外，與Ras中不具有該突變組合者相比，預測表現具有位置59、61、73、74、75、76、77或78中任一處之突變加上第二Ras突變(且特定言之為G12或G13突變)(尤其關注E76與G12處突變之組合)之Ras的患者處於患有癌症、診斷為患有更具侵入性之癌症或經診斷更可能患上癌症之風險中。此外，可利用Ras位置73-78突變中之任一者(且特定言之為E76突變)及該等突變或位置59或61突變與其他突變(例如，G12突變或G13突變)之組合的存在或不存在來確定針對患者之癌症療法或預測患者之治療結果。舉例而言，具

有 Ras E76G 突變之患者可以特定方式治療或用基於 Ras E76 突變存在的特定治療組合物(例如，藉由選擇實現 GTP 水解的化合物)治療。實際上，本發明之下述實施例係針對基於鑑別該特定突變或位置 73-78 處突變中之任一者或本文中所述突變之組合的免疫治療方法。具有 E76 突變與另一突變(諸如 G12 突變)之組合的患者經預測可能會患上尤其具有侵入性之腫瘤及/或可能會促進原發性腫瘤自原始位點轉移，且從而可加以治療，包括利用基於 E76 損害或基於此突變組合的免疫治療方法治療。G12 或 G13 突變與如上所述之開關 2/環 4 區域中突變之其他組合經預測亦指示尤其具有侵入性之腫瘤。

本發明之又一實施例係關於 Ras E76 突變(或位置 73、74、75、77 或 78 處之突變，或本文中所述之 Ras 突變組合之任一者)作為供治療患者之癌症之治療方法用的標靶的用途。該等治療方法可包括(但不限於)化學治療方法及免疫治療方法。舉例而言，基於上述所提出之 Ras E76 突變之作用機制，吾人可設計或提出化學治療策略，該等策略例如使 GTP 能夠自 Ras 蛋白水解或對 Ras 不能引發 GTP 水解加以補償。吾人較佳設計能夠調節突變型 Ras 蛋白之 GTP 水解而不影響野生型非突變型 Ras 蛋白之 GTP 水解的化合物(下文詳述)。以說明之方式，可使用本文中所提供之資訊開發多種引發活性 Ras 蛋白之 GTP 水解之合成分子、適體或構形拮抗劑。在一免疫治療方法中，使用 Ras E76 突變(或位置 73-78 處之其他突變)製造或提供突變型 Ras 抗原

以針對表現該突變型Ras的腫瘤細胞激發免疫反應。類似地，可使用Ras突變之組合(例如，E76與G12)。舉例而言，突變型Ras蛋白或肽或編碼其之核酸可在檢定中用作鑑別經預測可改變Ras蛋白在腫瘤細胞中之表現或活性的新穎小分子或肽藥物的標靶。該實施例之較佳態樣在下文中描述。

本發明之另一實施例係關於預防性或治療性疫苗或組合物以及使用其保護動物防止癌症的方法。該疫苗或組合物可包括單獨或連同其他包含其他突變之Ras免疫原部分或與相關於欲治療或預防之腫瘤的其他免疫原組合包含包括本文所述之E76突變之Ras的一或多個免疫原部分(或包含位置73、74、75、77或78處突變之Ras之一或多個免疫原部分)的抗原。該疫苗或組合物亦可包括單獨或與欲治療或預防之腫瘤相關之其他免疫原組合包含包括本文所述之Ras突變組合中之任一者的Ras之一或多個免疫原部分的抗原。用於傳遞該抗原的任何醫藥學上可接受之媒介(包括任何佐劑、載劑或其他傳遞媒介)可包含於該疫苗或組合物中。在一較佳實施例中，該媒介為基於酵母之媒介，其於下文詳述。Ras抗原可提供於用於治療含有Ras E76突變(或位置73、74、75、77或78處之突變或本文所述Ras突變組合中之任一者)之任何癌症的組合物中，且亦可作為用於治療多種癌症之基於多抗原決定基及/或多抗原之產物之一成分提供，該等癌症可包括所有含有Ras E76突變(或位置73、74、75、77或78處之突變，或本文中

所述Ras突變組合中之任一者)的癌症。其他Ras抗原及/或其他癌症抗原或其免疫原部分可如上包含於該疫苗或組合物中。

一般技術

除非另有說明，否則本發明之實施將利用熟習此項技術者已熟知的分子生物學(包括重組技術)、微生物學、細胞生物學、生物化學、核酸化學及免疫學之習知技術。該等技術完整解釋於如下文獻中，諸如 *Methods of Enzymology*，第194卷，Guthrie等人編，Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990)；*Biology and activities of yeasts*，Skinner等人編，Academic Press (1980)；*Methods in yeast genetics : a laboratory course manual*，Rose等人，Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990)；*The Yeast Saccharomyces: Cell Cycle and Cell Biology*，Pringle等人編，Cold Spring Harbor Laboratory Press (1997)；*The Yeast Saccharomyces: Gene Expression*，Jones等人編，Cold Spring Harbor Laboratory Press (1993)；*The Yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energetics*，Broach等人編，Cold Spring Harbor Laboratory Press (1992)；*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*，第二版(Sambrook等人，1989)及 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*，第三版(Sambrook及 Russel, 2001)，(本文中統稱為 "Sambrook")；*Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel等人編，1987，包括2001

年 全 年 增 刊) ; *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis 等 人 編 , 1994) ; Harlow 及 Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York ; Harlow 及 Lane (1999) *Using Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (本 文 統 稱 為 "Harlow 及 Lane"), Beaucage 等 人 編 , *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000) ; *Casarett and Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons*, C. Klaassen 編 , 第 6 版 (2001) ; 及 *Vaccines*, S. Plotkin 及 W. Orenstein 編 , 第 3 版 (1999)。

一 般 定 義

除 非 另 有 說 明 , 否 則 本 文 中 一 般 提 及 "Ras 突 變" 係 指 *ras* 基 因 之 核 酸 序 列 中 的 突 變 或 獲 自 或 源 自 *ras* 基 因 之 核 酸 (例 如 , RNA、DNA) 中 的 突 變 , 以 及 Ras 蛋 白 或 其 肽 之 胺 基 酸 序 列 中 的 突 變 。 提 及 Ras 之 核 酸 序 列 或 胺 基 酸 序 列 中 特 定 位 置 處 之 突 變 可 藉 由 提 及 其 中 突 變 發 生 之 密 碼 子 或 胺 基 酸 位 置 編 號 來 描 述 , 且 該 等 提 及 可 互 換 使 用 (例 如 , 提 及 "密 碼 子 76" 或 "位 置 76" 或 "E76" 均 可 用 於 指 *ras* 核 酸 序 列 中 編 碼 Ras 之 胺 基 酸 76 或 位 置 76 處 現 有 胺 基 酸 殘 基 (麩 胺 酸) 之 密 碼 子 , 其 中 突 變 係 在 核 酸 或 胺 基 酸 序 列 中 加 以 描 述)。

根 據 本 發 明 , 分 離 核 酸 分 子 為 已 自 其 天 然 環 境 中 移 出 (亦 即 , 已 經 受 人 類 處 理) 的 核 酸 分 子 , 其 天 然 環 境 為 核 酸 分 子 天 然 存 在 於 其 中 的 基 因 組 或 染 色 體 。 因 而 , "分 離" 不

必反映核酸分子已經純化的程度，但表明該分子不包括該核酸分子天然存在於其中的完整基因組或完整染色體。此外，分離核酸分子不為核酸分子文庫，諸如由腫瘤樣本所產生的核酸分子文庫。分離核酸分子可包括基因。包括基因的分離核酸分子不為包括該基因的染色體片段，而包括與該基因有關之編碼區及調節區，但無天然存在於同一染色體上之其他基因。分離核酸分子亦可包括由通常不與該特定核酸序列天然側接的其他核酸(亦即，異源序列)側接(亦即，在該序列之5'端及/或3'端)的核酸序列。分離核酸分子可包括DNA、RNA(例如，mRNA)，或DNA或RNA之衍生物(例如，cDNA、siRNA)。儘管短語"核酸分子"主要係指實體核酸分子而短語"核酸序列"主要係指核酸分子上核苷酸之序列，該兩個短語可互換使用，尤其對於能夠編碼蛋白質或蛋白質之域或部分的核酸分子或核酸序列。

本發明之核酸分子的最小尺寸為足以形成(例如，在中度、高度或極高度嚴謹條件下)能夠與本發明之核酸分子之互補序列形成穩定雜交物的探針或寡核苷酸引子的尺寸，或足以編碼充當免疫原性抗原決定基之胺基酸序列的尺寸，其足以用於產生抗體或抗原結合肽，或具有天然編碼蛋白質(例如，Ras)或突變型蛋白質(例如，Ras突變體)或其片段的生物活性。因而，編碼該蛋白質之核酸分子的尺寸可視核酸組成及核酸分子與互補序列之間的同源性或一致性百分比而定，以及視雜交條件本身(例如，溫度、鹽濃度及甲醯胺濃度)而定。若核酸分子富含GC，則用作

寡核苷酸引子或用作探針之核酸分子的最小尺寸通常長至少約12至約15個核苷酸，且若其富含AT則通常長至少約15至約18個鹼基。除實施限制外，不存在對本發明之核酸分子最大尺寸之限制，其係因為該核酸分子可包括足以適用於本文所述本發明之任何實施例中的序列。

本發明之分離核酸分子可利用重組DNA技術(例如，聚合酶鏈反應(PCR)擴增、選殖)或化學合成製備。分離核酸分子包括天然核酸分子及其同源物，包括(但不限於)天然等位基因變異體及修飾核酸分子，在該等修飾核酸分子中，核苷酸已以該等修飾提供所要效應(例如，將E76G突變引入如本文論述之Ras胺基酸序列中)之方式插入、缺失、取代及/或反轉。

核酸分子同源物可利用多種熟習此項技術者已知之方法製備(參見，例如，Sambrook等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs Press (1989))。舉例而言，核酸分子可利用多種技術修飾，該等技術包括(但不限於)典型突變誘發技術及重組DNA技術，諸如定位誘變、化學處理核酸分子以誘發突變、限制酶裂解核酸片段、連接核酸片段、PCR擴增及/或誘發核酸序列之選定區域突變、合成寡核苷酸混合物及連接混合物群以"建立"核酸分子之混合物及其組合。藉由篩檢由該核酸所編碼之蛋白質之功能及/或與野生型基因雜交，可自經修飾之核酸的混合物中選擇核酸分子同源物。

寡核苷酸探針或探針為長度通常在約8個至數百個核苷

酸尺寸範圍內之核酸分子。該分子通常用於藉由在嚴謹雜交條件下與靶核酸序列雜交來鑑別樣本中之該靶核酸序列。雜交條件已於上文詳述。

PCR引子亦為核酸序列，儘管PCR引子通常為用於聚合酶鏈反應中之長度相當短的寡核苷酸。PCR引子及雜交探針可易於由熟習此項技術者利用靶序列之序列資訊開發及製備。(參見，例如，Sambrook等人，同上或Glick等人，同上)。

適體為根據其以高親和力及特異性與預定特定靶分子結合之能力而選自隨機化組合核酸文庫中之合成核酸(通常為RNA及DNA)的短股。適體呈現限定三維結構且能夠辨別化合物之間結構上之極小差異。

RNA干擾(RNAi)為一種經由基因沉默使基因失活的方法，稱"RNA干擾" (RNAi)。參見，例如，Fire等人，*Nature* 391: 806-811(1998)及美國專利6,506,559。RNA干擾係指當RNA聚核苷酸經由內源細胞過程起作用以特異性抑制其序列對應於該RNA之序列之基因的表現時發生的事件。靶基因沉默在宿主動物經雙股(ds) RNA將RNA降解後發生，有時經由RNAase III核酸內切酶消化而發生。儘管分子大小可多達30個鹼基，但消化產生長度(或尺寸)為約21至23個核苷酸(或鹼基)之分子。該等短RNA物質(短干擾RNA或siRNA)可能經由RNAi核酸酶複合物(稱為RNA誘導沉默複合物(RISC))介導相應RNA訊息物及轉錄物之降解，該RNAi核酸酶複合物有助於小的dsRNA經由鹼基配對相互作用識別互補mRNA。siRNA與其受質相互作用後，mRNA由

或許存在於RISC中之酶靶向加以降解。此類型之機制似乎適用於有機體抑制病毒感染、轉位子跳躍及類似現象且適用於調節內源基因之表現。迄今已在植物、昆蟲、線蟲及脊椎動物以及其他有機體中證明RNAi活性。欲知一般背景資訊，請參見，例如Schutz等人，*Virology* 344(1):151-7 (2006)；Leonard等人，*Gene Ther.* 13(6):532-40 (2006)；Colbere-Garapin等人，*Microbes Infect.* 7(4):767-75 (2005)；Wall, *Theriogenology* 57(1):189-201 (2002)；El-Bashir等人，*Nature* 411: 494-498 (2001)；Fire, A.等人，*Science* 391: 806-811 (1998)；Gitlin等人，*Nature* 418: 430-434 (2002)；Gitlin等人，*J. Virol.* 79:1027-1035 (2005)；Kahana等人，*J. Gen. Virol.* 85, 3213-3217 (2004)；Kronke等人，*J. Virol.* 78: 3436-3446 (2004)；Leonard等人，*J. Virol.* 79:1645-1654 (2005)；及Yokota等人，*EMBO Rep.* 4: 602-608 (2003)。

核糖核酸酶為能夠(例如，藉由打斷或形成共價鍵)執行生物催化作用的RNA片段。更特定言之，核糖核酸酶為藉由與靶RNA部分結合起作用且藉由在特定切割位點裂解磷酸二酯骨架而使其失活的反義RNA分子。可將該等基於核酸之物質引入宿主細胞或組織中且用於抑制突變型Ras蛋白之表現及/或功能。

根據本發明，重組核酸分子包含重組載體及所關注之核酸序列。重組載體為一種工程化(亦即，人工產生的)核酸分子，其用作操作所選核酸序列及將該核酸序列引入宿主

細胞內的工具。因此重組載體適用於選殖、定序及/或另外操作所選核酸序列，諸如藉由在宿主細胞內表現所選核酸序列及/或將所選核酸序列傳遞入宿主細胞內以形成重組細胞。儘管該載體亦可含有天然鄰接本發明之核酸分子存在或適用於表現本發明之核酸分子的調節核酸序列(例如，啟動子、非轉譯區)，但該載體通常含有異源核酸序列，亦即，並不天然鄰接欲選殖或傳遞之核酸序列存在的核酸序列(下文中詳述)。該載體可為RNA或DNA、原核的或真核的，且通常為質體。該載體可作為染色體外元件(例如，質體)維持，或其可整合入重組有機體(例如，微生物或植物)之染色體中。完整載體可保持於宿主細胞內適當處，或在某些條件下，可刪除質體DNA，留下本發明之核酸分子。所整合之核酸分子可受染色體啟動子控制、受天然或質體啟動子控制或受若干啟動子組合控制。可將單複本或多複本之核酸分子整合入染色體內。本發明之重組載體可含有至少一個選擇標記。

在一實施例中，用於本發明之重組核酸分子中的重組載體為表現載體。如本文中所用，短語"表現載體"係用於指適於產生所編碼產物(例如，所關注之蛋白質)的載體。在該實施例中，將編碼欲製備之產物的核酸序列插入重組載體中以製備重組核酸分子。編碼欲製備之蛋白質的核酸序列係以使核酸序列與載體中能夠在重組宿主細胞內轉錄及轉譯核酸序列之調節序列操作性連接的方式插入載體中。

在另一實施例中，用於本發明之重組核酸分子中的重組

載體為靶向載體。如本文中所使用，短語"靶向載體"係用於指一種用於將特定核酸分子傳遞入重組宿主細胞內的載體，其中該核酸分子可用於使宿主細胞內之內源基因或基因之部分缺失、失活或置換(亦即，用於靶基因破壞或敲除技術)。該載體可能在此項技術中亦為已知的，在一態樣中，稱為"敲除"載體。在該實施例之一態樣中，該載體之一部分，但更通常為，插入該載體中的核酸分子(亦即，插入物)具有與宿主細胞中靶基因(亦即，靶向缺失或失活的基因)之核酸序列同源的核酸序列。載體插入物之核酸序列經設計與靶基因結合以使得靶基因及插入物可經歷同源重組，由此使內源靶基因缺失、失活、衰減(亦即，使內源靶基因之至少一部分突變或缺失)或置換。

通常，重組核酸分子包括至少一個與一或多個表現控制序列操作性連接之本發明之核酸分子。根據本發明，短語"操作性連接"係指使核酸分子與表現控制序列(例如，轉錄控制序列及/或轉譯控制序列)以使得該分子當轉染(亦即，轉化、轉導、轉染、接合或導入)至宿主細胞內時可得以表現之方式連接。轉錄控制序列為控制轉錄起始、延伸或終止的序列。尤其重要之轉錄控制序列為控制轉錄起始的彼等序列，諸如啟動子序列、強化子序列、操縱子序列及抑制物序列。適當轉錄控制序列包括可在重組核酸分子欲導入之宿主細胞或有機體中起作用的任何轉錄控制序列。

本發明之重組核酸分子亦可含有其他調節序列，諸如轉譯調節序列、複製起點及與重組細胞相容的其他調節序

列。在一實施例中，本發明之重組分子(包括整合入宿主細胞染色體中的彼等分子)亦含有分泌信號(亦即，信號片段核酸序列)以使所表現之蛋白質能夠自產生該蛋白質之細胞中分泌。根據本發明，適當信號片段包括與欲表現之蛋白質天然結合的信號片段或能夠引導蛋白質分泌的任何異源信號片段。在另一實施例中，本發明之重組分子包含使所表現之蛋白質能夠被傳遞至且插入宿主細胞膜內的前導序列。適當前導序列包括與該蛋白質天然結合的前導序列，或能夠引導該蛋白質傳遞至且插入細胞膜內的任何異源前導序列。

根據本發明，術語"轉染"係用於指可將外源核酸分子(亦即，重組核酸分子)插入細胞中的任何方法。當術語"轉化"係用於指將核酸分子引入微生物細胞(諸如細菌及酵母)內或引入植物細胞內時，該術語可與術語"轉染"互換使用。在微生物及植物系統中，術語"轉化"係用於描述因微生物或植物獲得外源核酸而導致之遺傳改變，且大體上與術語"轉染"同義。然而，在動物細胞中，轉化獲得第二種含義，此含義可指例如細胞癌變之後在培養物中生長特性之改變。因此，為避免混淆，術語"轉染"較佳係在論及將外源核酸引入動物細胞內時使用，且本文中所使用之術語"轉染"一般涵蓋轉染動物細胞及轉化微生物細胞或植物細胞，從而使得該等術語與將外源核酸引入細胞內有關。因此，轉染技術包括(但不限於)：轉化、粒子轟擊、擴散、主動輸送、浴式超音波處理、電穿孔、微量注射、脂質轉

染、吸附、感染及原生質體融合。

如本文中所使用，雜交條件係指使用核酸分子鑑別類似核酸分子所處的標準雜交條件。該等標準條件揭示於例如 Sambrook 等人，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989。Sambrook 等人(同上)以引用方式全文併入本文中(尤其參見第 9.31-9.62 頁)。此外，計算適當雜交及洗滌條件以完成容許核苷酸不同程度錯配之雜交的公式揭示於例如 Meinkoth 等人，1984, *Anal. Biochem.* 138, 267-284 中；Meinkoth 等人(同上)以引用方式全文併入本文中。

如本文中所指的低嚴謹雜交及洗滌條件係指容許分離與在雜交反應中用於探查之核酸分子具有至少約 70% 之核酸序列一致性之核酸分子的條件(亦即，容許約 30% 或 30% 以下核苷酸錯配的條件)。如本文中所指的中度嚴謹雜交及洗滌條件係指容許分離與在雜交反應中用於探查之核酸分子具有至少約 80% 之核酸序列一致性之核酸分子的條件(亦即，容許約 20% 或 20% 以下核苷酸錯配的條件)。如本文中所指的高嚴謹雜交及洗滌條件係指容許分離與在雜交反應中用於探查之核酸分子具有至少約 90% 之核酸序列一致性之核酸分子的條件(亦即，容許約 10% 或 10% 以下核苷酸錯配的條件)。如本文中所指的極高嚴謹雜交及洗滌條件係指容許分離與在雜交反應中用於探查之核酸分子具有至少約 95% 之核酸序列一致性之核酸分子的條件(亦即，容許約 5% 或 5% 以下核苷酸錯配的條件)。熟習此項技術者可利用

Meinkoth等人(同上)之公式計算適於完成該等特定程度核苷酸錯配的雜交及洗滌條件。該等條件將視形成DNA:RNA雜交物還是DNA:DNA雜交物而改變。所計算的熔化溫度，DNA:DNA雜交物比DNA:RNA雜交物小10EC。在特定實施例中，用於DNA:DNA雜交物的嚴謹雜交條件包括在適當洗滌條件下、在約20EC與約35EC之間(較低嚴謹度)、更佳在約28EC與約40EC之間(較高嚴謹度)且甚至更佳在約35EC與約45EC之間(甚至更高嚴謹度)之溫度下、在6X SSC (0.9 M Na⁺)之離子濃度下雜交。在特定實施例中，用於DNA:RNA雜交物的嚴謹雜交條件包括在類似嚴謹洗滌條件下、在約30EC與約45EC之間、更佳在約38EC與約50EC之間且甚至更佳在約45EC與約55EC之間之溫度下、在6X SSC (0.9 M Na⁺)之離子濃度下雜交。該等數值係基於對大於約100個核苷酸之分子、0%甲醯胺及約40%之G + C含量之熔化溫度的計算。或者，T_m可如Sambrook等人，同上，第9.31至9.62頁中所述憑經驗計算。一般而言，洗滌條件應盡可能嚴謹，且應適於所選雜交條件。舉例而言，雜交條件可包括鹽條件與比所計算之特定雜交物之T_m低約20-25EC之溫度條件的組合，且洗滌條件通常包括鹽條件與比所計算之特定雜交物之T_m低約12-20EC之溫度條件的組合。適用於DNA:DNA雜交物之雜交條件之一實例包括在約42EC下、在6X SSC (50%甲醯胺)中雜交2-24小時，繼而為包括在室溫下、在約2X SSC中洗滌一或多次的洗滌步驟，繼而在更高溫度及更低離子濃度下再洗滌

(例如，在約37EC、在約0.1X-0.5X SSC中洗滌至少一次，繼而在約68EC、在約0.1X-0.5X SSC中洗滌至少一次)。

本發明中提及分離蛋白質或多肽包括全長蛋白質、融合蛋白質或該等蛋白質之任何片段、域、構形抗原決定基或同源物。更特定言之，根據本發明，分離蛋白質為已自其天然環境中移出的蛋白質(包括多肽或肽)(亦即，已經受人類處理)，且可包括例如純化蛋白質、部分純化蛋白質、重組製備之蛋白質及合成製備之蛋白質。因而，"分離"並不反映蛋白質純化的程度。

如本文中所使用，術語"同源物"係用於指一種蛋白質或肽，其與天然存在之蛋白質或肽(亦即，"原型"或"野生型"蛋白質)不同處在於對天然存在之蛋白質或肽加以一或多處稍許修飾或突變，但仍維持其天然存在之形式之總體基本蛋白質及側鏈結構(亦即，以使得同源物因與野生型蛋白質相關而可鑑別)。該等改變包括(但不限於)：一或幾條胺基酸側鏈改變；一或幾個胺基酸改變，包括缺失(例如，蛋白質或肽之截短型式)、插入及/或取代；一或幾個原子之立體化學改變；及/或稍許衍生化，包括(但不限於)：甲基化、法呢基化(farnesylation)、香葉草基香葉草基化(geranyl geranylation)、糖基化、羧甲基化、磷酸化、乙醯化、豆蔻醯化、異戊烯化、棕櫚醯化及/或醯胺化。同源物可包括蛋白質之促效劑或蛋白質之拮抗劑。同源物與天然存在之蛋白質或肽相比可具有增強、減弱、改變或大體上類似之特性。應注意，同源物可包括合成製備

的同源物、給定蛋白質或域之天然存在之等位基因變異體，或來自除參考序列所來源之有機體以外之有機體的同源序列。同源物可為天然等位基因變異或自然突變的結果。同源物可利用此項技術中已知之用於製備蛋白質的技術製備，該等技術包括(但不限於)：將改造引入經分離或合成之天然存在之蛋白質、指導蛋白質合成，或利用例如典型或重組DNA技術將改造引入編碼該蛋白質之核酸序列中，以實現隨機誘變或靶向誘變。

給定蛋白質之同源物可包含以下胺基酸序列、大體上由以下胺基酸序列組成或由以下胺基酸序列組成：與參考蛋白質之胺基酸序列具有至少約45%一致性或至少約50%一致性或至少約55%一致性或至少約60%一致性或至少約65%一致性或至少約70%一致性或至少約75%一致性或至少約80%一致性或至少約85%一致性或至少約90%一致性或至少約95%一致性或至少約95%一致性或至少約96%一致性或至少約97%一致性或至少約98%一致性或至少約99%一致性(或45%與99%之間的任何一致性百分比，增量為整數)的胺基酸序列。在一實施例中，該同源物包含以下胺基酸序列、大體上由以下胺基酸序列組成或由以下胺基酸序列組成：與參考蛋白質之天然存在之胺基酸序列具有低於100%之一致性、低於約99%之一致性、低於約98%之一致性、低於約97%之一致性、低於約96%之一致性、低於約95%之一致性等(增量為1%)直至低於約70%之一致性的胺基酸序列。

除非另有說明，否則如本文中所使用，提及一致性百分比(%)係指利用以下程式進行的同源性評估：(1)具有標準預設參數之BLAST 2.0 Basic BLAST同源性搜尋，其使用blastp用於胺基酸搜尋且使用blastn用於核酸搜尋，其中將詢問序列之低複雜性區由預設過濾(描述於Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res. 25:3389-3402中，該文獻以引用方式全文併入本文中)；(2)BLAST 2比對(使用下述參數)；(3)及/或具有標準預設參數之PSI-BLAST (位置特異性疊代BLAST)。應注意，由於BLAST 2.0 Basic BLAST與BLAST 2之間標準參數的一些差異，因此利用BLAST 2程式可認定兩種特定序列具有顯著同源性，而利用其中一序列作為詢問序列、以BLAST 2.0 Basic BLAST執行搜尋可能不能鑑別具有最高匹配度的第二序列。此外，PSI-BLAST可提供自動使用型"概況"搜尋，其為尋找序列同源物的敏感方式。該程式首先執行空位BLAST資料庫搜尋。PSI-BLAST程式使用所返回之任何顯著比對資訊建構位置特異性記分矩陣，其置換詢問序列用於下一輪資料庫搜尋。因此，應瞭解，一致性百分比可利用該等任一種程式來判定。

兩種特定序列可利用以下文獻中所述之BLAST 2序列彼此比對(aligned)：Tatusova及Madden, (1999), "Blast 2 sequences-a new tool for comparing protein and nucleotide

sequences", *FEMS Microbiol Lett.* 174:247-250, 該文獻全文併入本文中供參考。BLAST 2序列比對(alignment)係利用BLAST 2.0演算法以blastp或blastn執行, 以在該兩種序列之間執行空位BLAST搜尋(BLAST 2.0), 可將空隙(缺失及插入)引入所得比對中。為使本文清晰, 利用如下標準預設(default)參數執行BLAST 2序列比對。

對於blastn, 利用 0 BLOSUM62矩陣:

匹配加分=1

錯配扣分=-2

開放空隙(5)及延長空隙(2)扣分

空隙x退出(50)預期(10)字碼(11)過濾(開)

對於blastp, 利用 0 BLOSUM62矩陣:

開放空隙(11)及延長空隙(1)扣分

空隙x退出(50)預期(10)字碼(3)過濾(開)。

根據本發明, 術語"修飾"及"突變"可互換使用, 尤其論及本文中所述之蛋白質或肽之初級胺基酸序列(或核酸序列)之修飾/突變。術語"修飾"亦可用於描述對蛋白質或肽之轉譯後修飾, 或例如, 使蛋白質或肽與另一化合物複合, 或拴住該蛋白質, 諸如以一個甘油磷脂醯肌醇(GPI)錨。舉例而言, 若修飾與存在於天然野生型蛋白質或肽中的轉譯後修飾不同, 則該等修飾可視為突變。

保守性取代通常包括以下群內之取代: 甘胺酸及丙胺酸; 纈胺酸、異白胺酸及白胺酸; 天冬胺酸、麩胺酸、天冬醯胺酸及麩醯胺酸; 絲胺酸及蘇胺酸; 離胺酸及精胺

酸；以及苯丙胺酸及酪胺酸。取代亦可基於保守之疏水性或親水性 (Kyte 及 Doolittle, J. Mol. Biol. 157:105 (1982))，或可基於呈現類似多肽二級結構 (Chou 及 Fasman, Adv. Enzymol. 47: 45 (1978)) 或三級或四級結構之能力而進行。

本文中一般使用術語"抗原"係指：蛋白質之任何部分(肽、部分蛋白質、全長蛋白質)，其中該蛋白質天然存在或合成而得；融合蛋白或嵌合蛋白；細胞組合物(完整細胞、細胞溶胞物或破裂之細胞)；有機體(完整有機體、溶胞物或破裂之細胞)；碳水化合物(諸如表現於癌細胞上的彼等物質)；或另一分子，或其任何部分。抗原引起針對在該抗原所投與之個體之細胞及組織內所遇到之相同或類似抗原的抗原特異性免疫反應(例如，體液及/或細胞介導免疫反應)。或者，抗原可充當耐受原。

當提及激發免疫反應時，術語"抗原"可與術語"免疫原"互換使用。如本文中所使用之免疫原係描述一種引起體液及/或細胞介導免疫反應，以使得向一動物投與免疫原(例如，經由本發明之疫苗)可建立針對在該動物之組織內所遇到之相同或類似抗原的抗原特異性免疫反應的抗原。

"耐受原"係用於描述一種抗原，其以使得對該抗原之免疫反應減少或改變的形式、量或投藥途徑提供，且較佳為以免疫系統細胞之大體無響應、無反應性、其他失活或缺失作為對與耐受原或表現或呈遞該耐受原之細胞接觸之回應。

"疫苗接種抗原"不僅可為免疫原或耐受原，而且可為用於疫苗(預防性或治療性)中的抗原，其中生物反應(引起免疫反應、耐受性)係針對疫苗接種抗原而引起。

給定抗原之"免疫原域"可為含有至少一種當投與至動物時充當免疫原之抗原決定基之抗原的任何部分、片段或抗原決定基(例如，肽片段或次單位或抗體抗原決定基或其他構形抗原決定基)。舉例而言，單個蛋白質可含有多個不同免疫原域。免疫原域無需為蛋白質內之線性序列，諸如在體液免疫反應之情形下。

在本文中，抗原決定基定義為給定抗原內足以引起免疫反應的單個免疫原位點，或給定抗原內足以抑制、缺失免疫反應或導致免疫反應無活性的單個耐受原位點。熟習此項技術者應瞭解，T細胞抗原決定基在大小及組成上均與B細胞抗原決定基不同，且經由I類MHC通道呈遞的抗原決定基不同於經由II類MHC通道呈遞的抗原決定基。抗原決定基可為線性序列或構形抗原決定基(保守結合區)。抗原可小至單個抗原決定基，或較大，且可包括多個抗原決定基。因而，抗原之大小可小至約5-12個胺基酸(例如，肽)，且可大至包括多聚體及融合蛋白之全長蛋白質、嵌合蛋白、完整細胞、完整微生物或其部分(例如，完整細胞之溶胞物或微生物之提取物)。

"疫苗接種"或"免疫"係指由於單獨或連同佐劑投與抗原而引起(誘發)針對抗原或其免疫原或耐受原部分的免疫反應。疫苗接種較佳產生保護或治療效應，其中隨後暴露於

抗原(或抗原之來源)可引起針對該抗原(或來源)的免疫反應，該反應減少或預防動物之疾病或病狀。疫苗接種概念於此項技術中已熟知。藉由投與本發明之組合物(疫苗)引起之免疫反應可為與不投與該組合物相比免疫反應任一方面(例如，細胞介導反應、體液反應、細胞激素產生)之任何可偵測改變。

Tarmogen (靶向分子免疫原)通常係指一種酵母媒介，其細胞外(在其表面或作為分泌抗原)、細胞內(內部或胞內)或者細胞外與細胞內表現一或多種異源抗原。Tarmogen在此項技術中通常已有描述。參見，例如，美國專利第5,830,463號。

根據本發明，"異源胺基酸"為一種胺基酸序列，其並非天然存在(亦即，非活體內天然存在)側接於特定胺基酸序列，或者與特定胺基酸序列之功能無關，或者若對於給定胺基酸序列所來源之有機體，天然存在之序列中編碼特定胺基酸序列的天然存在之核苷酸係利用標準密碼子使用率轉譯，則其不由側接編碼該特定胺基酸序列之天然存在之核酸序列(當其存在於基因中時)的核苷酸編碼。因此，至少兩個與抗原異源的胺基酸殘基為任何兩個非天然存在側接於抗原的胺基酸殘基。

根據本發明，聯繫本發明之酵母媒介提及"異源"蛋白質或"異源"抗原(包括異源融合蛋白)係意謂，該蛋白質或抗原不為由酵母天然表現的蛋白質或抗原，儘管融合蛋白可包括由酵母天然表現的酵母序列或蛋白質或其部分(例

如，如本文中所述之Aga蛋白)。舉例而言，腫瘤細胞Ras蛋白與酵母Aga蛋白之融合蛋白相對於用於本發明之目的之酵母媒介可視為異源蛋白，因為該融合蛋白並非由酵母天然表現。

本文中所述之任一胺基酸序列可經由在特定胺基酸序列之C-末端及/或N-末端各側接至少一個且至多約20個其他異源胺基酸來產生。所得蛋白質或多肽可稱為"大體上由特定胺基酸序列組成"。異源胺基酸為一種胺基酸序列，其並不天然存在(亦即，非活體內天然存在)側接於特定胺基酸序列，或者與特定胺基酸序列之功能無關，或者若對於給定胺基酸序列所來源之有機體，天然存在之序列中側接編碼特定胺基酸序列(當其存在於基因中時)之天然存在之核酸序列的核苷酸係利用標準密碼子使用率轉譯，則其不由該等核苷酸編碼。類似地，當在本文中提及核酸序列時使用時，短語"大體上由.....組成"係指編碼特定胺基酸序列的核酸序列，編碼該特定胺基酸序列之核酸序列之5'端及/或3'端可各由至少一個且至多高達約60個其他異源核苷酸側接。異源核苷酸並非天然存在(亦即，非活體內天然存在)側接編碼特定胺基酸序列之核酸序列(當其存在於天然基因中時)，或不編碼賦予任何其他功能至蛋白質或改變具有特定胺基酸序列之蛋白質之功能的蛋白質。

根據本發明，短語"選擇性結合"係指本發明之抗體、抗原結合片段或結合搭配物優先結合特定蛋白質之能力。更特定言之，短語"選擇性結合"係指一種蛋白質與另一種蛋

白質(例如，針對抗原之抗體、其片段或結合搭配物)之特異性結合，其中如由任何標準檢定法(例如，免疫檢定)所量測的結合量在統計學上顯著高於該檢定之本底對照。舉例而言，當執行免疫檢定時，對照物通常包括含有單獨抗體或抗原結合片段(亦即，不存在抗原)的反應孔/管，其中將抗原不存在之情況下抗體或其抗原結合片段之反應量(例如，與孔非特異性結合)視為本底。結合可利用此項技術中的多種標準方法(包括酶免疫檢定(例如ELISA)、免疫印跡檢定等)量測。

術語"疾病"係指與一動物之正常健康狀況的任何偏離，且包括疾病症狀存在時的狀態，以及其中偏離(例如，感染、基因突變、遺傳缺陷等)已發生、但尚未顯現症狀時的病狀。

"個體"為脊椎動物，較佳為哺乳動物，更佳為人類。哺乳動物包括(但不限於)農畜、運動型動物、寵物、靈長類動物、小鼠及大鼠。術語"個體"可與術語"動物"、"受檢者"或"患者"互換使用。

儘管以下對本發明之態樣的描述係尤其關於在密碼子76處所鑑別的Ras突變及/或包括密碼子76處突變之Ras突變之組合加以描述，但下文中本發明之所有態樣亦可適用於在位置73、74、75、77或78中任一處或多處具有突變的Ras，或適用於包括上述Ras突變之任一組合且尤其位置12及/或13處突變與位置59、61、73、74、75、76、77及/或78處突變之任一組合的Ras。

本發明之核酸分子及蛋白質

根據本發明，適用於本發明之各種態樣中的Ras蛋白或編碼Ras之核酸分子可包括野生型或突變體Ras蛋白或其一或多個部分(例如，適用於任何研究、診斷、篩檢或治療方法中的域或其部分)，以及編碼該等蛋白質或其部分(例如，適用於任何研究、診斷、篩檢或治療方法中的域或其部分)的核酸('有義')分子，或核酸中與該等域或蛋白質的雜交('反義')股。本發明尤其係關於突變體Ras蛋白及編碼該等蛋白質或其片段的核酸分子，其中突變體Ras蛋白或其片段的胺基酸序列含有包括位置76的序列，其中在位置76處存在突變，且特定言之，其中在該位置處天然存在的麩胺酸經非麩胺酸胺基酸取代。根據本發明，提及"非麩胺酸"胺基酸係指通常存在於蛋白質中之其他20種胺基酸中任一種之取代，其已為熟習此項技術者所熟知。儘管本發明明確涵蓋該位置處之其他取代(包括任何其他非麩胺酸胺基酸)，但在尤其較佳實施例中，非麩胺酸胺基酸為甘胺酸(E76G)、離胺酸(E76K)或麩醯胺酸(E76Q)。

編碼Ras之核酸分子可包括或源自所有或一部分選自K-ras、N-ras或H-ras基因之ras基因。在一態樣中，編碼Ras之核酸分子編碼在位置76處具有單突變的Ras蛋白。在另一態樣中，編碼Ras之核酸分子編碼包含除位置76處突變之外亦包含一或多個其他突變，包括(但不限於)位置12、13、59及/或61處之突變的Ras蛋白，該等位置與野生型K-Ras、H-Ras或N-Ras胺基酸序列相關。在其他實施例中，Ras之

其他各種突變體及編碼該等突變體之核酸分子適用於本發明(包括包含相對於野生型Ras胺基酸序列在位置12、13、59及/或61處之突變的突變體Ras)，且可與Ras之單獨E76蛋白或肽突變體組合或與編碼該突變體之單獨核酸分子組合。在一些實施例中，編碼Ras之核酸分子編碼在位置73、74、75、77或78處具有單突變的Ras蛋白。在一些實施例中，編碼Ras之核酸分子編碼包含位置12、13、59、61、73、74、75、76、77或78處之兩處或兩處以上突變之任何組合，較佳為位置12或位置13處之至少一個突變與位置59、61、73、74、75、76、77或78處之至少一個突變的組合。又，所有位置均與野生型K-Ras、H-Ras或N-Ras胺基酸序列相關。

在另一態樣中，適用於本發明之Ras蛋白(其可由適用於本發明之編碼Ras蛋白的核酸分子編碼)包括相對於野生型Ras胺基酸序列含有胺基酸位置12、13、59、61、73、74、75、76、77及/或78之Ras蛋白中之至少(但不限於)介於5個與17個之間或5個與50個之間或50個以上(5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50等)的連續胺基酸殘基，其中位置12、13、59、61、73、74、75、76、77及/或78處之胺基酸殘基相對於野生型Ras序列係經突變，較佳為經除Ras之野生型或非致瘤形式中之該位置處存在之胺基酸以外的

胺基酸取代。通常，Ras蛋白具有全長野生型或突變型*ras*蛋白之最大長度，在本文中所述之SEQ ID NO:2-13之情形下，最大長度範圍為188至189至193，儘管Ras蛋白之最大大小不限於該等長度。

在一實施例中，Ras蛋白之較佳片段包括側接於位置12、13、59、61、73、74、75、76、77及/或78處突變任一側之天然Ras胺基酸序列(野生型序列或與細胞之非致瘤Ras關聯的序列)中介於約5與9個胺基酸之間的片段(例如，Ras中包含位置76之任一側與五個胺基酸側接之位置76處胺基酸之11個胺基酸長的片段，其中位置76處之胺基酸相對於野生型非致瘤Ras係經突變；或Ras中包含位置76之任一側與八個胺基酸側接之位置76處胺基酸之17個胺基酸長的片段，其中位置76處之胺基酸相對於野生型Ras序列係經突變)。在一實施例中，適用於本發明之Ras包括至少5個連續胺基酸或至少10個連續胺基酸或至少15個連續胺基酸或至少20個連續胺基酸或至少25個連續胺基酸或至少30個連續胺基酸或至少35個連續胺基酸或至少40個連續胺基酸或至少50個連續胺基酸或至少60個連續胺基酸或至少75個連續胺基酸或至少100個連續胺基酸或至少125個連續胺基酸或至少150個連續胺基酸或至少175個連續胺基酸之片段，以及至多全長大小之Ras蛋白，包括任何插入大小為至少5個胺基酸、增量為整數(5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20...39、40、41...46、47、48...等)之Ras片段。在一實施例中，該等相

同或不同長度之具有相同或不同突變的若干片段可組合於單個嵌合蛋白中。該等蛋白質之實例描述於實例中。

較佳地，編碼突變體Ras蛋白或肽的核酸分子片段具有足以充當用於鑑別或擴增具有該相同突變或該等相同突變之Ras核酸分子(例如，Ras基因或Ras RNA分子)之引子或探針的大小。舉例而言，Ras蛋白或肽之片段較佳具有至少足以充當T細胞抗原決定基(在I類或II類MHC之情形下)或充當抗體抗原決定基的大小，儘管在一些實施例中，具有其他功能特性的Ras蛋白可為適用的，諸如與GTP結合的Ras蛋白、可誘發與基因表現相關之細胞信號轉導、細胞增殖及/或運動性的Ras蛋白或可在檢定中充當標靶的Ras蛋白。因此，該片段(核酸或蛋白質)分別包含足以適用於該等目的及本文中所述之任一研究、診斷、篩檢或治療性組合物或方法或用途中、側接特定突變位點的天然存在之Ras核苷酸或胺基酸序列。

本文中就野生型Ras蛋白而言提及之位置一般係指哺乳動物野生型Ras蛋白中之位置或至少與人類或鼠K-Ras、H-Ras或N-Ras中之位置有關。應注意，由於人類與小鼠胺基酸序列在蛋白質之該區域內相同且由於K-Ras、H-Ras及N-Ras在該區域內相同，因此以上所提及之位置亦與人類或鼠K-Ras、H-Ras或N-Ras之任何序列相對應。對於其他動物物種中可能不同的胺基酸序列，熟習此項技術者容易藉由諸如與人類或鼠序列簡單比對而能判定相應序列位置。該片段可為任何長度，自Ras蛋白之至少約5個連續胺基酸殘基直至

Ras蛋白之全長，其中增量為整數(例如，5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20...45、46、47等)。

多種Ras家族成員之核苷酸及胺基酸序列在此項技術中為熟知的。SEQ ID NO:2為編碼人類K-ras的核酸序列(亦以GenBank寄存編號第NM_033360號獲知)。SEQ ID NO:2編碼人類K-ras(本文中表示為SEQ ID NO:3)。SEQ ID NO:4為編碼鼠K-ras的核酸序列(亦以GenBank寄存編號第NM_021284號獲知)。SEQ ID NO:4編碼鼠K-ras(本文中表示為SEQ ID NO:5)。SEQ ID NO:6為編碼人類H-ras的核酸序列(亦以GenBank寄存編號第NM_005343號獲知)。SEQ ID NO:6編碼人類H-ras(本文中表示為SEQ ID NO:7)。SEQ ID NO:8為編碼鼠H-ras的核酸序列(亦以GenBank寄存編號第NM_008284號獲知)。SEQ ID NO:8編碼鼠H-ras(本文中表示為SEQ ID NO:9)。SEQ ID NO:10為編碼人類N-ras的核酸序列(亦以GenBank寄存編號第NM_002524號獲知)。SEQ ID NO:10編碼人類N-ras(本文中表示為SEQ ID NO:11)。SEQ ID NO:12為編碼鼠N-ras的核酸序列(亦以GenBank寄存編號第NM_010937號獲知)。SEQ ID NO:12編碼人類N-ras(本文中表示為SEQ ID NO:13)。SEQ ID NO:2-13表示"野生型"Ras序列。

如上所述，Ras為其中若干突變已知發生於特定位置處且與一或多種類型癌症之形成有關的致癌基因實例。本發明報導先前尚未獲知或未曾描述之Ras新突變之發現，以

及該突變與已知突變之組合，該組合協同作用以顯著增強含有該突變組合之腫瘤的致癌性。因此，可建構適用於本發明之融合蛋白(於下文更詳細描述)，其包含以下肽或大體上由以下肽組成或由以下肽組成：含有該突變型殘基以及已知在某些癌症中突變之其他特定殘基的肽，其中各域在彼位點含有不同突變及/或在不同位點含有突變，以在彼位點或在該蛋白質中包含若干或全部已知突變。舉例而言，對於Ras，可提供兩個或兩個以上在位置76任一側且包括在位置76處包含至少4個胺基酸(但不限於4個胺基酸，如可包括較短段或較長側接胺基酸之延長)的免疫原域，其中各域具有不同針對通常存在於非突變型Ras蛋白中位置76處之麩胺酸的取代。此位置處取代中之一者較佳為甘胺酸取代、離胺酸取代或麩醯胺酸取代。在一實例中，該蛋白質或肽包含含有相對於野生型Ras蛋白的胺基酸位置12、13、59、61、73、74、75、76、77及/或78之至少5-9個連續野生型Ras蛋白之胺基酸殘基之片段及直至整個Ras蛋白(增量為整數)，其中位置12、13、59、61、73、74、75、76、77及/或78處之胺基酸殘基相對於野生型Ras蛋白係經突變。較佳地，該蛋白質或肽包含至少一個位於位置76處之突變，且更佳地，該突變為甘胺酸、離胺酸或麩醯胺酸取代通常位於彼位置處的麩胺酸。

在一態樣中，適用於本發明之融合蛋白構築體由至少一個與另一突變型腫瘤抗原同框融合之肽組成，其中該肽係選自由以下肽組成之群：(a)包含SEQ ID NO:3中之至少位

置4-20或至少位置8-16的肽(或兩者之間任一大小或更大的肽)，其中相對於SEQ ID NO:3之位置12處的胺基酸殘基與SEQ ID NO:3相比係經突變；(b)包含SEQ ID NO:3中之至少位置5-21或至少位置9-17的肽(或兩者之間任一大小或更大的肽)，其中相對於SEQ ID NO:3之位置13處的胺基酸殘基與SEQ ID NO:3相比係經突變；(c)包含SEQ ID NO:3中之至少位置51-67或至少位置55-63的肽(或兩者之間任一大小或更大的肽)，其中相對於SEQ ID NO:3之位置59處的胺基酸殘基與SEQ ID NO:3相比係經突變；(d)包含SEQ ID NO:3中之至少位置53-69或至少位置57-65的肽(或兩者之間任一大小或更大的肽)，其中相對於SEQ ID NO:3之位置61處的胺基酸殘基與SEQ ID NO:3相比係經突變；(e)包含SEQ ID NO:3中之至少位置65-81或至少位置69-77的肽(或兩者之間任一大小或更大的肽)，其中相對於SEQ ID NO:3之位置73處的胺基酸殘基與SEQ ID NO:3相比係經突變；(f)包含SEQ ID NO:3中之至少位置66-82或至少位置70-78的肽(或兩者之間任一大小或更大的肽)，其中相對於SEQ ID NO:3之位置74處的胺基酸殘基與SEQ ID NO:3相比係經突變；(g)包含SEQ ID NO:3中之至少位置67-83或至少位置71-79的肽(或兩者之間任一大小或更大的肽)，其中相對於SEQ ID NO:3之位置75處的胺基酸殘基與SEQ ID NO:3相比係經突變；(h)包含SEQ ID NO:3中之至少位置69-84或至少位置73-81的肽(或兩者之間任一大小或更大的肽)，其中相對於SEQ ID NO:3之位置77處的胺基酸殘基與SEQ ID

NO:3相比係經突變；(i)包含SEQ ID NO:3中之至少位置70-85或至少位置74-82的肽(或兩者之間任一大小或更大的肽)，其中相對於SEQ ID NO:3之位置78處的胺基酸殘基與SEQ ID NO:3相比係經突變；及/或最佳實施例為(j)包含SEQ ID NO:3中之至少位置68-84或至少位置72-80的肽(或兩者之間任一大小或更大的肽)，其中相對於SEQ ID NO:3之位置76處的胺基酸殘基與SEQ ID NO:3相比係經突變。應注意，由於人類及小鼠胺基酸序列在蛋白質之該區域內相同且由於K-Ras、H-Ras及N-Ras蛋白在該區域內相同，因此該等位置亦與SEQ ID NO: 5、7、9、11或13中之任一者相對應。該等片段不限於彼等上述例示性片段，只要該片段長度至少為約5個胺基酸，包括所要突變且適用於如本文中所述之研究、診斷、篩檢或治療方法或由適用於如本文中所述之研究、診斷、篩檢或治療方法之核酸分子編碼。

在一實施例中，適用於本發明之融合蛋白構築體包含本文中表示為SEQ ID NO:14的融合蛋白。在另一實施例中，適用於本發明之融合蛋白構築體包含本文中表示為SEQ ID NO:15的融合蛋白。

因此，本發明包括編碼編碼本文中所述之任一Ras蛋白或其片段之核酸分子、與該核酸分子雜交或為該核酸分子之互補序列的任一核酸分子，且包括編碼本文中所述之任一融合蛋白的核酸分子。本發明亦包括基於本發明之核酸序列的反義RNA及DNA分子、基於本發明之核酸序列的核

糖核酸酶、基於本發明之核酸序列的RNAi及/或基於本發明之三級Ras蛋白結構的適體，其可由此項技術中已知的任何方法製備。該等方法包括此項技術中熟知的化學合成聚核苷酸技術，諸如固相胺基磷酸酯化學合成法。或者，RNA分子可藉由活體外及活體內轉錄編碼反義RNA分子之DNA序列來產生。該等DNA序列可併入多種載體中，該等載體可併有適當RNA聚合酶啟動子，諸如T7或SP6聚合酶啟動子。視所用啟動子而定，組成性或誘導性合成反義RNA的反義cDNA結構可穩定引入宿主細胞內。該等基於核酸之物質可引入宿主細胞或組織中且用於抑制突變型Ras蛋白之表現及/或功能。

本發明之另一實施例包括一種重組核酸分子，該分子包含重組載體及源自*ras*基因及/或編碼本文所述之Ras蛋白或肽或其片段的核酸序列。通常，重組核酸分子包括至少一個與一或多個表現控制序列操作性連接之本發明之核酸分子。可用於本發明之重組載體的各種類型已於上文描述。

本發明之一或多種重組分子可用於製備所編碼產物(例如，突變型Ras蛋白或其部分)。在一實施例中，所編碼產物係藉由在有效製備該蛋白質的條件下表現如本文所述之核酸分子來製備。製備所編碼蛋白質之較佳方法係藉由用一或多種重組分子轉染宿主細胞以形成重組細胞。適用於轉染的宿主細胞包括(但不限於)任何可轉染的細菌細胞、真菌(例如，酵母)細胞、昆蟲細胞、植物細胞或動物細胞。宿主細胞可為未經轉染之細胞或已經至少一種其他重

組核酸分子轉染的細胞。

在本發明之一實施例中，較佳宿主細胞為酵母細胞。轉化入本發明之酵母媒介中的核酸分子可包括編碼一或多種蛋白質的核酸序列及/或其一或多個部分。該等核酸分子可包含部分或完整編碼區、調節區或其組合。酵母菌株之一優點為其攜帶很多核酸分子且能夠產生很多異源蛋白之能力。欲由本發明之酵母媒介產生之抗原之較佳數量為可由酵母媒介適度產生之抗原的任何數量，且範圍通常為至少一種至至少約5種或5種以上，更佳為約2種至約5種化合物。較佳酵母宿主於下文詳述。

熟習此項技術者應瞭解，利用重組DNA技術可藉由操縱例如宿主細胞內核酸分子的複本數目、轉錄彼等核酸分子的效率、轉譯所得轉錄物的效率及轉譯後修飾的效率提高對所轉染核酸分子之表現的控制。此外，可將啟動子序列經遺傳設計以增加表現量(與天然啟動子相比)。適用於控制核酸分子表現的重組技術包括(但不限於)：將核酸分子整合入一或多個宿主細胞染色體內、將載體穩定性序列添加至質體中、取代或修飾轉錄控制信號(例如，啟動子、操縱子、強化子)、取代或修飾轉譯控制信號(例如，核糖體結合位點、Kozak序列、Shine-Dalgarno序列)、修飾核酸分子以與宿主細胞之密碼子使用率對應，以及缺失使轉錄物不穩定的序列。

融合蛋白

如上所述，可建構適用於本發明之各種實施例中的融合

蛋白，包括含有至少一種在位置76處含有突變型殘基(或位置73、74、75、77或78處之突變型殘基或本文中所述之任一組合)(如上所述，位置76係相對於野生型哺乳動物且尤其人類或鼠Ras胺基酸序列表示)之Ras肽或蛋白質的融合蛋白，以及亦可包括其他在其他殘基(已知在某些癌症中係經突變)處含有突變之Ras肽或蛋白質的融合蛋白。該等融合亦可包括除Ras外的其他抗原或其部分，包括其他癌症抗原且包括與癌症有關之其他蛋白質之各種突變體。本發明亦涵蓋編碼該等融合蛋白的核酸分子。

在一態樣中，已經設計以使異源蛋白質在酵母媒介中之表現穩定及/或防止所表現之異源蛋白質轉譯後修飾的融合蛋白中可包括本發明之基於Ras之蛋白質及肽(包括不同Ras蛋白及肽與/或上述其他蛋白質及肽之組合)。該等融合蛋白一般描述於PCT公開案第WO 2004/058157 A2號中，該公開案以引用方式全文併入本文中。儘管將一或多種該等融合蛋白載入酵母媒介或以其他方式與如下所述之酵母媒介複合或混合以形成適用於本發明之疫苗或組合物為本發明之實施例，但該等融合蛋白最通常作為重組蛋白由酵母媒介(例如，由完整酵母或酵母球形質體，其視需要可進一步處理成酵母胞質體、酵母殘骸或酵母膜提取物或其部分，如下所述)表現。

適用於本發明之一該融合蛋白為包括以下各物的融合蛋白：(a)至少一種如本文中所述在位置76處包括突變的Ras抗原(包括肽或蛋白質)；及(b)合成肽。在一實施例中，適

用於本發明的融合蛋白包含本文中表示為SEQ ID NO:14的融合蛋白。在另一實施例中，適用於本發明的融合蛋白包含本文中表示為SEQ ID NO:15的融合蛋白。

在一實施例中，合成肽係與抗原之N-末端連接，該肽由至少兩個與該抗原異源的胺基酸殘基組成，其中該肽使融合蛋白在酵母媒介中之表現穩定或防止所表現之融合蛋白轉譯後修飾。合成肽與抗原之N-末端部分共同形成具有以下要求的融合蛋白：(1)融合蛋白中位置1處的胺基酸殘基為甲硫胺酸(亦即，合成肽中的第一胺基酸為甲硫胺酸)；(2)融合蛋白中位置2處的胺基酸殘基不為甘胺酸或脯胺酸(亦即，合成肽中的第二胺基酸不為甘胺酸或脯胺酸)；(3)融合蛋白中位置2-6處的胺基酸殘基均不為甲硫胺酸(亦即，若合成肽短於6個胺基酸，則無論合成肽或蛋白質之部分中位置2-6處的胺基酸均不包括甲硫胺酸)；及(4)融合蛋白中位置2-6處的胺基酸均不為離胺酸或精胺酸(亦即，若合成肽短於5個胺基酸，則無論合成肽或蛋白質之部分中位置2-6處的胺基酸均不包括離胺酸或精胺酸)。合成肽可短至兩個胺基酸，但更佳為至少2-6個胺基酸(包括3、4、5個胺基酸)，且可長於6個胺基酸直至約200個胺基酸、300個胺基酸、400個胺基酸、500個胺基酸或500個胺基酸以上(增量為整數)。

在一實施例中，融合蛋白包含胺基酸序列M-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆，其中M為甲硫胺酸；其中X₂為除甘胺酸、脯胺酸、離胺酸或精胺酸外的任何胺基酸；其中X₃為除甲硫胺

酸、離胺酸或精胺酸外的任何胺基酸；其中X₄為除甲硫胺酸、離胺酸或精胺酸外的任何胺基酸；其中X₅為除甲硫胺酸、離胺酸或精胺酸外的任何胺基酸；且其中X₆為除甲硫胺酸、離胺酸或精胺酸外的任何胺基酸。在一實施例中，X₆殘基為脯胺酸。可增強抗原在酵母細胞內表現之穩定性及/或防止蛋白質在酵母內轉譯後修飾的例示性合成序列包括序列M-A-D-E-A-P (SEQ ID NO:1)。MADEAP序列亦可用於除該抗原外之其他抗原。除表現產物之穩定性增強外，該融合搭配物似乎未對針對該構築物內之疫苗接種抗原的免疫反應產生負面影響。此外，合成融合肽可經設計以提供可由諸如抗體之選擇劑識別之抗原決定基。

在本發明之另一實施例中，根據Kozak轉譯序列規則，編碼用於本發明之合成肽之轉譯起始位點的核酸為A-C-C-A-T-G-G，其中該序列中的ATG為初始轉譯起始位點且編碼M-A-D-E-A-P (SEQ ID NO:1)中之甲硫胺酸。應瞭解，亦可將本文中所述之本發明之各種實施例加以組合。舉例而言，在本發明之一態樣中，當合成肽為MA-D-E-A-P (SEQ ID NO:1)時，編碼此肽之起始位點的核酸可為A-C-C-A-T-G-G。本發明實施例之各種其他組合對於熟習此項技術者係顯而易見的。

在本發明之一態樣中，酵母媒介經操作以使得抗原藉由將所表現之抗原產物部分地或完全地傳遞或遷移至酵母媒介表面上來表現或提供(細胞外表現)。達成本發明之此態樣的一種方法係利用間隔臂使一或多個抗原定位於酵母媒

介表面上。使用間隔臂之一方式係產生所關注之抗原與使抗原靶向酵母細胞壁之蛋白質的融合蛋白。舉例而言，一種可使用的蛋白質為能夠使抗原靶向酵母細胞壁以使得抗原定位於酵母表面上的酵母蛋白質(例如，細胞壁蛋白質2(cwp2)、Aga2、Pir4或Flo1蛋白)。除酵母蛋白質外的其他蛋白質可用於間隔臂；然而，對於任何間隔臂蛋白質而言，最需要具有針對靶抗原而非間隔臂蛋白質的免疫原反應。因而，若間隔臂使用其他蛋白質，則所用間隔臂蛋白質不應產生針對間隔臂蛋白質本身而使得針對靶抗原的免疫反應被壓倒的該廣泛免疫反應。熟習此項技術者應以針對間隔臂蛋白質之免疫反應比針對靶抗原之免疫反應小為目標。

定位靶抗原以使其暴露於酵母表面上的另一種方法係使用諸如糖基磷脂醯肌醇(GPI)之信號序列以使靶錨定於酵母細胞壁。或者，定位可藉由附加使所關注之抗原經由遷移至內質網(ER)內靶向分泌通道之信號序列以使得抗原與結合於細胞壁之蛋白質(例如，cwp)結合而達成。

在一態樣中，間隔臂蛋白質為酵母蛋白質。酵母蛋白質可由酵母蛋白質之約2個與約800個之間的胺基酸組成。在一實施例中，酵母蛋白質為約10至700個胺基酸。在另一實施例中，酵母蛋白質為約40至600個胺基酸。本發明之其他實施例包括為至少250個胺基酸、至少300個胺基酸、至少350個胺基酸、至少400個胺基酸、至少450個胺基酸、至少500個胺基酸、至少550個胺基酸、至少600個胺

基 酸 或 至 少 650 個 胺 基 酸 的 酵 母 蛋 白 質 。 在 一 實 施 例 中 ， 酵 母 蛋 白 質 長 度 為 至 少 450 個 胺 基 酸 。

在 另 一 實 施 例 中 ， 酵 母 蛋 白 質 使 融 合 蛋 白 在 酵 母 媒 介 中 之 表 現 穩 定 ， 防 止 所 表 現 之 融 合 蛋 白 轉 譯 後 修 飾 ， 及 / 或 使 融 合 蛋 白 靶 向 酵 母 之 特 定 區 室 (例 如 ， 以 表 現 於 酵 母 細 胞 表 面 上) 。 對 於 傳 遞 進 入 酵 母 分 泌 通 道 ， 所 用 例 示 性 酵 母 蛋 白 質 包 括 (但 不 限 於) ： Aga (包 括 (但 不 限 於) Aga1 及 / 或 Aga2) ； SUC2 (酵 母 轉 化 酶) ； α 因 子 信 號 前 導 序 列 ； CPY ； 用 於 其 定 位 及 滯 留 於 細 胞 壁 中 的 Cwp2p ； 用 於 在 子 細 胞 形 成 之 初 始 階 段 期 間 定 位 於 酵 母 細 胞 芽 體 處 的 BUD 基 因 ； Flo1p ； Pir2p ； 及 Pir4p 。

在 本 發 明 之 另 一 態 樣 中 ， 可 使 用 其 他 序 列 使 蛋 白 質 靶 向 、 滯 留 及 / 或 穩 定 於 酵 母 媒 介 之 其 他 部 分 中 ， 例 如 於 細 胞 液 或 粒 線 體 中 。 可 用 於 以 上 任 一 實 施 例 之 合 適 酵 母 蛋 白 質 的 實 例 包 括 (但 不 限 於) ： SEC7 ； 用 於 其 在 葡 萄 糖 中 可 抑 制 表 現 及 胞 內 定 位 的 磷 酸 烯 醇 丙 酮 酸 羧 激 酶 PCK1 、 磷 酸 甘 油 酸 激 酶 PGK 及 磷 酸 丙 糖 異 構 酶 TPI 基 因 產 物 ； 熱 休 克 蛋 白 SSA1 、 SSA3 、 SSA4 、 SSC1 ， 其 表 現 可 誘 發 且 其 蛋 白 質 在 細 胞 暴 露 於 熱 處 理 後 具 有 更 高 熱 穩 定 性 ； 用 於 輸 入 粒 線 體 內 的 粒 線 體 蛋 白 質 CYC1 ； ACT1 。

抗體及抗原結合肽

本 發 明 之 一 實 施 例 係 關 於 選 擇 性 結 合 具 有 本 文 中 所 述 之 E76 突 變 (包 括 (但 不 限 於) E76G 突 變 、 E76K 突 變 及 / 或 E76Q 突 變) 之 Ras 蛋 白 或 肽 的 抗 體 或 抗 原 結 合 肽 。 本 發 明 之 其 他

實施例係關於選擇性結合在位置73、74、75、77或78中任一處或多處具有突變之Ras蛋白的抗體或抗原結合肽，或選擇性結合包括上述Ras突變且尤其位置12及/或13處之突變與位置59、61、73、74、75、76、77及/或78處突變之任一組合之Ras蛋白的抗體或抗原結合肽。抗體的特點在於其包含免疫球蛋白域，且因而，其為蛋白質之免疫球蛋白超家族之成員。本發明之抗體包括多株及單株抗體、二價及單價抗體、雙特異性或多特異性抗體、含有該等抗體之血清、已純化至不同程度之抗體及完整抗體之任何功能均等物。本發明之分離抗體可包括含有該等抗體之血清或已純化至不同程度之抗體。本發明之完整抗體可為多株或單株抗體。或者，完整抗體之功能均等物，諸如其中一或多個抗體域經截短或不存在的抗原結合片段(例如，Fv、Fab、Fab'或F(ab)²片段)，以及經遺傳設計的抗體或其抗原結合片段，包括單鏈抗體或可結合一種以上抗原決定基的抗體(例如，雙特異性抗體)或可結合一或多種不同抗原的抗體(例如，雙特異性或多特異性抗體)，亦可用於本發明。

本發明之遺傳設計抗體包括標準重組DNA技術所產生之彼等抗體，該等技術涉及操作及再表現編碼抗體可變區及/或恆定區之DNA。特定實例包括：嵌合抗體，其中抗體之VH域及/或VL域係來自與抗體其餘部分不同的來源；及CDR接枝抗體(及其抗原結合片段)，其中至少一個CDR序列及視需要至少一個可變區框架胺基酸係來自一來源，而

可變區及恆定區(適當時)之其餘部分係來自不同來源。嵌合抗體及CDR接枝抗體之建構描述於例如歐洲專利申請案EP-A 0194276、EP-A 0239400、EP-A 0451216及EP-A 0460617中。

一般而言，在抗體之製備中，可使適當實驗動物(諸如(但不限於)，兔、綿羊、倉鼠、天竺鼠、小鼠、大鼠或雞)暴露於所要抗體所針對之抗原。通常，用注入動物中之有效量之抗原使動物免疫。抗原之有效量係指誘發動物產生抗體所需的量。接著動物免疫系統在預定時期內反應。可重複免疫方法直至發現免疫系統產生針對抗原之抗體。為獲得對該抗原具有特異性之多株抗體，自含有所要抗體的動物中收集血清(或在雞之情形下，抗體可自蛋中收集)。該血清可用作試劑。多株抗體可藉由例如利用硫酸銨處理血清來進一步自血清(或蛋)中純化。

單株抗體可根據Kohler及Milstein之方法(Nature 256:495-497, 1975)製備。舉例而言，B淋巴細胞可自經免疫動物之脾(或任何適當組織)中獲得且接著與骨髓瘤細胞融合以獲得能夠在適當培養基中持續生長的雜交瘤細胞群。產生所要抗體的雜交瘤可藉由測試雜交瘤所產生之抗體結合至所要抗原的能力來選擇。

本發明亦包括非抗體多肽(有時稱為結合搭配物)，其經設計可特異性結合本發明之突變型Ras蛋白及適當時活化或抑制本發明之突變型Ras蛋白。具有指定配體特異性之該等多肽的設計實例提供於Beste等人(Proc. Natl. Acad.

Sci. 96: 1898-1903, 1999)中，該文獻以引用方式全文併入本文中。

小分子、構形拮抗劑及其他化合物

本發明亦包括小分子化合物(例如，使用本發明人所發現之突變型Ras進行之藥物發現的產物)，諸如GTP水解之構形拮抗劑或活化劑。在一實施例中，該等化合物可為能夠與突變型Ras蛋白相互作用以引發GTP水解的Ras-GAP之模擬形式或改良形式。在另一實施例中，該等化合物可與Ras-GAP直接相互作用以調節內源Ras-GAP蛋白，以在諸如本文中所述之彼等Ras突變體中引發GTP水解。較佳地，該等化合物不引發野生型(非突變型或非致瘤性)Ras的GTP水解，以使得該等化合物更適用作腫瘤特異性化合物。

該物質例如可獲自：分子多樣性策略(可快速建構化學多樣性分子大型文庫的相關策略之組合)、天然或合成化合物之文庫，尤其獲自化學或組合文庫(亦即，在序列或大小上不同、但具有相同基本組分的化合物之文庫)或藉由合理藥物設計獲得。參見，例如，Maulik等人，1997, Molecular Biotechnology: Therapeutic Applications and Strategies, Wiley-Liss, Inc.，其以引用方式全文併入本文中。可針對調節GTP水解或用作本文中所述之突變體Ras蛋白之構形拮抗劑的能力篩檢最初由藥物設計方法鑑定出之候選化合物。

在分子多樣性策略中，大型化合物文庫係使用生物、酶

促及/或化學方法例如自肽、寡核苷酸、碳水化合物及/或合成有機分子合成。在開發分子多樣性策略中的關鍵參數包括次單位多樣性、分子大小及文庫多樣性。篩檢該等文庫之一般目的係利用組合選擇之連續應用來獲得針對所要標靶的高親和力配體，且接著由隨機或定向設計策略使主導分子優化。分子多樣性方法詳述於Maulik等人，同上中。

在合理藥物設計程序中，調節化合物之三維結構可由例如核磁共振(NMR)或X射線結晶學來分析。接著該三維結構可藉由例如電腦建模用於預測可能化合物(諸如可能的調節劑)的結構。所預測之化合物結構可用於使例如由分子多樣性方法所產生之主導化合物優化。此外，所預測之化合物結構可藉由例如化學合成、重組DNA技術或藉由自天然來源(例如，植物、動物、細菌及真菌)中分離模擬物來產生。

基於結構之藥物設計的各種其他方法揭示於Maulik等人，1997，同上。Maulik等人揭示例如定向設計方法，其中使用者控制自經適當選擇片段之片段文庫中產生新穎分子的過程；隨機設計，其中使用者使用遺傳或其他演算法使片段及其組合隨機突變，同時應用選擇標準評估候選配體之合適度；及基於柵格之方法，其中使用者計算三維受體結構與小片段探針之間的相互作用能、繼而將有利探針位點連接在一起。

組合物及疫苗

如上所述，本發明之一實施例係關於包含突變型Ras蛋白、編碼該蛋白質之核酸分子或上述治療性核酸(例如，適體、核糖核酸酶、RNAi)或肽或小分子(例如，GTP水解之構形拮抗劑、活化劑)中之任一者的組合物或疫苗。本發明包括一實施例，其中本文中所述之突變型Ras蛋白可用於"習知"組合物或疫苗中或結合基於酵母之疫苗(描述於以下美國專利第5,830,463號及第7,083,787號以及美國專利公開案第2004-0156858 A1號及第2006-0110755 A1號中)使用。除本文中所述之任一突變型Ras蛋白外(例如，在位置76處具有突變，且較佳具有E76G、E76K或E76Q突變的Ras蛋白或肽，或具有Ras E76突變與諸如G12突變之另一突變之組合的Ras蛋白或肽)，組合物類型或疫苗類型亦可包括醫藥學上可接受之載劑。如本文中所使用，醫藥學上可接受之載劑係指適於將適用於本發明方法中之突變型Ras蛋白傳遞至適當活體內或離體位點的任何物質或媒介。該載劑可包括(但不限於)佐劑、賦形劑或任何其他類型之傳遞媒介或載劑。

根據本發明，佐劑通常為一般可增強動物對特異性抗原之免疫反應的物質。適當佐劑包括(但不限於)：Freund氏佐劑；其他細菌細胞壁組分；基於鋁之鹽；基於鈣之鹽；二氧化矽；聚核苷酸；類毒素；血清蛋白質；病毒包被蛋白；其他細菌源製劑； γ 干擾素；嵌段共聚物佐劑，諸如Hunter's Titermax佐劑(CytRx™, Inc. Norcross, GA)；Ribi佐劑(可獲自Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton,

MT)；以及皂苷及其衍生物，諸如 Quil A (可獲自 Superfos Biosector A/S，Denmark)。

載劑通常為可增強治療組合物在所治療之動物中之半衰期的化合物。適當載劑包括(但不限於)：聚合控釋型調配物、生物可降解移植物、脂質體、油、酯及二醇。

本發明之治療組合物(包括疫苗)亦可含有一或多種醫藥學上可接受之賦形劑。如本文中所使用，醫藥學上可接受之賦形劑係指適於將適用於本發明方法中之治療組合物傳遞至適當活體內或離體位點中的任何物質。較佳醫藥學上可接受之賦形劑能夠將組合物(或在一些實施例中，為酵母媒介或包含該酵母媒介的樹突狀細胞)維持於在該組合物到達體內靶細胞、靶組織或靶部位處後，該組合物能夠在靶部位(註釋：靶部位可為系統性的)引起免疫反應的形式。本發明之適當賦形劑包括可輸送疫苗至一部位、但不使疫苗特異性靶向該部位的賦形劑或調配物(本文中亦稱為非靶向載劑)。醫藥學上可接受之賦形劑之實例包括(但不限於)：水、生理食鹽水、磷酸鹽緩衝生理食鹽水、林格氏溶液(Ringer's solution)、含血清溶液、Hank氏溶液、其他生理平衡溶液、油、酯及二醇。水性載劑可含有接近接受者之生理條件(例如，藉由增強化學穩定性及等張性)所需的適當輔助物質。適當輔助物質包括：例如，乙酸钠、氯化鈉、乳酸鈉、氯化鉀、氯化鈣及用於產生磷酸鹽緩衝液、Tris緩衝液及碳酸氫鹽緩衝液的其他物質。輔助物質亦可包括防腐劑，諸如硫柳汞、間甲酚或鄰甲酚、福

馬林(formalin)及苯甲醇。

本發明之治療組合物或疫苗之一組分包括至少一種用於給動物接種疫苗的抗原且尤其為至少一種包含如本文中所述在位置76處含有突變之Ras蛋白之至少一部分的抗原。該組合物或疫苗可包括一種、兩種、幾種、數種或複數種抗原，視需要包括一或多種抗原之一或多個免疫原域。根據本發明，適用於本發明之組合物或疫苗中的抗原可包括兩個或兩個以上來自相同抗原之免疫原域或抗原決定基；兩個或兩個以上來自相同細胞、組織或有機體之抗原免疫原域或抗原決定基；或兩個或兩個以上來自不同細胞、組織或有機體之不同抗原、免疫原域或抗原決定基。較佳地，該抗原與酵母菌株異源(亦即，不為在不存在遺傳或生物操作之情況下由酵母菌株天然產生的蛋白質)。用於習知疫苗或組合物中或連同本發明之酵母媒介使用的較佳突變型Ras蛋白及較佳融合蛋白已於上文描述。

在本發明之一實施例中，組合物或疫苗亦可包括生物反應調節劑化合物或能夠產生該等調節劑(亦即，藉由用編碼該等調節劑之核酸分子轉染)，儘管當使用酵母媒介時該等調節劑未必獲得強的免疫反應(下文論述)。生物反應調節劑為可調節免疫反應的化合物。某些生物反應調節劑可激發保護性免疫反應，而其他可抑制有害免疫反應。某些生物反應調節劑優先增強細胞介導之免疫反應，而其他優先增強體液免疫反應(亦即，與體液免疫相比，可激發其中存在細胞免疫增強的免疫反應；或反之亦然)。存在

多種熟習此項技術者已知量測免疫反應之激發或抑制以及區別細胞免疫反應與體液免疫反應的技術。

適當生物反應調節劑包括細胞激素、激素、脂質衍生物、小分子藥物及其他生長調節劑，諸如(但不限於)：介白素2 (IL-2)、介白素4 (IL-4)、介白素10 (IL-10)、介白素12 (IL-12)、干擾素 γ (IFN- γ)、胰島素樣生長因子I (IGF-I)、轉化生長因子 β (TGF- β)、類固醇、前列腺素及白三烯。其他適當生物反應調節劑包括(但不限於)：抗-CTLA-4抗體(例如，以釋放無反應性T細胞)；T細胞協同刺激劑(例如，抗-CD137、抗-CD28、抗-CD40)；阿倫單抗(alemtuzumab)(例如，CamPath®)、地尼白介素(denileukin diftitox)(例如，ONTAK®)、抗-CD4、抗-CD25、抗-PD-1、抗-PD-L1、抗-PD-L2或阻斷FOXP3的藥劑(例如，以滅活/殺死CD4+/CD25+ T調節細胞)；Flt3配體、咪喹莫特(imiquimod) (Aldara™)、GM-CSF、沙格司亭(sargramostim) (Leukine®)、Toll樣受體(TLR)-7促效劑或TLR-9促效劑(例如，增加樹突狀細胞、巨噬細胞及其他專門呈遞抗原之細胞之數目或增強其活化狀態的藥劑)。該等生物反應調節劑於此項技術中為熟知的且可公開獲得。

基於酵母之疫苗或組合物

本發明之一態樣係關於包含以下各物的組合物或基於酵母之疫苗：(a)酵母媒介；及(b)由酵母媒介所表現之包含本文中所述之突變型Ras蛋白或肽中至少一者的抗原(例如，在位置76處具有突變的Ras蛋白，或包括E76突變及諸

如 G12 突變之另一 Ras 突變的蛋白質或蛋白質組合)，或多個本文中所述之抗原決定基或抗原或融合蛋白。如上所述，除 E76 突變外，本發明亦涵蓋位置 73、74、75、77 或 78 中任一處或多處之突變，或上述 Ras 突變之任一組合且尤其為位置 12 及 / 或 13 處之突變與位置 59、61、73、74、75、76、77 及 / 或 78 處之突變的任一組合。

根據本發明，酵母媒介為任何可結合抗原一起用於本發明之疫苗或治療組合物中或用作佐劑的酵母細胞(例如，整個或完整細胞)或其衍生物(見下文)。因此酵母媒介可包括(但不限於)：活的完整酵母微生物(亦即，具有所有其包括細胞壁之組分的酵母細胞)、殺死的(死的)完整酵母微生物或其衍生物，包括：酵母球形質體(亦即，缺少細胞壁的酵母細胞)、酵母胞質體(亦即，缺少細胞壁及核的酵母細胞)、酵母殘骸(亦即，缺少細胞壁、核及細胞質的酵母細胞)、酵母細胞壁製劑或亞細胞酵母膜提取物或其部分(亦稱為酵母膜顆粒，且先前稱為亞細胞酵母顆粒)。

酵母球形質體通常藉由酶促消化酵母細胞壁來產生。此方法描述於例如 Franzusoff 等人，1991，*Meth. Enzymol.* 194, 662-674 中，該文獻以引用方式全文併入本文中。

酵母胞質體通常藉由使酵母細胞去核而產生。此方法描述於例如 Coon, 1978, *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 48, 45-55 中，此文獻以引用方式全文併入本文中。

酵母殘骸通常藉由再密封經滲透或溶解之細胞來產生，且可(但未必)含有彼細胞中之至少一些細胞器。此方法描

述於例如 Franzusoff 等人，1983, *J. Biol. Chem.* 258, 3608-3614 及 Bussey 等人，1979, *Biochim. Biophys. Acta* 553, 185-196，各文獻以引用方式全文併入本文中。

酵母膜顆粒(亞細胞酵母膜提取物或其部分)係指缺少天然核或細胞質的酵母膜。該顆粒可具有任何尺寸，包括天然酵母膜至微粒(藉由超音波處理法或熟習此項技術者已知之其他膜破壞方法、繼而再密封而產生)尺寸範圍內的尺寸。產生亞細胞酵母膜提取物的方法描述於例如 Franzusoff 等人，1991, *Meth. Enzymol.* 194, 662-674 中。亦可使用含有酵母膜部分及(當抗原由酵母重組表現後再製備酵母膜顆粒時)所關注之抗原之酵母膜顆粒的部分。膜內部、膜表面或其組合可帶有抗原(亦即，抗原可位於膜內與膜外及/或跨越酵母膜顆粒之膜)。在一實施例中，酵母膜顆粒為重組酵母膜顆粒，其可為包括至少一種位於膜表面或至少部分嵌入膜內之所要抗原之完整、破裂或破裂且再密封之酵母膜。

酵母細胞壁製劑之實例為經分離之酵母細胞壁，在其表面上帶有抗原或抗原至少部分嵌入細胞壁內，以使得當投與至動物時酵母細胞壁製劑可激發針對感染性物質的所要(例如，保護性)免疫反應。

可使用任何酵母菌株製備本發明之酵母媒介。酵母為單細胞微生物，其屬於以下三類中之一類：子囊菌(Ascomycetes)、擔子菌(Basidiomycetes)及半知菌(Fungi Imperfecti)。選擇用作免疫調節劑之酵母類型的一個主要

考慮因素為酵母之致病性。在一實施例中，酵母為非致病菌株，諸如釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。進行非致病性酵母菌株之選擇以使對酵母媒介所投與之個體的任何不利作用最小化。然而，若酵母之致病性可由熟習此項技術者已知之任何方式(例如，突變株)消除，則可使用致病酵母。儘管致病酵母菌株或其非致病突變體在過去已用作佐劑或生物反應調節劑，且可根據本發明使用，但非致病酵母菌株較佳。

酵母菌株之較佳屬包括酵母菌屬(*Saccharomyces*)、念珠菌屬(*Candida*)(其可具有致病性)、隱球菌屬(*Cryptococcus*)、漢遜氏酵母屬(*Hansenula*)、克盧費氏酵母屬(*Kluyveromyces*)、畢赤氏酵母(*Pichia*)、紅酵母屬(*Rhodotorula*)、裂殖酵母屬(*Schizosaccharomyces*)及耶氏酵母屬(*Yarrowia*)，其中酵母菌屬、念珠菌屬、漢遜氏酵母屬、畢赤氏酵母及裂殖酵母屬更佳，且酵母菌屬尤其較佳。酵母菌株之較佳種包括釀酒酵母、卡爾斯伯酵母(*Saccharomyces carlsbergensis*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、乳酒假絲酵母(*Candida kefir*)、熱帶假絲酵母(*Candida tropicalis*)、羅氏隱球酵母(*Cryptococcus laurentii*)、新型隱球菌(*Cryptococcus neoformans*)、異常漢遜氏酵母(*Hansenula anomala*)、多形漢遜氏酵母(*Hansenula polymorpha*)、脆壁克魯維酵母(*Kluyveromyces fragilis*)、乳酸克魯維酵母(*Kluyveromyces lactis*)、馬克斯克魯維酵母(*Kluyveromyces marxianus var. lactis*)、巴斯德畢赤氏酵母(*Pichia pastoris*)、深紅酵母

(*Rhodotorula rubra*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)及解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)。應瞭解，該等物種中之多種包括多種亞種、類型、亞型等，其意欲包括於上述物種內。更佳酵母種包括釀酒酵母、白色念珠菌、多形漢遜氏酵母、巴斯德畢赤氏酵母及粟酒裂殖酵母。釀酒酵母由於其相對易於操作且用作食品添加劑"公認為安全的"(GRAS，FDA於1997年4月17日所提出的規則62FR18938)而尤其較佳。本發明之一實施例為能夠將質體複製至尤其高之複本數的酵母菌株，諸如釀酒酵母菌株。釀酒酵母菌株為一種能夠支撐表現載體的該菌株，該等表現載體容許一或多種靶抗原及/或抗原融合蛋白以高含量表現。此外，本發明中可使用任何突變體酵母菌株，包括展現所表現靶抗原之轉譯後修飾減少(諸如擴大N-連接糖基化之酶中的突變)的彼等菌株。

在一實施例中，本發明之較佳酵母媒介能夠與正傳遞酵母媒介及抗原之細胞型(諸如樹突狀細胞或巨噬細胞)融合，由此實現尤其高效之酵母媒介及(在很多實施例中)抗原至細胞型之傳遞。如本文中所使用，酵母媒介與靶細胞型之融合係指酵母細胞膜或其顆粒能夠與靶細胞型(例如，樹突狀細胞或巨噬細胞)之膜融合，從而形成合胞體。如本文中所使用，合胞體為藉由合併細胞所產生的原生質多核團。很多病毒表面蛋白質(包括免疫缺乏病毒(諸如HIV)、流感病毒、脊髓灰質炎病毒及腺病毒之彼等表面蛋白質)及其他融合體(諸如涉及卵與精子之間融合的彼等

物)展示能夠實現兩種膜之間(亦即，病毒與哺乳動物細胞膜之間或哺乳動物細胞膜之間)的融合。舉例而言，在其表面產生HIV gp120/gp41異源抗原的酵母媒介能夠與CD4+T-淋巴細胞融合。然而應注意，將靶向部分併入酵母媒介儘管在一些環境下可能需要，但並非必需。先前已展示本發明之酵母媒介易由樹突狀細胞(以及其他細胞，諸如巨噬細胞)吸收。

根據本發明，術語"酵母媒介-抗原複合物"或"酵母-抗原複合物"一般用於描述酵母媒介與抗原之任何關聯。該關聯包括：由酵母(重組酵母)表現抗原、將抗原引入酵母、抗原與酵母之實體連接及將酵母與抗原一起混合於諸如緩衝液或其他溶液或調配物中。該等類型之複合物在下文詳述。

在一實施例中，用於製備酵母媒介之酵母細胞係用編碼抗原之異源核酸分子轉染，以使得抗原由酵母細胞表現。該酵母在本文中亦稱為重組酵母或重組酵母媒介。酵母細胞接著可作為完整細胞裝載入樹突狀細胞內，或將酵母細胞殺死，或其可諸如藉由形成酵母球形質體、胞質體、殘骸或亞細胞顆粒而衍生化，繼任一者之後將該衍生物裝載入樹突狀細胞內。酵母球形質體亦可直接用重組核酸分子轉染(例如，由完整酵母製得球形質體，且接著轉染)，以便製備表現抗原的重組球形質體。

在一態樣中，用於製備酵母媒介之酵母細胞或酵母球形質體係用編碼抗原的重組核酸分子轉染，以使得抗原由酵

母細胞或酵母球形質體重組表現。在該態樣中，重組表現抗原的酵母細胞或酵母球形質體係用於製備包含酵母胞質體、酵母殘骸或酵母膜顆粒或酵母細胞壁顆粒或其部分的酵母媒介。

一般而言，酵母媒介與抗原可由本文中所述之任何技術結合。在一態樣中，酵母媒介細胞內裝載有抗原。在另一態樣中，抗原與酵母媒介共價或非共價連接。在又一態樣中，酵母媒介與抗原藉由混合而結合。在另一態樣中，且在較佳實施例中，抗原由酵母媒介或由酵母媒介所來源之酵母細胞或酵母球形質體重組表現。

抗原在本發明之酵母媒介中之表現可使用熟習此項技術者已知的技術達成。簡言之，將編碼至少一種所要抗原的核酸分子以核酸分子與轉錄控制序列操作性連接之方式插入表現載體中，以便在轉化入宿主酵母細胞內時能夠實現該核酸分子之組成性或調節性表現。編碼一或多種抗原的核酸分子可位於一或多個與一或多個表現控制序列操作性連接的表現載體上。尤其重要的表現控制序列為控制轉錄起始的彼等序列，諸如啟動子序列及上游活化序列。任何適當酵母啟動子可用於本發明且多種該等啟動子已為熟習此項技術者所熟知。用於在釀酒酵母中表現的較佳啟動子包括(但不限於)：編碼以下酵母蛋白質之基因的啟動子：乙醇脫氫酶I (ADH1)或II (ADH2)、CUP1、磷酸甘油酸激酶(PGK)、磷酸丙糖異構酶(TPI)、轉譯延長因子EF-1 α (TEF2)、甘油醛-3-磷酸脫氫酶(GAPDH；對於磷酸丙糖脫

氫酶亦稱為TDH3)、半乳糖激酶(GAL1)、半乳糖-1-磷酸尿苷-轉移酶(GAL7)、UDP-半乳糖差向異構酶(GAL10)、細胞色素 c_1 (CYC1)、Sec7 蛋白 (SEC7) 及酸性磷酸酶 (PHO5), 更佳為雜合啟動子, 諸如 ADH2/GAPDH 及 CYC1/GAL10 啟動子, 而 ADH2/GAPDH 啟動子(當細胞內之葡萄糖濃度低時(例如, 約 0.1% 至約 0.2%) 其被誘發)以及 CUP1 啟動子及 TEF2 啟動子甚至更佳。同樣, 很多上游活化序列 (UAS)(亦稱為強化子)係已知的。用於在釀酒酵母中表現的較佳上游活化序列包括(但不限於)編碼以下蛋白質之基因的 UAS: PCK1、TPI、TDH3、CYC1、ADH1、ADH2、SUC2、GAL1、GAL7 及 GAL10, 以及由 GAL4 基因產物活化的其他 UAS, 尤其較佳為 ADH2 UAS。由於 ADH2 UAS 係由 ADR1 基因產物活化, 因此當異源基因與 ADH2 UAS 操作性連接時, 過度表現 ADR1 基因較佳。用於在釀酒酵母中表現的較佳轉錄終止序列包括 α -因子、GAPDH 及 CYC1 基因之終止序列。

在嗜甲醇酵母中表現基因的較佳轉錄控制序列包括編碼醇氧化酶及甲酸脫氫酶之基因的轉錄控制區。

對於由酵母細胞外表現抗原的優化考慮及方法已在上文中詳述。

將核酸分子轉染入本發明之酵母細胞可藉由將核酸分子投與至細胞內之任何方法達成且包括(但不限於): 擴散、主動輸送、浴式超音波處理、電穿孔、微注射、脂質轉染、吸附及原生質體融合。所轉染之核酸分子可使用熟習

此項技術者已知的技術整合入酵母染色體內或維持在染色體外載體上。攜帶該等核酸分子之酵母媒介之實例詳細揭示於本文中。如上所述，酵母胞質體、酵母殘骸及酵母膜顆粒或細胞壁製劑亦可藉由用所要核酸分子轉染完整酵母微生物或酵母球形質體、於其中產生抗原且接著使用熟習此項技術者已知之技術進一步操作該等微生物或球形質體以產生含有所要抗原的胞質體、殘骸或亞細胞酵母膜提取物或其部分來重組產生。

產生重組酵母媒介及由酵母媒介表現抗原的有效條件包括培養酵母菌株的有效培養基。有效培養基通常為包含可吸收碳水化合物、氮及磷酸鹽來源以及適當鹽、礦物質、金屬及其他營養物(諸如維生素及生長因子)的水性培養基。培養基可包含複合營養物或可為限定基本培養基。本發明之酵母菌株可培養於多種容器內，包括(但不限於)生物反應器、錐形依氏燒瓶(Erlenmeyer flask)、試管、微量滴定盤及皮氏培養皿(petri plate)。培養係在適於酵母菌株的溫度、pH及氧含量下進行。該等培養條件係均在一般技術者技術範圍內(參見，例如，Guthrie等人(編)，1991, *Methods in Enzymology*，第194卷，Academic Press, San Diego)。

在本發明之一些態樣中，且尤其當在需要誘導體液免疫反應之實施例中需要抗原之足夠表面表現或提供足夠抗原時，使酵母生長於維持在中性pH值的培養基中。如本文中所使用，一般使用術語"中性pH值"指介於約pH 5.5與約pH

8之間、較佳約pH 6與約8之間的pH值範圍。熟習此項技術者應瞭解，當用pH計量測時會存在微小波動(例如，十分之一或百分之一)。因而，使用中性pH值培養酵母細胞意謂使酵母細胞在其大部分培養時間內在中性pH值下生長。較佳地，使酵母在維持於至少5.5之pH程度的培養基中生長，亦即，不容許培養基之pH值降至pH 5.5以下。在培養酵母時使用中性pH值可促成若干種生物效應，該等生物效應對於使用酵母作為免疫調節的媒介為理想特徵。

在本發明之一實施例中，作為在酵母媒介中重組表現抗原的替代方案，可使酵母媒介細胞內裝載有蛋白質或肽抗原或充當抗原的碳水化合物或其他分子。隨後，可將細胞內現含有抗原的酵母媒介投與至患者或裝載入諸如樹突狀細胞之載體內(如下所述)。如本文中所使用，肽包含小於或等於約30-50個胺基酸的胺基酸序列，而蛋白質包含多於約30-50個胺基酸的胺基酸序列；蛋白質可為多聚體。適用作抗原的蛋白質或肽可小如T細胞抗原決定基(亦即，長度大於5個胺基酸)，且可為大於包含多個抗原決定基、蛋白質片段、全長蛋白質、嵌合蛋白質或融合蛋白之彼等尺寸的任何適當尺寸。肽及蛋白質可以天然或合成方式衍生化；該等修飾可包括(但不限於)：糖基化、磷酸化、乙酰化、肉豆蔻醯化、異戊烯化、棕櫚醯化、醯胺化及/或添加甘油磷脂醯肌醇。肽及蛋白質可由熟習此項技術者已知之技術(諸如擴散、主動輸送、脂質體融合、電穿孔、吞噬、冷凍-融化循環及浴式超音波處理)直接插入本發明

之酵母媒介內。可直接裝載肽、蛋白質、碳水化合物或其他分子的酵母媒介包括完整酵母以及在製備後、但在裝載入樹突狀細胞之前可裝載抗原的球形質體、殘骸或胞質體。或者，完整酵母可裝載抗原且接著自其製備球形質體、殘骸、胞質體或亞細胞顆粒。諸如藉由微生物之裝載、藉由哺乳動物腫瘤細胞或其部分之裝載所提供，在該實施例中可將任何數目的抗原(至少1、2、3、4或任一整數個直至數百或數千個抗原)裝載入酵母媒介內。

在本發明之另一實施例中，將抗原實體連接於酵母媒介。抗原實體連接於酵母媒介可由適於此項技術中之任何方法達成，包括共價及非共價結合法，其包括(但不限於)使抗原與酵母媒介之外表面化學交聯，或諸如使用抗體或其他結合搭配物使抗原與酵母媒介之外表面生物連接。化學交聯例如可藉由如下方法達成：其包括戊二醛鍵聯、光親和標記、用碳化二醯亞胺處理、用能使二硫鍵鍵聯的化學品處理及用此項技術中的其他標準交聯化學品處理。或者，可使化學品與可改變酵母膜之脂雙層電荷或細胞壁之組成的酵母媒介接觸，以使得酵母之外表面更可能與具有特定電荷特徵的抗原融合或結合。諸如抗體、結合肽、可溶性受體及其他配體的靶向劑亦可作為融合蛋白併入抗原中或以其他方式與抗原結合以使抗原與酵母媒介結合。

在又一實施例中，酵母媒介與抗原彼此間藉由一個更被動的非特異性或非共價鍵結機制結合，諸如於緩衝液或其他適當調配物(例如混合物)中將酵母媒介與抗原一起輕柔

混合。

在本發明之一實施例中，將酵母媒介與抗原均裝載入細胞內諸如樹突狀細胞或巨噬細胞之載體內以形成本發明之治療組合物或疫苗。或者，可在酵母媒介不存在之情況下將本發明之抗原(亦即，本發明之Ras融合蛋白)裝載入樹突狀細胞內。

達成裝載兩種成分的各種形式詳細論述於下文。如本文中所使用，術語"裝載"及其衍生詞係指將組分(例如，酵母媒介及/或抗原)插入、引入或輸入細胞(例如，樹突狀細胞)內。細胞內裝載組分係指將組分插入或引入細胞之細胞內區室(例如，經由細胞膜，至少進入細胞質、吞噬體、溶酶體或細胞之一些細胞內空間中)。為將組分裝載入細胞內，參考任何可迫使該組分進入細胞(例如，藉由電穿孔)或將該組分置於一環境中(例如，接觸或接近細胞)，其中該組分實質上可藉由一些方法(例如，吞噬作用)進入細胞內的技術。裝載技術包括(但不限於)：擴散、主動輸送、脂質體融合、電穿孔、吞噬作用及浴式超音波處理。在一較佳實施例中，樹突狀細胞裝載酵母媒介及/或抗原係使用被動機制，該等被動機制包括樹突狀細胞吞噬酵母媒介及/或抗原。

在一實施例中，完整酵母(有或無異源抗原之表現)可以製備酵母細胞壁製劑、酵母膜顆粒或酵母片段(亦即，不完整)的方式磨碎或處理，在一些實施例中，酵母片段可與包括抗原的其他組合物(例如，DNA疫苗、蛋白質亞單

位疫苗、殺死或滅活的病原體)一起提供或投與以增強免疫反應。舉例而言，可使用酶處理、化學處理或物理力(例如，機械剪切或超音波處理)將酵母粉碎為可用作佐劑的部分。

本發明之治療方法

本發明之一實施例係關於本文中所述之與本發明之突變型Ras(例如，至少在密碼子76處具有一突變的Ras，或密碼子76突變與諸如密碼子12突變之另一Ras突變的組合)相關之任一物質在製備保護動物免於癌症之藥物或組合物或疫苗中的用途。如上所述，除E76突變外，本發明亦包括位置73、74、75、77或78中任一處或多處之突變，或上述Ras突變之任一組合且尤其為位置12及/或13處之突變與位置59、61、73、74、75、76、77及/或78處之突變的任一組合。本發明之其他實施例係關於保護動物免於癌症的方法，其包含將本文中所述之疫苗或治療組合物投與至患有癌症或處於產生癌症之風險中的動物，以減緩或預防該動物之癌症之至少一種症狀。

在一態樣中，疫苗或組合物包含上述任一疫苗或組合物，其至少含有包含至少一種包含位置76處突變之突變型Ras蛋白或肽的抗原或一或多種包括位置76突變與諸如位置12突變之另一Ras突變之組合的抗原，且更佳包含上述各種肽、蛋白質、嵌合構築體及/或融合蛋白。可用於疫苗或組合物中的其他Ras突變及其組合描述於上文中。適用於本發明之方法中的其他治療組合物包括包含靶向由本

發明人所鑑別之突變型Ras蛋白，且抑制腫瘤表現該等蛋白質，或起始或上調Ras蛋白之GTP水解以取代或補償突變型Ras蛋白對GTP水解的作用之化合物或物質的組合物。該等化合物或物質可包括(但不限於)：各種抑制性核酸，諸如核糖核酸酶、RNAi或適體；及/或各種肽及合成或小分子化合物(例如，使用本發明人所發現之突變型Ras進行之藥物發現的產物)，諸如GTP水解之構形拮抗劑或活化劑。該等化合物或物質及鑑別其之方法論述於本文中其他處。在本發明之一態樣中，並非將全長突變型Ras產物(例如，核酸分子及蛋白質)結合本發明之治療方法及用途投與至個體；而是選擇該等Ras產物之肽及片段或與該等Ras產物有關的其他工具(例如，適體、RNAi等)。儘管免疫原部分及多域融合蛋白較佳，但在用於引起免疫反應之組合物之情形下，尤其在由本發明之酵母媒介表現之情形下，可使用全長Ras。

該疫苗或組合物亦包含醫藥學上可接受之載劑或賦形劑，且在一實施例中(例如，其中該組合物為疫苗)包括本文所述之酵母媒介。在一態樣中，包括於疫苗中的融合蛋白包含至少兩種或兩種以上癌症抗原。在另一態樣中，該融合蛋白包含一或多種癌症抗原之至少一或多個免疫原域。

在另一態樣中，癌症抗原為與癌症有關的抗原，該癌症包括(但不限於)：黑色素瘤、鱗狀細胞癌、乳癌、頭及頸癌、甲狀腺癌、軟組織肉瘤、骨肉瘤、睪丸癌、前列腺

癌、胰腺癌、卵巢癌、膀胱癌、皮膚癌、腦癌、血管肉瘤(angiosarcoma)、血管肉瘤(hemangiosarcoma)、肥大細胞瘤、原發性肝癌、肺癌(包括非小細胞肺癌)、胰腺癌、胃腸癌(包括結腸直腸癌)、腎細胞癌、造血贅生症及其轉移性癌症。

在所有態樣中，該疫苗或組合物中包括如上所述之至少一種抗原，該抗原包含以下各物、大體上由以下各物組成或由以下各物組成：包括位置76處之突變、位置76突變與至少另一Ras突變(諸如位置12突變)之組合的Ras肽、包括位置73、74、75、77或78處之突變的Ras肽、包括本文中所述之任一突變組合的Ras肽或利用該等突變的核酸物質或其他物質。

本發明包括將本發明之組合物或疫苗傳遞至動物。投藥方法可離體或活體內執行。離體投藥係指在患者體外執行部分調節步驟，諸如將本發明之組合物在使得酵母媒介與抗原裝載入細胞內的條件下投與自一患者所移出的細胞(樹突狀細胞)群中且使該等細胞返回至該患者中。本發明之治療組合物可藉由任何適當投藥方式返回至患者中或投與至患者。

疫苗或組合物之投藥可為系統性投藥、黏膜投藥及/或接近靶部位(例如，靠近腫瘤)投藥。較佳投藥途徑對於熟習此項技術者顯而易見，此視欲預防或治療之病狀類型、所用抗原及/或靶細胞群或組織而定。較佳投藥方法包括(但不限於)：靜脈內投藥、腹膜內投藥、肌內投藥、節內

投藥、冠脈內投藥、動脈內投藥(例如，投入頸動脈內)、皮下投藥、經皮傳遞、氣管內投藥、皮下投藥、關節內投藥、心室內投藥、吸入(例如，氣霧劑)、顱內投藥、脊柱內投藥、眼內投藥、經耳投藥、鼻內投藥、經口投藥、經肺投藥、導管注入及直接注入至組織內。尤其較佳投藥途徑包括：靜脈內、腹膜內、皮下、皮內、節內、肌內、經皮、吸入、鼻內、經口、眼內、關節內、顱內及脊柱內。非經腸傳遞可包括皮內、肌內、腹膜內、胸膜內、肺內、靜脈內、皮下、房室導管及靜脈導管途徑。經耳傳遞可包括滴耳劑，鼻內傳遞可包括滴鼻劑或鼻內注射，且眼內傳遞可包括滴眼劑。氣霧劑(吸入)傳遞亦可使用此項技術中的標準方法執行(參見，例如，Stribling等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 189:11277-11281, 1992，該文獻以引用方式全文併入本文中)。舉例而言，在一實施例中，本發明之組合物或疫苗可調配成適於使用適當吸入裝置或噴霧器噴霧傳遞的組合物。經口傳遞包括可經由口傳送的固體及液體，且由於包含酵母媒介的組合物易製備為例如經口傳遞的錠劑或膠囊劑形式且易調配成食物及飲料產品，因此適用於形成黏膜免疫性。其他調節黏膜免疫性的投藥途徑適用於治療病毒感染。該等途徑包括支氣管、皮內、肌內、鼻內、其他吸入途徑、直腸、皮下、局部、經皮、陰道及尿道途徑。

根據本發明，在投與疫苗(治療或預防)(較佳使得該動物免患該疾病)之情形下，有效投藥方案(亦即，以有效方式

投與疫苗或治療組合物)包含可在一患有疾病或病狀或處於感染疾病或病狀之風險中的動物中引起免疫反應的適當劑量參數及投藥方式。當該組合物包含如本文中所述之不同治療化合物或物質時，有效投藥方案包含可減緩或可偵測改善患者疾病或病狀之至少一種症狀或指標(諸如腫瘤尺寸或程度降低)的適當劑量參數及投藥方式，或當患者處於感染疾病或病狀之風險中時預防疾病的適當劑量參數及投藥方式。有效劑量參數可使用此項技術中針對特定疾病的標準方法判定。該等方法包括例如判定存活率、副作用(亦即，毒性)及疾病之進行或衰退。

根據本發明，適當單次劑量大小為當在適當時期內投與一或多次時能夠在動物中引起抗原特異性免疫反應或使得疾病之至少一種症狀或指標改善的劑量。劑量可視所治療之疾病或病狀而改變。舉例而言，在一實施例中，當將抗原與酵母媒介一起傳遞時，本發明之酵母媒介之單次劑量為每公斤該組合物所投與之有機體之體重約 1×10^5 至約 5×10^7 酵母細胞當量。在一較佳實施例中，每劑量之酵母細胞不用針對有機體重量調整。在該實施例中，本發明之酵母媒介之單次劑量為每劑量約 1×10^4 至約 1×10^9 個酵母細胞。更佳地，本發明之酵母媒介之單次劑量為每劑量(亦即，每個有機體)約0.1 Y.U. (1×10^6 個細胞)至約100 Y.U. (1×10^9 個細胞)，包括增量為 0.1×10^6 個細胞的任何中間劑量(亦即， 1.1×10^6 、 1.2×10^6 、 1.3×10^6 ...)。此劑量範圍可有效用於任何大小的任何有機體(包括小鼠、猴、人類等)

中。當疫苗藉由將酵母媒介及抗原裝載入樹突狀細胞內投與時，本發明之疫苗之較佳單次劑量為每次投藥每個體約 0.5×10^6 至約 40×10^6 個樹突狀細胞。較佳地，單次劑量為每個體約 1×10^6 至約 20×10^6 個樹突狀細胞，且更佳為每個體約 1×10^6 至約 10×10^6 個樹突狀細胞。

核酸疫苗之較佳單次劑量在約1奈克(ng)至約100 μg 範圍內，此視投藥途徑及/或傳遞方法而定，其可由熟習此項技術者確定。適當傳遞方法包括例如注射、滴劑、霧化及/或局部傳遞。在一實施例中，純DNA構築體覆蓋金顆粒(直徑為1至3 μm)之表面且用"基因槍"射入皮膚細胞或肌肉內。

核酸:脂質體複合物之適當單次劑量為每公斤該複合物所投與之患者之體重約0.1 μg 至約100 μg 。在另一實施例中，適當單次劑量為每公斤體重約1 μg 至約10 μg 。在另一實施例中，核酸:脂質複合物之適當單次劑量為至少約0.1 μg 核酸、更佳至少約1 μg 核酸、甚至更佳至少約10 μg 核酸、甚至更佳至少約50 μg 核酸且甚至更佳至少約100 μg 核酸。

當該組合物包含蛋白質、小分子(亦即，藥物設計之產物)或抗體時，該化合物之較佳單次劑量通常包含介於約 $0.01 \text{微克} \times \text{公斤}^{-1}$ 與約 $10 \text{毫克} \times \text{公斤}^{-1}$ 動物體重之間的劑量。該藥劑之更佳單次劑量包含介於約 $1 \text{微克} \times \text{公斤}^{-1}$ 與約 $10 \text{毫克} \times \text{公斤}^{-1}$ 動物體重之間的劑量。藥劑之甚至更佳單次劑量包含介於約 $5 \text{微克} \times \text{公斤}^{-1}$ 與約 $7 \text{毫克} \times \text{公斤}^{-1}$ 動物體重之間

的劑量。藥劑之甚至更佳單次劑量包含介於約10微克 $\times$ 公斤 $^{-1}$ 與約5毫克 $\times$ 公斤 $^{-1}$ 動物體重之間的劑量。若藥劑係非經腸傳遞，則該藥劑之另一尤其較佳單次劑量包含介於約0.1微克 $\times$ 公斤 $^{-1}$ 與約10微克 $\times$ 公斤 $^{-1}$ 動物體重之間的劑量。

為疫苗之治療組合物中的"輔助劑"較佳係當針對抗原的免疫反應減弱時或需要提供針對一或多種特定抗原之免疫反應或誘發針對一或多種特定抗原之記憶反應時投與。輔助劑可在最初投藥後約2週至數年間投與。在一實施例中，投藥時程為：在約1個月至約6個月之時期內，每公斤有機體體重投與約 1×10^5 至約 5×10^7 酵母細胞當量之組合物約1至約4次。本文中所述之其他治療組合物之其他給藥方案可由臨床醫師根據對患者投藥後之再評估及對疾病或病狀或症狀或其指標之現狀評估來判定。

在本發明之一實施例中，將基因療法單獨或結合本文中所述之另一療法投與至鑑定為具有如本文中所述之Ras突變的患者，以將野生型或"健康型"(非突變型) Ras傳遞至該患者。基因治療方案中投與核酸分子的方法在此項技術中係已知的。

針對本發明之治療組合物及疫苗的方法及用途主要意欲用於預防及/或治療疾病或病狀。術語"保護"一般可用於表示預防及/或治療。本發明之治療組合物或疫苗當投與至個體時可：防止疾病發生；治癒疾病；延遲疾病發作；及/或減緩(減少、延遲、減弱)疾病症狀、病徵或病因(例如，減少疾病之一或多種症狀；減少疾病發生率；增加患有或

發展疾病之個體的存活率；及/或降低疾病之嚴重程度)。因而，本發明包括防止疾病發生(預防性治療或預防性疫苗)及治療患有疾病或經歷疾病之症狀的動物(治療性治療或治療性疫苗)。在一實施例中，本發明之方法可藉由誘發有益或保護性免疫反應來有效引起個體中之免疫反應，該等有益或保護性免疫反應在一些情況下可另外抑制(例如，減少、抑制或阻遏)過分活躍或有害的免疫反應。在另一態樣中，本發明之方法可對疾病或病狀之至少一種症狀或指標有效產生至少一種可偵測之改善或益處，對於癌症，其可包括(但不限於)：降低腫瘤負荷，例如，降低腫瘤大小、降低腫瘤水平、降低腫瘤生長率及/或減少轉移及/或延遲疾病發作及/或增加患者存活率。

本發明之診斷方法及預後方法

本發明之另一實施例係關於本發明之突變型Ras蛋白或*ras*核酸分子及其部分作為生物標記在癌症診斷或預後檢定或套組中的用途。在一較佳實施例中，本發明係關於在癌症診斷或預後檢定中偵測編碼突變型Ras蛋白的核酸(基因或RNA)。在一實施例中，該方法包括判定E76突變體標記(本文中一般亦稱為生物標記)在核酸或蛋白質樣本中之存在及/或含量。儘管應瞭解，與野生型蛋白質或基因相比，其他腫瘤在Ras之位置E76處可能具有不同突變，但E76突變可包括如本文中所述E76處之任何突變，且較佳包括E76G突變、E76K突變或E76Q突變。生物標記可藉由偵測突變型Ras蛋白來偵測，但更佳藉由偵測編碼該突變型

Ras蛋白之核酸分子(RNA或DNA)來偵測。在另一實施例中，該方法包括另外偵測(同時或依序) Ras之另一突變體生物標記之存在及/或含量，包括Ras之位置(密碼子)12、13、59或61處之上述已知突變。在一實施例中，該方法包括偵測E76突變與G12突變在單個患者樣本(核酸或蛋白質)中的存在及/或含量。在另一實施例中，該方法可包括判定位置73、74、75、77或78處中任一處或多處突變或上述Ras突變之任一組合且尤其位置12及/或13處突變與位置59、61、73、74、75、76、77及/或78處突變之任一組合的存在及/或含量。為簡便起見，以下態樣將針對E76突變描述，但將擴大至涵蓋該等突變或其組合中之任一者。

本發明之該方法中的第一步驟包括偵測患者測試樣本(亦稱為患者樣本)中突變型*ras*基因(包含導致E76 Ras突變的突變)的存在及/或E76 Ras的表現或生物活性。獲得患者樣本的適當方法係為熟習此項技術者所已知。患者樣本可包括來自患者可能含有腫瘤細胞或腫瘤細胞蛋白質之任何體液或組織。更特定言之，根據本發明，術語"測試樣本"或"患者樣本"一般可用於指含有欲由本方法評估之細胞或由其分泌或包含於其中之產物的任何類型之樣本，包括(但不限於)分離細胞之樣本、組織樣本、體液樣本或例如由自患者所分離之細胞樣本中所獲取的核酸樣本。

根據本發明，分離細胞之樣本為通常處於懸浮液中之細胞樣本或自結締組織(其在活體內可能連接組織內之細胞)分離之細胞樣本，其係由任何可收集適當數目之細胞的適

當方法自器官、組織或體液收集以便由本發明之方法評估。儘管可使用純化方法富集較佳評估類型的細胞，但細胞樣本中的細胞未必為相同類型。細胞可例如藉由切碎組織、處理組織樣本以釋放個體細胞或自體液分離來獲得。

組織樣本儘管與分離細胞之樣本類似，但在本文中定義為身體器官或組織之切片，其通常包括若干種細胞類型及/或使細胞保持在一起的細胞骨架結構。熟習此項技術者應瞭解，術語"組織樣本"在一些情況下可與"細胞樣本"互換使用，儘管其較佳係用於命名比細胞樣本更複雜之結構。組織樣本可由活組織檢查獲得，例如包括剪切、切片或切口。

體液樣本，如組織樣本，含有欲評估標記表現或生物活性的細胞及/或可含有由細胞分泌的可溶性生物標記，且為由適於欲取樣之特定體液之任何方法所獲得的流體。適於取樣的體液包括(但不限於)血液、黏液、精液、唾液、乳汁、膽汁及尿。

一般而言，樣本類型(亦即，細胞、組織或體液)係基於欲評估腫瘤細胞存在或生長之器官或組織的可達性及結構及/或基於欲評估何種癌症類型而選擇。舉例而言，若欲評估之器官/組織為乳房，則樣本可為來自活組織檢查之上皮細胞樣本(亦即，細胞樣本)或來自活組織檢查之乳房組織樣本(組織樣本)。最適用於本發明的樣本為藉由活組織檢查或手術或常規實驗室流體收集自患者分離的細胞、組織或體液(及其組分，諸如DNA)。

一旦自該患者獲得樣本，則對該樣本評估以偵測樣本細胞中本發明之突變型*ras*基因之存在，或偵測樣本細胞中本發明之單獨或與其他突變(諸如其他Ras或*ras*突變)且尤其G12突變組合之E76 Ras的表現或生物活性(例如，藉由偵測編碼突變型基因產物的mRNA或偵測突變型Ras蛋白)。

舉例而言，*ras*生物標記之存在及/或含量可由習知方法測定，諸如基因或RNA偵測方法(例如，DNA測序、寡核苷酸雜交、用對該突變具有特異性之引子進行PCR擴增)或蛋白質偵測方法(例如，測定基因產物含量的免疫檢定或生物化學檢定)。一般而言，患者樣本中*ras*基因或RNA的核酸序列可由量測或偵測基因序列或表現的任何適當方法或技術偵測。該等方法包括(但不限於)：PCR、逆轉錄酶-PCR(RT-PCR)、原位PCR、原位雜交、南方墨點法、北方墨點法、序列分析、微陣列分析、偵測報導基因或其他DNA/RNA雜交平臺。可簡單評估表現以判定突變型*ras*序列之存在及/或可將表現與自健康個體所分離的樣本或另一陰性對照加以比較。

舉例而言，可將來自包埋石蠟塊之患者腫瘤活組織檢查樣本切片且用蘇木精(hematoxylin)染色，其後由雷射捕獲顯微解剖法分離樣本中的病理性細胞。接著將分離細胞中的基因組DNA用作PCR反應的模板，以使用側接所關注之序列的引子擴增在外顯子3中含有特定*ras*序列的DNA片段。或者，來自腫瘤活組織檢查之切片可由原位PCR分

析，以使得擴增可視與結合突變型序列之引子雜交而定，且用經標記之核苷酸延長，以使得在腫瘤細胞內特異性偵測所擴增之序列。作為又一替代方案，切片可用與一或多種E76突變特異性雜交的寡核苷酸而非用野生型*ras*序列探測。

當偵測Ras E76突變體蛋白質(或如本文中所述之Ras突變組合)時，可在諸如腫瘤組織之適當組織及由活組織檢查所獲得的細胞物質中偵測蛋白質表現。舉例而言，可使可加以固定的患者腫瘤活組織檢查樣本與選擇性結合欲偵測之Ras蛋白的抗體、抗體片段或適體接觸，且判定該抗體、其片段或適體是否已與Ras蛋白結合。結合可使用此項技術中的多種標準方法量測，該等方法包括(但不限於)：西方墨點法、免疫印跡法、酶聯免疫吸附檢定法(ELISA)、放射免疫檢定法(RIA)、免疫沉澱法、表面電漿共振法、化學發光法、螢光偏振法、磷光法、免疫組織化學分析法、基質輔助雷射解吸/電離飛行時間(MALDI-TOF)質譜分析法、微細胞術、微陣列、顯微術、螢光活化細胞分選法(FACS)及流式細胞術。在一特定免疫檢定中，與Ras蛋白之結合係使用特異性結合突變型Ras蛋白的第一單株抗體及結合該第一抗體的第二抗體測定。

在本發明之診斷/預後方法中，若(藉由偵測核酸或蛋白質)偵測E76 Ras或*ras*突變(或本文中所述之Ras或*ras*突變之組合)，則認為對突變之該偵測可指示患者中存在腫瘤細胞或傾向於形成腫瘤細胞，因為該突變預期不會存在於

"健康"個體中(亦即，未患有且似乎不易患由此Ras突變引起或造成之癌症的個體)。然而，若需要，則可將Ras或*ras*突變之偵測與健康或正常個體中之"Ras狀況"(亦即，Ras蛋白或基因之序列)加以比較。

儘管偵測E76突變足以斷定對患者中腫瘤細胞之存在或形成腫瘤細胞之傾向的陽性診斷，但咸信，與僅偵測E76突變、僅偵測其他Ras突變(例如，G12突變)及/或偵測沒有突變相比，偵測腫瘤樣本中E76與另一Ras或*ras*突變且尤其G12突變之組合不僅可指示腫瘤細胞之存在或形成腫瘤細胞之傾向，而且亦可另外指示預測更具有侵入性(例如，顯示更快或更高之體積腫瘤生長、增強之侵入性、增強之轉移生長傾向、增強之不良結果預後)的腫瘤。

根據本發明，"基線量"為生物標記表現或生物活性之測試量(亦即，在測試樣本中)可針對其加以比較的生物標記(例如，Ras或*ras*)表現或活性的對照量，且在一些實施例中(但非所有實施例，此視方法而定)為正常量。提及生物標記表現或生物活性之基線量時使用的術語"陰性對照"通常係指在來自認為為正常(亦即，無腫瘤、無癌變、未經歷贅生轉化、未展現腫瘤細胞存在或不適當細胞生長)之患者或個體群之樣本中所確立的基線量。在一實施例中，基線量或對照可自所測試之患者的無關組織(亦即，認為未由癌症影響的組織)建立，以便可隨時間監控患者之腫瘤狀況(腫瘤負荷、生長、體積等)及/或以便可隨時間評估給定治療方案之功效。偵測Ras生物標記表現或生物活性

的方法在上文中已詳述。"陽性對照"可包括證實生物標記偵測為陽性的任何對照，諸如確診腫瘤中所建立的生物標記表現量或活性量或針對生物標記所評估的任何其他陽性參數指標。

當使用基線量或對照量時，熟習此項技術者應瞭解，執行檢定時不需要確立各檢定的基線量或對照量，而是藉由參考與給定對照樣本之生物標記表現之先前測定基線量相關之儲存資訊形式確立基線量或對照量，諸如由上述任一方法所確立的基線量。該形式的儲存資訊可包括例如(但不限於)：與"健康"(陰性對照)或腫瘤陽性(包括各期腫瘤)生物標記表現相關之群體或個體資料之參考圖、清單或電子檔案；記錄來自先前評估之資料的患者之醫療檢查圖；或與適用於欲診斷之患者的基線生物標記表現相關的任何其他資料來源。

偵測到欲評估腫瘤細胞之樣本中存在或不存在突變型Ras蛋白或編碼其的基因或RNA之後，可對患者執行診斷、監控或分期的最後步驟，且可確定治療或預防方案或進一步篩檢的方案。此外，若偵測到Ras突變存在，則可由其他癌症診斷方法評估患者以證明初期診斷。

在本發明之一實施例中，該診斷方法可用於判定對患者之診斷、對患者之預後以及判定適當治療方案且預測患者用給定治癌方案治療後是否成功或其結果。舉例而言，若懷疑患者患有癌症或處於發展癌症之風險中，則該方法可用於判定患者是否具有與癌症相關的Ras突變且從而診斷

癌症。此外，若認為患者患有腫瘤，則(與鑑別不同突變或至少不鑑別Ras突變相比)鑑別Ras突變可向臨床醫師指示患者腫瘤侵入性可能為何種程度，從而可更特異性預後癌症。如上所述，不受理論束縛，本發明人相信，偵測Ras E76突變與G12突變之組合可預測更具侵入性之腫瘤，且因此，對患者之預後可能比對無該組合之患者更差，及/或可以比無該突變組合之患者更強之侵入性之方式治療具有該組合之患者。最後，對患者腫瘤中Ras突變或突變組合之鑑別可用於基於對該特定突變如何實現細胞活性的瞭解來開發特異性癌症治療方案，且亦可用於預測患者對特定類型之療法的反應或敏感性。

本發明亦包括利用本發明之診斷方法的套組。該套組較佳包含適用於偵測測試樣本中本發明之Ras(蛋白質)或*ras*(核酸)突變存在或不存在的任何試劑，且較佳包括與生物標記(亦即，突變型*ras*基因、RNA、cDNA或由其所編碼之蛋白質)結合的寡核苷酸探針、PCR引子或抗體、抗原結合肽或適體。該套組可包括執行本文中所設想之診斷方法所需要的任何試劑。該套組亦可包括用於偵測其他癌症生物標記(諸如前述Ras突變)的試劑或任何其他適用於癌症診斷(甚至具有與本文中所述之Ras突變無關之原因的癌症)的標靶。該等試劑(例如，探針、抗體、適體)可與另一單元(例如標記)接合或固定於固體載體(基質)。在一實施例中，該套組可含有用於偵測測試樣本中代表細胞類型之對照生物標記的試劑。該試劑可以游離形式存在，或固定於

基質，諸如塑料盤、微陣列板、試管、測試棒等。該套組亦可包括適用於偵測試劑及/或適用於標記陽性或陰性對照的試劑、洗液、稀釋緩衝液及其類似物。該套組亦可包括一組使用套組及說明結果的書面說明書。在一實施例中，將該套組調配為高產量檢定。

更特定言之，根據本發明，偵測生物標記存在、表現或生物活性的試劑可為任何適當試劑，該試劑可用於如上文所述偵測Ras生物標記存在、表現或生物活性的方法中。該等試劑包括(但不限於)：在嚴謹雜交條件下與編碼生物標記或其片段之核酸分子雜交的探針；用於擴增編碼生物標記或其片段之核酸的引子；特異性結合靶分子上構形上獨特之位點(亦即，可辨別具有E76突變(包括特定E76突變，諸如E76G、E76K或E76Q)的Ras與不具有該突變的Ras)的適體；及/或選擇性結合生物標記的抗體、其抗原結合片段或其他抗原結合肽。選擇性結合樣本中突變型Ras蛋白的抗體(包括(但不限於)多株及單株抗體；二價及單價抗體；雙特異性或多特異性抗體；含有該等抗體之血清；已純化至不同程度之抗體；及完整抗體之任何功能均等物)亦可使用此項技術中可利用(以上所述)之資訊製備。

在一實施例中，用於偵測代表所取樣之細胞類型之對照生物標記的試劑一般可為可用於(在核酸或蛋白質水平)偵測樣本中已知標記的方法(諸如偵測上文所述之生物標記存在的方法)中之任何類型的試劑。特定言之，該試劑的特徵在於其可鑑別所分析之細胞類型的特異性標記，該標

記可陽性鑑別該細胞類型。舉例而言，在乳房腫瘤檢定中，需要篩檢乳房上皮細胞之生物標記表現量及/或生物活性量。因此，用於偵測對照標記的試劑可鑑別代表上皮細胞且較佳代表乳房上皮細胞的標記，以便區分該細胞與諸如纖維母細胞之其他細胞類型。該試劑增加本發明之檢定之準確性及特異性。用於偵測對照標記的該試劑包括(但不限於)：在嚴謹雜交條件下與編碼蛋白質標記之核酸分子雜交的探針；擴增該核酸分子的PCR引子；特異性結合靶分子上構形上獨特之位點的適體；及/或選擇性結合樣本中對照標記的抗體、其抗原結合片段或抗原結合肽。多種細胞標記的核酸及胺基酸序列此項技術中係已知的且可用於製備用於偵測的該等試劑。

可將本發明之檢定套組中用於偵測Ras生物標記及/或對照標記的試劑與可偵測標誌或可偵測標記接合。該標誌可為容許偵測用於偵測生物標記或對照標記之試劑的任何適當標誌，且包括(但不限於)可由光譜法、光化學法、生物化學法、免疫化學法、電方法、光學方法或化學方法偵測的任何組合物或標記。本發明中適用之標記包括用於用所標記之抗生蛋白鏈菌素接合物染色的生物素、磁性珠粒(例如，Dynabeads™)、螢光染料(例如，螢光素、得克薩斯紅(texas red)、若丹明(rhodamine)、綠色螢光蛋白及其類似物)、放射性標記(例如， ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^{32}P)、酶(例如，辣根過氧化物酶(horse radish peroxidase)、鹼性磷酸酶及通常用於ELISA中的其他酶)，及比色分析標記，

諸如膠體金或彩色玻璃或塑料(例如，聚苯乙烯、聚丙烯、乳膠等)珠粒。

此外，本發明之檢定套組中用於偵測之試劑可固定於基質上。該基質可包括任何適用於固定偵測試劑的基質，諸如上述任一偵測方法中所用的基質。簡言之，適於固定偵測試劑的基質包括可與偵測試劑形成鍵而不顯著影響偵測試劑偵測所要靶分子之活性及/或能力的任何固體支撐物，諸如任何固體有機物、生物聚合物或無機支撐物。例示性有機固體支撐物包括聚合物(諸如聚苯乙烯、耐綸、酚醛樹脂、丙烯酸系共聚物(例如，聚丙烯醯胺))、穩定化完好完整細胞及穩定化粗完整細胞/膜勻漿。例示性生物聚合物支撐物包括纖維素、葡聚糖(例如，Sephadex®)、瓊脂糖、膠原蛋白及甲殼素。例示性無機支撐物包括玻璃珠粒(多孔及無孔玻璃珠粒)、不銹鋼、金屬氧化物(例如，多孔陶瓷，諸如 ZrO_2 、 TiO_2 、 Al_2O_3 及 NiO)及沙。

本發明之篩檢方法

本發明之一實施例係關於鑑別適用於保護患者防止癌症之化合物的方法，此癌症帶有突變體Ras基因或表現具有本文所述之E76突變或E76突變與另一Ras突變(諸如G12)之組合之Ras蛋白。該方法包括在檢定中使用Ras E76蛋白或肽或編碼該蛋白質或肽的核酸分子作為標靶以便篩檢及選擇具有活性的化學化合物及/或生物化合物作為抗腫瘤治療劑，此係基於該化合物下調突變型*ras*基因表現、抑制其基因產物之活性或逆轉或補償突變型Ras蛋白之生物

活性的能力，諸如雖存在本文中所述之突變但仍引發Ras之GTP水解的化合物。在一實施例中，該方法包括使用Ras蛋白或肽或編碼該蛋白質或肽的核酸分子作為標靶，其中該Ras蛋白或肽在位置73、74、75、77或78中之任一處或多處具有突變或具有上述Ras突變之任一組合且尤其具有位置12及/或13處突變與位置59、61、73、74、75、76、77及/或78處突變之任一組合。

舉例而言，用於鑑別之候選化合物包括引發GTP酶活性的化合物，因而雖存在突變但突變體Ras中所結合的GTP仍水解為GDP，其中'組成性'Ras活性被中止，從而中止不受調節之細胞增殖信號。本文中提及抑制標靶係指抑制靶基因之表現與抑制其相應表現產物(蛋白質)之轉譯及/或活性中之一或兩者。鑑別方法亦涵蓋修飾靶生物活性的化合物，諸如引發或起始本發明之突變型Ras之GTP水解的上述化合物。該等化合物在本文中可稱為治療性化合物。

在一實施例中，欲鑑別之化合物包括調節、調適或模擬Ras-GAP的化合物，其中所調節、調適或模擬之Ras-GAP具有能夠使與本文中所述之任一突變體Ras蛋白(例如，Ras E76突變體、任何Ras 73-78突變體或本文中所述之任一組合突變體)結合之GTP水解，但不能使與野生型Ras結合之GTP水解的能力。在該態樣中，本文中所述之新穎突變係用於鑑別可在含有本文中所述之一或多種Ras突變之細胞(例如，腫瘤細胞)中恢復Ras GTP水解途徑之功能，由此阻止該等細胞不受控制之增殖及轉移，同時不影響"正

常"細胞(非癌變細胞)的化合物。該策略允許鑑別靶向腫瘤細胞但不引起因中斷非腫瘤細胞之正常細胞功能而導致問題的化合物。在該實施例中，化合物係藉由選擇使表現(天然或由重組方法)突變型Ras標靶之細胞恢復GTP水解但不在表現非突變型(野生型) Ras之細胞中引起GTP水解的化合物而得以鑑別。

在該實施例之一態樣中，治療化合物係藉由將本發明之靶蛋白質(例如，E76G Ras)(或天然或重組表現該蛋白質的細胞)暴露於候選化合物且量測化合物抑制(減小、降低、阻斷)該蛋白質之生物活性(或更特定言之該蛋白質導致細胞之不受限制之細胞生長或增殖的能力)的能力而得以鑑別。在一實施例中，候選化合物係因其起始或引發GTP水解且有效克服或補償本發明之突變體Ras之存在的能力而得以鑑別。量測GTP水解及GTP酶活性的方法在此項技術中係熟知的。

在該實施例之另一態樣中，將天然表現突變體ras基因或已用編碼突變型Ras蛋白之基因或其他重組核酸分子轉染的細胞株與各種化合物(亦稱為候選化合物、測試化合物或假定調節化合物)一起培育。可使用突變型*ras*基因的表現減少或其所編碼之產物的活性修飾來鑑別治療性化合物。舉例而言，可使表現突變體Ras的細胞與候選化合物接觸且如上所述鑑別引發GTP酶活性的化合物。該等化合物可因其在其中內源Ras-GAP與Ras之結合由Ras突變阻斷的條件下與Ras結合且活化GTP酶的能力而得以鑑別，及/

或當水解開始時可容許 γ -磷酸根自 Ras GTP 釋出。換言之，該檢定試圖偵測可克服 Ras 突變或突變組合之效應的化合物。或者，可使用多種類似無細胞檢定鑑別該等治療性化合物。若需要，則以此方式所鑑別之治療性化合物可接著在其他檢定中再測試以確認其活性。較佳選擇在表現野生型 Ras (不表現突變型 Ras) 之細胞中不會亦引發 GTP 水解的化合物。

在本發明之一實施例中，失控細胞生長之抑制劑係由以下步驟鑑別：使靶基因或其部分(亦即，突變型 E76G *ras* 基因)暴露於測試化合物；量測靶(E76G Ras)之表現；及選擇下調(減少、降低、抑制、阻斷)靶之表現或修飾靶之活性的化合物。舉例而言，可使假定抑制劑暴露於(內源或重組)表現靶基因的細胞。檢定中使用之較佳細胞包括天然表現靶基因或已用重組形式之靶基因(諸如包含編碼靶蛋白質或其適用片段之核酸序列的重組核酸分子)轉化的哺乳動物細胞。測定基因表現量的方法在此項技術中係熟知的。設計及鑑別抑制基因表現或其所編碼之蛋白質之生物活性之核酸分子的方法在此項技術中係熟知的。

在本發明之一實施例中，治療化合物係由以下步驟鑑別：使靶(例如，E76G Ras-GTP)暴露於候選化合物；量測候選化合物與該靶之結合；及選擇以所要濃度、親和力或親合力結合該靶之化合物。在一較佳實施例中，該檢定係在有助於促進該化合物與該靶之相互作用或結合的條件下執行。熟習此項技術者可基於檢定中所使用之靶及化合物

確定該等條件。在一實施例中，可在候選化合物存在及不存在之情況下、使用BIAcore機器測定複合物中靶蛋白質(由靶基因編碼的蛋白質)與天然配體之間的結合常數。舉例而言，可使靶蛋白質或其配體結合片段固定於基質上。使天然或合成配體與基質接觸以形成複合物。複合物之解離常數可藉由當使緩衝液流經晶片時監測折射率相對於時間之變化來測定(O'Shannessy等人，Anal. Biochem. 212:457-468 (1993)；Schuster等人，Nature 365:343-347 (1993))。使候選化合物在各種濃度下與複合物接觸且監測反應函數(例如，折射率相對於時間之變化)，可容許在測試化合物存在下測定複合物解離常數，且指示該候選化合物是否為該複合物之抑制劑或促效劑。或者，可使候選化合物與所固定之靶蛋白質及配體同時接觸，以瞭解候選化合物是抑制還是穩定配體與靶蛋白質之結合。

欲以本發明之方法篩檢的化合物包括已知有機化合物，諸如肽文庫之產物、核酸分子(例如，RNAi、核糖核酸酶、適體、反義核酸)、抗體及化學組合文庫之產物。亦可利用基於單獨或與另一組分複合的基因產物(例如，與GTP複合的突變體Ras)之結構的合理藥物設計來鑑別化合物。該等方法係為熟習此項技術者所已知且包括使用三維成像軟體程式。圖4說明例如由於兩處已知Ras突變而出現於Ras中的三維構形改變。適用於設計或選擇適用於本發明中之模擬物或其他治療性化合物的各種藥物設計方法揭示於Maulik等人，1997, *Molecular Biotechnology*:

Therapeutic Applications and Strategies, Wiley-Liss, Inc.

中，該文獻以引用方式全文併入本文中。

如本文中所使用，術語"測試化合物"、"假定抑制性化合物"或"假定調節化合物"係指在特定過程中具有未知或先前未瞭解之調節活性的化合物。因而，與鑑別化合物之方法有關的術語"鑑別"意欲包括由本發明之方法判定可適用作用於抑制細胞生長之目的之調節化合物的所有化合物。

使本發明之細胞、細胞溶胞物、核酸分子或蛋白質暴露於假定調節化合物或與假定調節化合物接觸(諸如藉由混合)的條件為任何適當的培養或檢定條件。在基於細胞之檢定之情形下，該等條件包括其中可培養細胞或在假定調節化合物存在及不存在之情況下可評估細胞溶胞物的有效培養基。本發明之細胞可培養於多種容器內，包括(但不限於)組織培養燒瓶、試管、微量滴定盤及皮氏培養皿。培養係在適合於細胞的溫度、pH及二氧化碳含量下進行。該等培養條件亦為熟習此項技術者所熟知。在考慮每個所接觸容器之細胞數目、投與至細胞之假定調節化合物之濃度、假定調節化合物與細胞一起培育之時間及投與至細胞之化合物之濃度的條件下，使細胞與假定調節化合物接觸。有效方案之確定可由熟習此項技術者基於諸如容器尺寸、容器內液體體積、已知適於培養用於檢定中之特定細胞類型之條件及所測試之假定調節化合物之化學組成(亦即大小、電荷等)的變數達成。假定調節化合物之較佳量

可包含96孔板中每孔介於約1 nM至約10 mM之間之假定調節化合物。

如本文中所使用，術語"表現"當結合偵測本發明之標靶之表現使用時係指偵測靶基因之轉錄及/或偵測由靶基因編碼之靶蛋白質之轉譯。偵測標靶之表現係指主動測定標靶表現與否的行為。其包括測定標靶表現與對照相比是否受到上調，與對照相比是否受到下調，或與對照相比是否未改變。因此，偵測表現之步驟並不需要標靶之表現事實上受到上調或下調，而是亦可包括偵測標靶之表現未曾改變(亦即，偵測無標靶表現或標靶之表現無改變)。轉錄物及/或蛋白質之表現係由此項技術中已知之多種方法中之任一種量測。對於RNA表現，方法包括(但不限於)：提取細胞mRNA，且使用經標記之與編碼本發明一或多種基因中之全部或部分之轉錄物雜交的探針進行北方墨點法分析；使用基因特異性引子、聚合酶鏈反應(PCR)及逆轉錄酶-聚合酶鏈反應(RT-PCR)擴增由本發明之一或多種基因所表現的mRNA，繼而由多種方法中之任一種定量偵測產物；自細胞提取總RNA，接著將其標記且用於探測排列於多種表面中之任一種上之編碼本發明之全部或部分基因的cDNA或寡核苷酸；原位雜交；及偵測報導基因。術語"量化"或"定量"當在量化基因之轉錄量之情形中使用時係指絕對定量或相對定量。絕對定量可藉由包括已知濃度之一或多種靶核酸且參考未知核酸與已知靶核酸之雜交強度(例如，經由產生標準曲線)來達成。或者，相對定量可藉

由比較兩種或兩種以上基因之間或兩次或兩次以上處理之間的雜交信號來達成，以定量雜交強度及(暗示)轉錄量之變化。

在一較佳實施例中，靶基因之表現係由聚合酶鏈反應量測。在另一實施例中，靶基因之表現係使用聚丙烯醯胺凝膠分析法、層析法或光譜法來量測。

在另一較佳實施例中，靶基因之表現係藉由量測所編碼之蛋白質之產生(量測蛋白質之轉譯)來量測。量測蛋白質之轉譯包括適用於偵測及/或量測細胞或細胞提取物中蛋白質的任何方法。該等方法包括(但不限於)：免疫印跡法(例如，西方墨點法)、酶聯免疫吸附檢定法(ELISA)、放射免疫檢定法(RIA)、免疫沉澱法、免疫組織化學法、免疫螢光法、螢光活化細胞分選法(FACS)及免疫螢光顯微術。尤其較佳之蛋白質偵測方法包括任何單細胞檢定法，包括免疫組織化學檢定及免疫螢光檢定。舉例而言，可使用偵測劑，諸如特異性識別(選擇性結合)由基因所編碼之蛋白質的抗體。該等方法在此項技術中係熟知的。

由上述方法所鑑別或設計的候選化合物可使用此項技術中已知的技術且視化合物之類型而定加以合成。用於製備非蛋白質化合物(包括有機化合物及無機化合物)的合成技術在此項技術中係熟知的。舉例而言，若肽較小，則化學合成方法較佳。舉例而言，該等方法包括熟知之化學程序，諸如液相或固相肽合成，或以經由習知溶液法偶合之蛋白質片段起始在溶液中半合成。該等方法在此項技術中

係熟知的且可見於該領域中以下一般著作及文章中，諸如：Merrifield, 1997, *Methods Enzymol.* 289:3-13；Wade等人，1993, *Australas Biotechnol.* 3(6):332-336；Wong等人，1991, *Experientia* 47(11-12):1123-1129；Carey等人，1991, *Ciba Found Symp.* 158:187-203；Plaue等人，1990, *Biologicals* 18(3):147-157；Bodanszky, 1985, *Int. J. Pept. Protein Res.* 25(5):449-474；或 H. Dugas 及 C. Penney, BIOORGANIC CHEMISTRY, (1981)之第54-92頁，所有該等文獻均以引用方式全文併入本文中。舉例而言，肽可利用市售肽合成儀及製造商所供應之合成循環、由固相方法合成。熟習此項技術者應瞭解，固相合成亦可使用FMOC策略及TFA/捕獲劑裂解混合物達成。為蛋白質或肽的化合物亦可使用此項技術中之重組DNA技術及標準方法製備，尤其若需要更大量之蛋白質時。

由該等方法所鑑別的任何化合物可用於製備供治療或預防癌症用之藥物或用於本文所述之其他方法或用途中。

以下實驗結果為說明之目的提供且不希望限制本發明之範疇。

實例

實例 1

以下實例描述鑑別在表現突變型Ras蛋白(Tarmogen)之完整的經熱殺死之酵母之第一期免疫治療試驗期間評估之腫瘤內的新Ras突變。

物質及方法(用於實例1及2中)：

患者。在用表現突變型Ras蛋白(Tarmogen)之完整的經熱殺死之酵母進行靶向分子免疫治療的第I期試驗(GlobeImmune, Inc.)中，募集到149名患有胰腺癌、結腸直腸癌或非小細胞肺癌的患者。針對*ras*突變對患者腫瘤之活組織檢查樣本進行基因型定型，以鑑別具有產物相關突變之受檢者募集於免疫治療試驗中。

組織樣本及基因組DNA分離。接受石蠟包埋塊或裝有自石蠟塊切下之切片之載片形式的各患者之腫瘤樣本。由LCM(雷射捕獲顯微術)或顯微解剖刀切碎法自經染色之(HistoGene染色溶液，Arcturus，CA) 6-8 μm 厚切片中分離出腫瘤細胞，接著藉由SDS-蛋白酶K處理及RNase A消化提取該等所分離之腫瘤細胞中的基因組DNA，繼而進行異丙醇沉澱。

PCR及*ras*定序。使用鉑Taq DNA聚合酶高保真度套組(Invitrogen, CA)，對K-ras、N-ras及H-ras之外顯子2及3執行巢式PCR。25 μL 外部PCR反應混合物包括100 ng模板DNA、1 X PCR緩衝液、50-100 pmol MgSO_4 、5 nmol之dNTP、10 pmol各外部引子及2.5單位之高保真度Taq DNA聚合酶。在94°C變性5分鐘起始熱循環，繼而35次三步循環，在94°C歷時30秒，在55°C歷時30秒且在68°C歷時50秒，且繼而在68°C最後培育10分鐘。用1 μL 外部PCR產物作為模板及20 pmol各內部引子、在總共50 μL 混合物中執行內部PCR反應。使用以下引子：

K-*ras*外顯子2外部前置引子：

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

K-*ras*外顯子2外部反置引子 :

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

K-*ras*外顯子2內部前置引子 :

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

K-*ras*外顯子2內部反置引子 :

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

K-*ras*外顯子3外部前置引子 :

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

K-*ras*外顯子3外部反置引子 :

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

K-*ras*外顯子3內部前置引子 :

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

K-*ras*外顯子3內部反置引子 :

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

N-*ras*外顯子2外部前置引子 :

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

N-*ras*外顯子2外部反置引子 :

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

N-*ras*外顯子2內部前置引子 :

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

N-*ras*外顯子2內部反置引子：

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

N-*ras*外顯子3外部前置引子：

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

N-*ras*外顯子3外部反置引子：

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

N-*ras*外顯子3內部前置引子：

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

N-*ras*外顯子3內部反置引子：

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

H-*ras*外顯子2外部前置引子：

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

H-*ras*外顯子2外部反置引子：

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

H-*ras*外顯子2內部前置引子：

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

H-*ras*外顯子2內部反置引子：

5'-ATTTAGGTGACACTATAGAACTCGCCCGCAGCAGCTGC-3'

(SEQ ID NO:35) ;

H-*ras*外顯子3外部前置引子 :

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

H-*ras*外顯子3外部反置引子 :

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

H-*ras*外顯子3內部前置引子 :

5'-TAATACGACTCACTATAGGGTGAACCTCCCCCACGGAAGG-3' (SEQ ID NO:38) ; 及

H-*ras*外顯子3內部反置引子 :

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

用 T7 引子序列在 5'端增補所有內部前置引子，且用 SP6 引子序列在 5'端增補所有內部反置引子。內部 PCR 產物在經由 1.5% 瓊脂糖電泳之後，用 QIA 快速凝膠提取套組 (Qiagen, CA) 純化。將所純化之 DNA 送往 CU 癌症中心 DNA 測序及分析中心 (CU Cancer Center DNA Sequencing & Analysis Core) 以使用 T7 及 SP6 引子進行兩股定序。

建構小鼠 K-*ras* 基因表現載體。使用來自 Invitrogen 之 Trizol 試劑 (Invitrogen, CA) 自 E9 小鼠肺上皮細胞株分離總 RNA。使用 m-*kras* 反置引子 :

5'-GCTCGGCTGCGGCCGCTCACTACATAACTGTACACCTTGTCT-3' (SEQ ID NO:40) 及 SuperScript™ III 逆轉錄酶套組 (Invitrogen, CA) 根據製造商之說明書，自 2.5 μg 總 RNA 逆轉錄小鼠 K-*ras* 基因之 cDNA。隨後用 m-*kras* 前置引子 :

5'-GGAATTCACCATGGGCACTGAGTATAAACTTGTGGTG-3' (SEQ ID NO:41)及設計成覆蓋小鼠*K-ras* cDNA之整個編碼區的m-*kras*反置引子，由PCR擴增十分之一的已反應等分試樣。以94℃培育5分鐘起始熱循環，繼而35次三步循環，在94℃歷時25秒，在55℃歷時25秒且在68℃歷時30秒。根據製造商之說明書將PCR產物選殖入pGEM-T載體(Promega, WI)中。此小鼠*k-ras*基因含有Q61R突變，接著藉由定位誘變製備野生型小鼠*k-ras*及含有G12V、E76G、E76K及G12VE76G突變之小鼠*k-ras*，且選殖入哺乳動物表現載體pUP之EcoRI及NotI位點內。使用m-*kras*前置引子、反置引子及以下引子：

*ras*Q61 5'-TACTCCTCTTGACCTGCTGT-3', (SEQ ID NO:42)

*ras*G76 5'-AAGAAAGCCCCCCCCAGTTCTC-3'; (SEQ ID NO:43)

*ras*V12

5'ACGGAATTCACCATGACTGAGTATAAACTTGTGGTGGTTGGAGCTGTTGGCGTAG-3', (SEQ ID NO:44)

*ras*K76 5'-AAGAAAGCCCTTCCCAGTTCTC-3'. (SEQ ID NO:45)

細胞培養及轉染。將BALB3T3細胞培養於含有10%新生小牛血清、50 U/ml青黴素及50 µg/ml鏈黴素之DMEM中。使用Effectene轉染試劑套組(Qiagen, CA)將WT、G12V、E76G、E76K及G12V+E76G *k-ras*表現質體轉染入BALB3T3細胞內。以G418選擇轉染細胞且藉由自培養板選擇純系(野生型)或自軟瓊脂選擇純系(G12V、E76G、E76K、G12V+E76G)將其純化。由RT-PCR及Ras蛋白之免

疫印跡法確認經轉染之野生型K-*ras* (WT)或突變型K-*ras*基因的表現。使用 Trizol 試劑自各轉染細胞純系分離總RNA，且使用 SuperScript™ III 逆轉錄酶套組 (Invitrogen, CA) 及 m-*kras* 反置引子逆擴增 *ras* 基因之 cDNA，接著使用 pUP 載體啟動子 5'-TTGGGTCGCGGTTCTTGT-3' (SEQ ID NO:46) 中的 m-*kras* 反置引子及前置引子由 PCR 擴增外源 *ras* 基因。使用 RIPA 溶解緩衝液 (Upstate, NY) 自各轉染細胞純系提取總蛋白質，且將蛋白質於 12% SDS-PAGE 凝膠 (Invitrogen, CA) 上解析，繼而轉移至硝化纖維膜且分別用抗-Ras 抗體 (Oncogene, MA) 及抗-GAPDH 抗體 (Abcam, MA) 點印。

軟瓊脂檢定。將 5×10^4 個細胞懸浮於含有 0.35% 低熔點瓊脂糖 (SeaPlaque 瓊脂糖, Cambres BioScience Rockland Inc, me) 的 DMEM 中，且將 10% 新生小牛血清 (NBCS) 覆蓋於含有 10% NBCS 的 0.5% 低熔點瓊脂糖底層上。生長 2-4 週之後，觀察該等集落或將其選入含有 10% NBCS 的液體 DMEM 培養基中。

致瘤性檢定。培養、收集各轉染體純系且將其懸浮於 PBS 中。

將 5×10^6 個細胞皮下注入 4-6 週齡 Balb/c 裸鼠中。在 30 天期間內每週兩次監測所注射之細胞，量測腫瘤且以 $3.142 \times (\text{長度}) \times (\text{寬度})^2 / 6$ 計算腫瘤體積。

結果

在此研究中，在表現突變型 Ras 蛋白 (Tarmogen) 之完整

的經熱殺死之酵母之第一期免疫治療試驗中，由巢式PCR擴增及直接測序，表徵來自149名患有胰腺癌(68%含有突變)、結腸直腸癌(40%具有突變)或NSCLC(9%具有突變)癌之受檢者之腫瘤的K-*ras*、N-*ras*及H-*ras* DNA序列中腫瘤相關突變之存在。在來自全部3種癌症類型的24名受檢者中偵測到密碼子76處之新*ras*突變，其中22名為E76G，同時各有1名受檢者腫瘤含有E76K或E76Q突變。8個腫瘤中鑑別出E76加上密碼子12或13處突變之雙組合。參見表1及2及圖1。

表1：密碼子76處突變之概述

	結腸直腸(85)			肺(33)			胰腺(31)			總計(149)
	K- <i>ras</i>	N- <i>ras</i>	H- <i>ras</i>	K- <i>ras</i>	N- <i>ras</i>	H- <i>ras</i>	K- <i>ras</i>	N- <i>ras</i>	H- <i>ras</i>	
E76G	2*		3*	3		1	2			
可能的 E76G[#]	5		1			1	4		1	
E76K		1								
E76Q	1									
總計	8*	1	4*	3	0	2	6	0	1	24

*一個樣本在K-*ras*與H-*ras*中均具有E76G；[#]偵測到E76突變的信號較弱，可能係由於活組織檢查樣本中腫瘤細胞的豐度低。

表 2：熱點 *ras* 突變 (密碼子 12、13 及 61) 之概述

癌症類型	# 每種癌症 所篩檢的 樣本	突變														
		# 具有 <i>ras</i> 突 變的受檢 者(%每種 癌症)	密碼子12						密碼子13		密碼子61					
			總計	G12V	G12C	G12D	G12R	G12S	G12A	總計	G13D	總計	Q61R	Q61L	Q61H	Q61P
結腸直腸	85	34 (40%)	29 (85.3%)	10	4	10	0	3	2	3	3	2	0	1	1	0
肺	33	3 (9.1%)	2 (66.7%)	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
胰腺	31	21 (67.7%)	19 (95%)	6	0	10	3	0	0	0	0	2	1	0	1	0
總計	149	58 (38.9%)	50 (86.2%)	17	6	20	3	3	2	3	3	5	1	1	2	1

實例 2

以下實例證明 Ras E76 突變正在轉化且進一步證明 Ras E76 突變與 Ras G12 突變協同作用以增強腫瘤之致癌性。

在非臨床研究中已證明 Ras E76G 及 E76K 突變正轉化。特別關注的是，偶合密碼子 76 與 12 突變導致腫瘤生長協同作用。將 G12V、E76G 及 E76K 單突變或 G12V-E76G 雙突變引入小鼠 K-ras 基因中且接著轉染入 BALB/3T3 纖維母細胞中。用含有 G12V 或 E76K 單突變或 G12V-E76G 雙突變的 ras 轉染細胞，在軟瓊脂中形成集落(參見圖 2A 及 2B 及表 3)。

表 3：作為轉化突變之 E76

純系(K-ras 基因型轉染之 BALB/3T3 細胞)	所轉染之 ras 基因的 mRNA 轉錄物(由 RT-PCR)	外源 Ras 蛋白表現(西方墨點法)	軟瓊脂中之集落形成
野生型 (WT)	+	+	-
G12V	+	+	++++
G12V + E76G	+	+	+++++
E76G	+	+	-
E76K	+	+	++
pUP (空載體)	-	-	-
Balb3T3 (未經轉染)	-	-	-

將經野生型或突變體 K-ras 基因轉染的 BALB/3T3 細胞皮下注射 (s.c.) 入 BALB/c 裸鼠內。圖 3A 及 3B 為該檢定之重複。橫棒指示每組 3 隻小鼠的標準偏差。圖 3C 為對圖 3A 中展示之研究細節之展開，以展示個別經 E76 突變體轉染之細胞相對於未經轉染之(野生型)BALB/3T3 細胞的生長。

儘管具有 E76 單突變之腫瘤生長顯著低於經轉染以表現 G12V 突變型 K-Ras 的細胞，但與經野生型 K-Ras 轉染的細胞相比，K-Ras 中含有 E76G 或 E76K 單突變之該等細胞在裸

鼠中產生可偵測生長(參見圖3C)。與含有任一單突變的細胞相比，經含有G12V+E76G Ras雙突變之Ras轉染的細胞導致腫瘤生長加快(參見圖3A-3C)。

實例3

以下實驗描述包含酵母媒介及包含Ras E76突變之融合蛋白的基於酵母之疫苗。

將釀酒酵母經工程設計以在銅誘導性啟動子*CUP1*控制下表現多域突變體Ras融合蛋白。融合蛋白為具有以下N-末端至C-末端同框融合之序列元件的單個多肽(融合蛋白之胺基酸序列在本文中由SEQ ID NO:14表示)：1)使細胞培養期間新生酵母所表現之異源蛋白質具有穩定性的序列MADEAP (SEQ ID NO:1) (SEQ ID NO:14之位置1至6)；2)含有相對於野生型Ras蛋白之胺基酸位置12的Ras片段，其中位置12處之甘胺酸係經半胱胺酸取代(SEQ ID NO:14之位置7-52；其中位置12突變位於SEQ ID NO:14之位置17處)；3)含有相對於野生型Ras蛋白之胺基酸位置61的Ras片段，其中位置61處之甘胺酸係經精胺酸取代(SEQ ID NO:14之位置53-91；其中位置61突變位於SEQ ID NO:14之位置66處)；4)含有相對於野生型Ras蛋白之胺基酸位置12的Ras片段，其中位置12處之甘胺酸係經天冬胺酸取代(SEQ ID NO:14之位置92-137；其中位置12突變位於SEQ ID NO:14之位置102處)；5)含有相對於野生型Ras蛋白之胺基酸位置12的Ras片段，其中位置12處之甘胺酸係經纈胺酸取代(SEQ ID NO:14之位置138-183；其中位置12突變

位於SEQ ID NO:14之位置148處)；6)含有相對於野生型Ras蛋白之胺基酸位置12的Ras片段，其中位置12處之甘胺酸係經精胺酸取代(SEQ ID NO:14之位置184-229；其中位置12突變位於SEQ ID NO:14之位置194處)；及7)含有相對於野生型Ras蛋白之胺基酸位置76的Ras片段，其中位置76處之麩胺酸係經甘胺酸取代(SEQ ID NO:14之位置230-275；位置76突變位於SEQ ID NO:14之位置258處)。

對表現Ras融合蛋白的酵母進行培養及誘導，且偵測蛋白質之表現。

將該等酵母投與A/J小鼠(其中25-50個肺腫瘤係由胺基甲酸酯暴露自發誘導)，其引發RAs之密碼子61 (80-90%之腫瘤)及密碼子12 (~10%之腫瘤)突變或引發不依賴於Ras突變形成之腫瘤(<10%腫瘤)。疫苗之投藥係在胺基甲酸酯誘導後2或5週藉由皮下投藥執行。與未接受疫苗之小鼠相比，疫苗以統計學上顯著之方式降低小鼠之腫瘤負荷，其指示酵母疫苗能夠引起靶向含有至少一種由該融合蛋白構築體所編碼之突變之腫瘤的抗腫瘤免疫反應。

在測試誘發針對含有位置76處突變之Ras之免疫反應的另一實驗中，將該等酵母投與其中腫瘤已起始或即將起始的小鼠中，其中腫瘤細胞經工程設計以表現包含E76G突變的Ras或天然表現包含E76G突變的Ras。評估疫苗對降低腫瘤負荷的作用。此外，自小鼠分離T細胞且測試其殺死表現包含E76G突變之Ras之靶細胞的能力(在CTL檢定中)，及/或響應由抗原呈遞細胞呈遞包含E76G突變之Ras

而增殖的能力。與不投與疫苗相比，預期小鼠的腫瘤負荷降低。類似地，預期自該等小鼠分離的T細胞能夠以抗原特異性方式殺死表現突變型Ras蛋白的標靶且響應突變型Ras蛋白而增殖。

實例 4

以下實驗描述包含酵母媒介及包含Ras E76突變之融合蛋白的基於酵母之疫苗。

將釀酒酵母經工程設計以在啟動子控制下表現雙域突變體Ras融合蛋白。該融合蛋白為具有以下N-末端至C-末端同框融合之序列元件的單個多肽(融合蛋白之胺基酸序列在本文中由SEQ ID NO:15表示)：1)使細胞培養期間新生酵母所表現之異源蛋白具有穩定性的序列MADEAP (SEQ ID NO:1) (SEQ ID NO:15之位置1至6)；2)含有相對於野生型Ras蛋白之胺基酸位置12的Ras片段，其中位置12處之甘胺酸係經精胺酸取代(SEQ ID NO:15之位置7-52；其中位置12突變位於SEQ ID NO:15之位置17處)；及7)含有相對於野生型Ras蛋白之胺基酸位置76的Ras片段，其中位置76處之麩胺酸係經甘胺酸取代(SEQ ID NO:15之位置53-98；其中位置76突變位於SEQ ID NO:15之位置81處)。

對表現Ras融合蛋白的酵母進行培養及誘導，且偵測蛋白質之表現。

在測試誘發針對含有位置76處突變之Ras之免疫反應的另一實驗中，將該等酵母投與其中腫瘤已起始或即將起始的小鼠中，其中腫瘤細胞經工程設計以表現包含E76G突

變的 Ras 或天然表現包含 E76G 突變的 Ras。評估疫苗對降低腫瘤負荷的作用。此外，自小鼠分離 T 細胞且測試其殺死表現包含 E76G 突變之 Ras 之靶細胞的能力 (在 CTL 檢定中)，及 / 或響應由抗原呈遞細胞呈遞包含 E76G 突變之 Ras 而增殖的能力。與不投與疫苗相比，預期小鼠中腫瘤負荷降低。類似地，預期自該等小鼠分離的 T 細胞能夠以抗原特異性方式殺死表現突變型 Ras 蛋白的標靶且響應突變型 Ras 蛋白而增殖。

儘管本發明之各種實施例已經詳述，但對熟習此項技術者顯而易見，將存在對彼等實施例之修改及改進。然而，應清楚瞭解，該等修改及改進均處於本發明之範疇內，如下申請專利範圍中所述。

【圖式簡單說明】

圖 1 為展示藉由繪示來自患有結腸直腸癌、胰腺癌或非小細胞肺癌之患者之腫瘤基因型所發現的 Ras 突變目錄的圖表。

圖 2A 及 2B 為展示軟瓊脂中例示性陰性 (圖 2A，未轉染之 BALB/3T3 小鼠細胞) 及陽性 (圖 2B，經 G12V+E76G Ras 轉染之 BALB/3T3 小鼠細胞純系) 集落形成之細胞生長軟瓊脂檢定的數位影像。癌症 ("已轉化") 上皮細胞能夠在軟瓊脂中生長，而未轉化之細胞在軟瓊脂中不生長。

圖 3A 及 3B 為展示兩個證明在 Balb/c 裸鼠中在密碼子 12 與密碼子 76 處均攜有 Ras 突變之腫瘤之生長中的致癌協同作用的獨立實驗的曲線圖。

圖 3C 為展示個別經 E76 突變體轉染之細胞相對於未經轉染之(野生型)BALB/3T3 細胞的生長之圖 3A 中之研究的詳述細節。

圖 4 為與 H-Ras 之密碼子 61 突變體形式(Q61L)的結構(右方)比較說明 H-Ras 之密碼子 12 突變體形式(G12D)的晶體結構(左方)的示意圖。箭頭指向為所示三級結構中之胺基酸 12、61 及 76 之估計位置。

序列表

<110> 美國環球免疫公司
<120> RAS 突變及其與其相關之組合物及方法
<130> 3923-13
<140> 096108338
<141> 2007-03-09
<150> 60/786,568
<151> 2006-03-27

<160> 46
<170> PatentIn version 3.4
<210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 1
Met Ala Asp Glu Ala Pro
1 5

<210> 2
<211> 570
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(570)

<400> 2
atg act gaa tat aaa ctt gtg gta gtt gga gct ggt ggc gta ggc aag 48
Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
1 5 10 15
agt gcc ttg acg ata cag cta att cag aat cat ttt gtg gac gaa tat 96
Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
20 25 30
gat cca aca ata gag gat tcc tac agg aag caa gta gta att gat gga 144
Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
35 40 45
gaa acc tgt ctc ttg gat att ctc gac aca gca ggt caa gag gag tac 192
Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
50 55 60
agt gca atg agg gac cag tac atg agg act ggg gag ggc ttt ctt tgt 240
Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
65 70 75 80
gta ttt gcc ata aat aat act aaa tca ttt gaa gat att cac cat tat 288
Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr
85 90 95
aga gaa caa att aaa aga gtt aag gac tct gaa gat gta cct atg gtc 336
Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val
100 105 110
cta gta gga aat aaa tgt gat ttg cct tct aga aca gta gac aca aaa 384
Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys
115 120 125

cag gct cag gac tta gca aga agt tat gga att cct ttt att gaa aca 432
Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
130 135 140

tca gca aag aca aga cag aga gtg gag gat gct ttt tat aca ttg gtg 480
Ser Ala Lys Thr Arg Gln Arg Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
145 150 155 160

agg gag atc cga caa tac aga ttg aaa aaa atc agc aaa gaa gaa aag 528
Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Leu Lys Lys Ile Ser Lys Glu Glu Lys
165 170 175

act cct ggc tgt gtg aaa att aaa aaa tgc att ata atg taa 570
Thr Pro Gly Cys Val Lys Ile Lys Lys Cys Ile Ile Met
180 185

<210> 3
<211> 189
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 4
<211> 567

<212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(567)

<400> 4
 atg act gag tat aaa ctt gtg gtg gtt gga gct ggt ggc gta ggc aag 48
 Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
 1 5 10 15
 agc gcc ttg acg ata cag cta att cag aat cac ttt gtg gat gag tac 96
 Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
 20 25 30
 gac cct acg ata gag gac tcc tac agg aaa caa gta gta att gat gga 144
 Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
 35 40 45
 gaa acc tgt ctc ttg gat att ctc gac aca gca ggt caa gag gag tac 192
 Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
 50 55 60
 tgt gca atg agg gac cag tac atg aga act ggg gag ggc ttt ctt tgt 240
 Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
 65 70 75 80
 gta ttt gcc ata aat aat act aaa tca ttt gaa gat att cac cat tat 288
 Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr
 85 90 95
 aga gaa caa att aaa aga gta aag gac tct gaa gat gtg cct atg gtc 336
 Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val
 100 105 110
 ctg gta ggg aat aag tgt gat ttg cct tct aga aca gta gac acg aaa 384
 Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys
 115 120 125
 cag gct cag gag tta gca agg agt tac ggg att ccg ttc att gag acc 432
 Gln Ala Gln Glu Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
 130 135 140
 tca gca aag aca aga cag ggt gtt gac gat gcc ttc tat aca tta gtc 480
 Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Asp Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
 145 150 155 160
 cga gaa att cga aaa cat aaa gaa aag atg agc aaa gat ggg aag aag 528
 Arg Glu Ile Arg Lys His Lys Glu Lys Met Ser Lys Asp Gly Lys Lys
 165 170 175
 aag aag aag aag tca agg aca agg tgt aca gtt atg tga 567
 Lys Lys Lys Lys Ser Arg Thr Arg Cys Thr Val Met
 180 185

<210> 5
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 5
 Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
 1 5 10 15
 Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
 20 25 30
 Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
 35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

Arg Glu Ile Arg Lys His Lys Glu Lys Met Ser Lys Asp Gly Lys Lys
165 170 175

Lys Lys Lys Lys Ser Arg Thr Arg Cys Thr Val Met
180 185

<210> 6
<211> 570
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(570)

<400> 6
atg acg gaa tat aag ctg gtg gtg gtg ggc gcc ggc ggt gtg ggc aag 48
Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
5 10 15
agt gcg ctg acc atc cag ctg atc cag aac cat ttt gtg gac gaa tac 96
Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
20 25 30
gac ccc act ata gag gat tcc tac cgg aag cag gtg gtc att gat ggg 144
Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
35 40 45
gag acg tgc ctg ttg gac atc ctg gat acc gcc ggc cag gag gag tac 192
Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
50 55 60
agc gcc atg cgg gac cag tac atg cgc acc ggg gag ggc ttc ctg tgt 240
Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
65 70 75 80
gtg ttt gcc atc aac aac acc aag tct ttt gag gac atc cac cag tac 288
Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His Gln Tyr
85 90 95
agg gag cag atc aaa cgg gtg aag gac tcg gat gac gtg ccc atg gtg 336
Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val

100	105	110	
ctg gtg ggg aac aag tgt gac Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp 115	ctg gct gca cgc act Leu Ala Ala Arg Thr 120	gtg gaa tct cgg Val Glu Ser Arg 125	384
cag gct cag gac ctc gcc cga Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg 130	agc tac ggc atc Ser Tyr Gly Ile 135	ccc tac atc gag acc Pro Tyr Ile Glu Thr 140	432
tcg gcc aag acc cgg cag gga Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly 145	gtg gag gat gcc ttc Val Glu Asp Ala Phe 150	tac acg ttg gtg Tyr Thr Leu Val 155	480
cgt gag atc cgg cag cac aag Arg Glu Ile Arg Gln His Lys 165	ctg cgg aag ctg aac cct Leu Arg Lys Leu Asn Pro 170	cct gat gag Pro Pro Asp Glu 175	528
agt ggc ccc ggc tgc atg agc Ser Gly Pro Gly Cys Met Ser 180	tgc aag tgt gtg ctc tcc Cys Lys Cys Val Leu Ser 185	tga	570

<210> 7
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

180

185

<210> 8
 <211> 570
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(570)

<400> 8
 atg aca gaa tac aag ctt gtg gtg gtg ggc gct gga ggc gtg gga aag 48
 Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
 1 5 10 15
 agt gcc ctg acc atc cag ctg atc cag aac cac ttt gtg gac gag tat 96
 Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
 20 25 30
 gat ccc act ata gag gac tcc tac cgg aaa cag gtg gtc att gat ggg 144
 Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
 35 40 45
 gag aca tgt cta ctg gac tac tta gac aca gca ggt caa gaa gag tat 192
 Glu Thr Cys Leu Leu Asp Tyr Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
 50 55 60
 agt gcc atg cgg gac cag tac atg cgc aca ggg gag ggc ttc ctc tgt 240
 Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
 65 70 75 80
 gla ttt gcc atc aac aac acc aag tcc ttc gag gac atc cat cag tac 288
 Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His Gln Tyr
 85 90 95
 agg gag cag atc aag cgg gtg aaa gat tca gat gat gtg cca atg gtg 336
 Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val
 100 105 110
 ctg gtg ggc aac aag tgt gac ctg gct gct cgc act gtt gag tct cgg 384
 Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Ala Ala Arg Thr Val Glu Ser Arg
 115 120 125
 cag gcc cag gac ctt gct cgc agc tat ggc atc ccc tac att gaa aca 432
 Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Tyr Ile Glu Thr
 130 135 140
 ca gcc aag acc cgg cag ggc gtg gag gat gcc ttc tat aca cta gtc 480
 Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
 145 150 155 160
 cgt gag att cgg cag cat aaa ttg cgg aaa ctg aac cca ccc gat gag 528
 Arg Glu Ile Arg Gln His Lys Leu Arg Lys Leu Asn Pro Pro Asp Glu
 165 170 175
 agt ggt cct ggc tgc atg agc tgc aaa tgt gtg ctg tcc tga 570
 Ser Gly Pro Gly Cys Met Ser Cys Lys Cys Val Leu Ser
 180 185

<210> 9
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 9

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

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

202530

Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
354045

Glu Thr Cys Leu Leu Asp Tyr Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
505560

Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
65707580

Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His Gln Tyr
859095

Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val
100105110

Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Ala Ala Arg Thr Val Glu Ser Arg
115120125

Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Tyr Ile Glu Thr
130135140

Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
145150155160

Arg Glu Ile Arg Gln His Lys Leu Arg Lys Leu Asn Pro Pro Asp Glu
165170175

Ser Gly Pro Gly Cys Met Ser Cys Lys Cys Val Leu Ser
180185

<210> 10
<211> 570
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(570)

<400> 10

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

agc gca ctg aca atc cag cta atc cag aac cac ttt gta gat gaa tat 96
Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
202530

gat ccc acc ata gag gat tct tac aga aaa caa gtg gtt ata gat ggt 144
Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
354045

gaa acc tgt ttg ttg gac ata ctg gat aca gct gga caa gaa gag tac 192
Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
505560

agt gcc atg aga gac caa tac atg agg aca ggc gaa ggc ttc ctc tgt 240
Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
65707580

gta ttt gcc atc aat aat agc aag tca ttt gcg gat att aac ctc tac 288

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

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

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

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

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

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

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

<210> 11
<211> 189
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 12
<211> 582
<212> DNA
<213> 小家鼠

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

<400> 12	
atg act gag tac aaa ctg gtg gtg gtt gga gca ggt ggt gtt ggg aaa	48
Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys	
1 5 10 15	
agc gcc ctg acg atc cag cta atc cag aac cac ttt gtg gat gaa tat	96
Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr	
20 25 30	
gat ccc acc ata gag gat tct tac cga aag caa gtg gtg att gat ggt	144
Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly	
35 40 45	
gag acc tgc ctg ctg gac ata ctg gac aca gct gga caa gag gag tac	192
Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr	
50 55 60	
agt gcc atg aga gac cag tac atg agg aca ggc gaa ggg ttc ctc tgt	240
Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys	
65 70 75 80	
gla ttt gcc atc aat aat agc aaa tca ttt gca gat att aac ctc tac	288
Val Phe Ala Ile Asn Asn Ser Lys Ser Phe Ala Asp Ile Asn Leu Tyr	
85 90 95	
agg gag caa att aag cgt gtg aaa gat tct gat gat gtc ccc atg gtg	336
Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val	
100 105 110	
ctg gta ggc aac aag tgt gac ttg cca aca agg aca gtt gac aca aag	384
Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Thr Arg Thr Val Asp Thr Lys	
115 120 125	
aa gcc cac gaa ctg gcc aag agt tac gga att cca ttc att gag acc	432
Gln Ala His Glu Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr	
130 135 140	
tca gcc aag acc cga cag ggt gtg gag gat gcc ttt tac aca ctg gta	480
Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val	
145 150 155 160	
agg gag ata cgc cag tac cga ttg aaa aag ctc aac agc agt gac gat	528
Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Leu Lys Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asp	
165 170 175	
ggc act caa ggt tgt atg ggg tcg ccc tgt gtg ctg atg tgt aag aca	576
Gly Thr Gln Gly Cys Met Gly Ser Pro Cys Val Leu Met Cys Lys Thr	
180 185 190	
ctt tga	582
Leu	

<210> 13
<211> 193
<212> PRT

200806789

<213> 小家鼠

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu

<210> 14

<211> 275

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 14

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

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

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

35 40 45
 Val Val Ile Asp Gly Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala
 50 55 60
 Gly Arg Glu Glu Tyr Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly
 65 70 75 80
 Glu Gly Phe Leu Cys Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Glu Tyr Lys Leu
 85 90 95
 Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln
 100 105 110
 Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr Asp Pro Thr Ile Glu Asp
 115 120 125
 Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val
 130 135 140
 Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile
 145 150 155 160
 Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr
 165 170 175
 Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly
 180 185 190
 Ala Arg Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn
 195 200 205
 His Phe Val Asp Glu Tyr Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys
 210 215 220
 Gln Val Val Ile Asp Gly Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr
 225 230 235 240
 Ala Gly Gln Glu Glu Tyr Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr
 245 250 255
 Gly Gly Gly Phe Leu Cys Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe
 260 265 270
 Glu Asp Ile
 275
 <210> 15
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 合成
 <400> 15
 Met Ala Asp Glu Ala Pro Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala
 1 5 10 15

Arg Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His
20 25 30
Phe Val Asp Glu Tyr Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln
35 40 45
Val Val Ile Asp Gly Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala
50 55 60
Gly Gln Glu Glu Tyr Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly
65 70 75 80
Gly Gly Phe Leu Cys Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu
85 90 95

Asp Ile

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 16
aggtaggttt gtattaaaag 20

<210> 17
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 17
tcatgaaaaa ggtcagag 18

<210> 18
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 18
taatacgact cactataggg tgtgtgacat gttctaata 38

<210> 19
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 19
atttaggtga cactatagaa gaatggtcct gcaccagtaa 40

<210> 20

<211> 18
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 20
tgagtgtgat ataacacc 18

<210> 21
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 21
ggcattagca aagactca 18

<210> 22
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 22
taatacgact cactataggg tgcactgtaa taatccag 38

<210> 23
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 23
atttaggtga cactatagaa attactcctt aatgtcagc 39

<210> 24
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 24
atggaaggtc acactaggg 19

<210> 25
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 25
aagatgatcc gacaagtg 18

<210> 26
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工

<220>		
<223>	合成	
<400>	26	
	taatacgact cactataggg agtactgtag atgtggctcg	40
<210>	27	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成	
<400>	27	
	atttaggtga cactatagaa gagacaggat caggtcagcg	40
<210>	28	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成	
<400>	28	
	tggcaatagc attgcattc	19
<210>	29	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成	
<400>	29	
	ggtaacctca ttccccca	18
<210>	30	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成	
<400>	30	
	taatacgact cactataggg ttgaacttcc ctccctccct g	41
<210>	31	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成	
<400>	31	
	atttaggtga cactatagaa ttcagaacac aaagatca	38
<210>	32	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成	

<400> 32 ttggcaggtg gggcaggaga	20
<210> 33 <211> 18 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成	
<400> 33 cctatcctgg ctgtgtcc	18
<210> 34 <211> 37 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成	
<400> 34 taatacgact cactataggg aggagaccct gtaggag	37
<210> 35 <211> 38 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成	
<400> 35 atttaggtga cactatagaa ctcgcccga gcagctgc	38
<210> 36 <211> 17 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成	
<400> 36 accagggaga ggctggc	17
<210> 37 <211> 18 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成	
<400> 37 ctcccgggcc agcctcac	18
<210> 38 <211> 40 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成	
<400> 38 taatacgact cactataggg tgaactcccc ccacggaagg	40

<210>	39	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成	
<400>	39	
	atttaggtga cactatagaa gtacacctgt actggtgga	39
<210>	40	
<211>	43	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成	
<400>	40	
	gctcggcigc ggccgcacac tacataactg tacacctgt cct	43
<210>	41	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成	
<400>	41	
	ggaattcacc atgggcactg agtataaact tgtggtg	37
<210>	42	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成	
<400>	42	
	tactcctctt gacctgcigt	20
<210>	43	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成	
<400>	43	
	aagaaagccc cccccagttc tc	22
<210>	44	
<211>	55	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成	
<400>	44	
	acggaattca ccatgactga gtataaactt gtgggtgltg gagctgltgg cgtag	55
<210>	45	

<211> 22
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 45
aagaaagccc ttcccagttc tc 22

<210> 46
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 46
ttgggtcgcg gttcttgt 18

五、中文發明摘要：

本發明揭示新發現的 Ras 突變及突變組合；含有該等突變的蛋白質及肽及融合蛋白；編碼該等蛋白質、肽及融合蛋白的核酸分子；及與使用該等突變有關的多種工具及診斷、治療及篩檢方法。

六、英文發明摘要：

十、申請專利範圍：

1. 一種分離核酸分子，其包含一個核酸序列編碼包含突變體Ras蛋白中至少5個連續胺基酸之胺基酸序列，其中該胺基酸序列含有相對於野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的胺基酸位置76，且其中與野生型蛋白質相比，位置76處之胺基酸突變。
2. 如請求項1之分離核酸分子，其中位置76處之該胺基酸係由麩胺酸突變為選自由甘胺酸、離胺酸及麩醯胺酸組成之群的非麩胺酸胺基酸殘基。
3. 如請求項2之分離核酸分子，其中該非麩胺酸胺基酸殘基為甘胺酸。
4. 如請求項1之分離核酸分子，其中該胺基酸序列因該SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13中位置76處之麩胺酸經非麩胺酸胺基酸取代而與SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13中之任一者不同。
5. 如請求項1之分離核酸分子，其中該胺基酸序列進一步包含突變體Ras蛋白中之至少5個連續胺基酸殘基，其中該胺基酸序列含有選自由相對於野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白之胺基酸位置12、13、59及61組成之群的胺基酸位置，且其中與野生型蛋白質相比，該位置之該胺基酸突變。
6. 如請求項1之分離核酸分子，其中該胺基酸序列進一步

包含突變體Ras蛋白中之至少5個連續胺基酸，其中該胺基酸序列含有相對於野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白之位置12處的胺基酸，且其中與野生型蛋白質相比，位置12處之該胺基酸突變。

7. 如請求項6之分離核酸分子，其中位置12或13處之該胺基酸係由甘胺酸突變為非甘胺酸胺基酸殘基。
8. 如請求項6之分離核酸分子，其中位置12處之該胺基酸係由甘胺酸突變為非甘胺酸胺基酸殘基。
9. 如請求項7或請求項8之分離核酸分子，其中該非甘胺酸胺基酸殘基係選自由纈胺酸、半胱胺酸、天冬胺酸、精胺酸、絲胺酸及丙胺酸組成之群。
10. 如請求項1之分離核酸分子，其中該核酸序列編碼包含兩個或兩個以上域的融合蛋白，其中該等域之一包含在位置76處突變之突變體Ras蛋白的至少5個胺基酸，及其中其他各域係由一個免疫原組成。
11. 如請求項10之分離核酸分子，其中該免疫原為腫瘤抗原。
12. 如請求項11之分離核酸分子，其中該腫瘤抗原為相對於野生型Ras胺基酸序列包含至少一個突變的Ras蛋白或其免疫原片段。
13. 如請求項12之分離核酸分子，其中該腫瘤抗原為包含相對於野生型Ras胺基酸序列之位置12或13的Ras蛋白或其免疫原片段，其中位置12或13處之該胺基酸係由甘胺酸殘基突變為非甘胺酸殘基。

14. 如請求項10之分離核酸分子，其中該腫瘤抗原係選自由以下肽組成之群：(a)包含Ras蛋白之至少位置8-16的肽，其中相對於野生型Ras蛋白位置12處之該胺基酸殘基突變；(b)包含Ras蛋白之至少位置9-17的肽，其中相對於野生型Ras蛋白位置13處之該胺基酸殘基突變；(c)包含Ras蛋白之至少位置55-63的肽，其中相對於野生型Ras蛋白位置59處之該胺基酸殘基突變；(d)包含Ras蛋白之至少位置57-65的肽，其中相對於野生型Ras蛋白位置61處之該胺基酸殘基突變；(e)包含Ras蛋白之至少位置69-77的肽，其中相對於野生型Ras蛋白位置73處之該胺基酸殘基突變；(f)包含Ras蛋白之至少位置70-78的肽，其中相對於野生型Ras蛋白位置74處之該胺基酸殘基突變；(g)包含Ras蛋白之至少位置71-79的肽，其中相對於野生型Ras蛋白位置75處之該胺基酸殘基突變；(h)包含Ras蛋白之至少位置73-81的肽，其中相對於野生型Ras蛋白位置77處之該胺基酸殘基突變；及(i)包含Ras蛋白之至少位置74-82的肽，其中相對於野生型Ras蛋白位置78處之該胺基酸殘基突變。
15. 如請求項1之分離核酸分子，其中該核酸序列編碼包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列的融合蛋白。
16. 如請求項1之分離核酸分子，其中該核酸序列編碼包含SEQ ID NO:15之胺基酸序列的融合蛋白。
17. 一種分離核酸分子，其與如請求項1至16中任一項之核酸序列完全互補。

18. 如請求項1至8及10至17中任一項之分離核酸分子，其中該核酸分子為寡核苷酸探針或引子。
19. 一種重組核酸分子，其包含如請求項1至16中任一項之分離核酸分子，與至少一個表現控制序列操作性連接。
20. 一種重組細胞，其已經如請求項19之重組核酸分子轉染。
21. 如請求項20之重組細胞，其中該細胞為酵母。
22. 一種分離蛋白質或肽，其係由如請求項1至16中任一項之分離核酸分子編碼。
23. 如請求項22之分離蛋白質或肽，其中該分離蛋白質或肽為融合蛋白之部分。
24. 一種疫苗，其包含如請求項1至16中任一項之核酸分子。
25. 一種疫苗，其包含如請求項22之蛋白質或肽。
26. 如請求項25之疫苗，其中該疫苗進一步包含酵母媒介。
27. 如請求項26之疫苗，其中該酵母媒介重組表現該蛋白質或肽。
28. 如請求項26之疫苗，其中該疫苗進一步包含樹突狀細胞，其中該樹突狀細胞在細胞內載有該酵母媒介及該蛋白質或肽。
29. 一種疫苗，其包含：
 - a) 酵母媒介；及
 - b) 融合蛋白，其包含突變體Ras蛋白或其片段，其中該蛋白質或其片段含有相對於野生型K-ras、N-ras或H-ras

蛋白的胺基酸位置76，且其中與野生型蛋白質相比，位置76處之該胺基酸突變，其中該融合蛋白之表現係在*Cup1*啟動子之控制下；

其中該融合蛋白係由該酵母媒介表現。

30. 如請求項29之疫苗，其中該融合蛋白進一步包含第二突變體Ras蛋白或其片段，其中該第二蛋白質或其片段含有相對於野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的胺基酸位置12，且其中與該野生型蛋白質相比，位置12處之該胺基酸突變。

31. 如請求項29之疫苗，其中該融合蛋白包含同框融合之以下蛋白質或片段：

i) 突變體Ras蛋白或其片段，其中該蛋白質或片段含有相對於野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的胺基酸位置12，且其中位置12處之甘胺酸係經半胱胺酸取代；

ii) 突變體Ras蛋白或其片段，其中該蛋白質或片段含有相對於野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的胺基酸位置61，且其中位置61處之麩醯胺酸係經精胺酸取代；

iii) 突變體Ras蛋白或其片段，其中該蛋白質或片段含有相對於野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的胺基酸位置12，且其中位置12處之甘胺酸係經天冬胺酸取代；

iv) 突變體Ras蛋白或其片段，其中該蛋白質或片段含有相對於野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的胺基酸

位置12，且其中位置12處之甘胺酸係經纈胺酸取代；

v)突變體Ras蛋白或其片段，其中該蛋白質或片段含有相對於野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的胺基酸位置12，且其中位置12處之甘胺酸係經精胺酸取代；及

vi)突變體Ras蛋白或其片段，其中該蛋白質或片段含有相對於野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的胺基酸位置76，且其中位置76處之麩胺酸係經甘胺酸取代。

32. 如請求項29之疫苗，其中該融合蛋白包含同框融合之以下蛋白質或片段：

i)突變體Ras蛋白或其片段，其中該蛋白質或片段含有相對於野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的胺基酸位置12，且其中位置12處之甘胺酸係經精胺酸取代；

ii)突變體Ras蛋白或其片段，其中該蛋白質或片段含有相對於野生型K-ras、N-ras或H-ras蛋白的胺基酸位置76，且其中位置76處之麩胺酸係經甘胺酸取代。

33. 如請求項29之疫苗，其中該融合蛋白包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列。

34. 如請求項29之疫苗，其中該融合蛋白包含SEQ ID NO:15之胺基酸序列。

35. 一種抗體或其抗原結合片段，其選擇性結合於如請求項22之分離蛋白質或肽。

36. 一種適體(aptamer)，其選擇性結合於如請求項22之分離蛋白質或肽。

37. 一種siRNA分子，其催化由如請求項1-16中任一項之核

酸分子所轉錄的RNA或由編碼突變體Ras蛋白之ras基因所轉錄的RNA選擇性裂解，其中該突變體Ras蛋白包含一個胺基酸序列具有至少一個相對於野生型胺基酸序列位置76處之突變而與野生型K-ras、N-ras或H-ras胺基酸序列不同。

38. 一種核糖核酸酶，其選擇性催化如請求項1-16中任一項之核酸分子或編碼突變體Ras蛋白之ras基因之失活，其中該突變體Ras蛋白包含一個胺基酸序列具有至少一個相對於野生型胺基酸序列位置76處之突變而與野生型K-ras、N-ras或H-ras胺基酸序列不同。
39. 一種反義核酸分子，其在極高嚴謹條件下與如請求項1-16中任一項之核酸分子或編碼突變體Ras蛋白之ras基因雜交，且抑制如請求項1-16中任一項之核酸分子或編碼突變體Ras蛋白之ras基因表現，其中該突變體Ras蛋白包含一個胺基酸序列具有至少一個相對於野生型胺基酸序列位置76處之突變而與野生型K-ras、N-ras或H-ras胺基酸序列不同。
40. 一種如請求項1-16中任一項之核酸分子或如請求項22或23之蛋白質或肽用於製備用於預防或治療癌症之組合物的用途。
41. 一種如請求項24-34中任一項之疫苗用於製備用於預防或治療癌症之藥物的用途。
42. 一種如請求項36之適體、如請求項27之siRNA、如請求項38之核糖核酸酶或如請求項39之反義核酸分子用於製

備用於預防或治療癌症之藥物的用途。

43. 一種診斷腫瘤的方法，其包含偵測欲診斷患者之測試樣本中突變體Ras蛋白或編碼該Ras蛋白之核酸序列的表現或活性，其中該Ras蛋白包含相對於野生型Ras胺基酸序列位置76處的突變；

其中該測試樣本中該突變體Ras蛋白或編碼該Ras蛋白之核酸序列之偵測可指示該測試樣本中腫瘤細胞之存在或其可能性。

44. 如請求項43之方法，其中該Ras蛋白包含甘胺酸取代野生型蛋白質中位置76處之麩胺酸。

45. 如請求項43之方法，其中該方法進一步包含偵測該Ras蛋白是否亦包含相對於野生型Ras胺基酸序列位置12處之突變，其中位置76及位置12處突變之偵測可指示該測試樣本中腫瘤細胞之存在或其可能性，且進一步指示患者體內與含有在該等位置僅有一個突變或無突變之Ras蛋白的腫瘤細胞相比更具侵入性之腫瘤。

46. 如請求項43之方法，其中該偵測步驟包含偵測該測試樣本中編碼該Ras突變的核酸序列。

47. 如請求項46之方法，其中該偵測步驟包含PCR擴增編碼該突變之基因組DNA模板或原位PCR擴增編碼該突變之DNA序列。

48. 如請求項46之方法，其中該偵測步驟係由選自由以下各方法組成之群的方法進行：聚合酶鏈反應(PCR)、逆轉錄酶-PCR(RT-PCR)、原位雜交、北方墨點法、序列分析

法、基因微陣列分析法及偵測報導基因法。

49. 如請求項43之方法，其中編碼該突變體Ras蛋白之核酸序列的含量係藉由使該測試樣本分離之核酸與選擇性結合於編碼該突變體Ras蛋白之核酸序列的引子或探針接觸及偵測編碼該突變型Ras蛋白的該核酸序列是否與引子或探針結合來測定。
50. 如請求項43之方法，其中該突變體Ras蛋白之含量係藉由使該測試樣本與選擇性特異性結合於該突變體Ras蛋白的抗體或其片段或適體接觸及偵測該抗體或其片段或適體是否結合於該突變體Ras蛋白來測定。
51. 如請求項43之方法，其中該測試樣本係來自診斷為癌症的患者，且其中將該測試樣本與陰性對照樣本加以比較。
52. 如請求項43之方法，其中該測試樣本係固定於基質上。
53. 如請求項43之方法，其中該方法係用於診斷該患者之癌症。
54. 如請求項43之方法，其中該方法係用於測定該患者癌症之預後。
55. 如請求項43之方法，其中該方法係用於測定該患者對治療性治療的敏感性。
56. 一種鑑別用於預防或治療癌症之化合物的方法，其包含鑑別靶Ras蛋白或編碼該靶Ras蛋白之核酸分子的抑制劑，其中該靶Ras蛋白包含相對於野生型Ras蛋白位置76處之突變。

57. 如請求項56之方法，其中該突變為選自由甘胺酸、離胺酸及麩醯胺酸組成之群之非麩胺酸胺基酸取代野生型蛋白質中位置76處之麩胺酸。
58. 如請求項56之方法，其中該鑑別步驟包含鑑別該靶Ras蛋白之表現或活性之抑制劑。
59. 如請求項58之方法，其中該偵測步驟係選自由以下各步驟組成之群：在假定調節化合物存在下偵測該靶Ras蛋白之轉譯或活性；及在假定調節化合物存在下偵測編碼該靶Ras蛋白之基因的表現。
60. 如請求項56之方法，其包含以下步驟：
- a)使宿主細胞與假定調節化合物接觸，其中該宿主細胞表現該靶Ras蛋白或其生物活性片段；及
 - b)測定該假定調節化合物是否引發該靶Ras蛋白或其生物活性片段之GTP水解，其中與該化合物不存在時相比，引發該靶Ras蛋白之GTP水解的假定調節化合物指定為用於預防或治療癌症的候選化合物。
61. 如請求項60之方法，其中該宿主細胞為腫瘤細胞株。
62. 一種鑑別用於預防或治療癌症之化合物的方法，其包含鑑別在表現突變型靶Ras蛋白之細胞中、而非在表現野生型Ras蛋白之細胞中引發GTP水解的化合物，其中該突變型靶Ras蛋白包含相對於野生型Ras蛋白位置76處之突變。
63. 如請求項56-62中任一項之方法，其中該假定調節化合物係選自由以下各物組成之群：適體、siRNA分子、反義

核 酸 分 子 、 核 糖 核 酸 酶 、 抗 體 或 其 抗 原 結 合 片 段 、 構 形
拮 抗 劑 及 小 分 子 抑 制 劑 。

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)