

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 3 月 3 日 (03.03.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/019451 A1

(51) 国際特許分類: **C12N 15/09**, C07K 19/00, C12N 9/99, A61K 38/16, 38/00, A61P 35/00

(SAKAI,Norio) [JP/JP]; 〒734-0055 広島県 広島市 南区 向洋新町 3-2 3-2 5 Hiroshima (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/004536

(74) 代理人: 細田 芳徳 (HOSODA,Yoshinori); 〒540-6591 大阪府 大阪市 中央区 大手前一丁目 7 番 3 1 号 OMM ビル 5 階 私書箱 2 6 号 細田国際特許事務所内 Osaka (JP).

(22) 国際出願日: 2004 年 3 月 30 日 (30.03.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-298760 2003 年 8 月 22 日 (22.08.2003) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市 本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

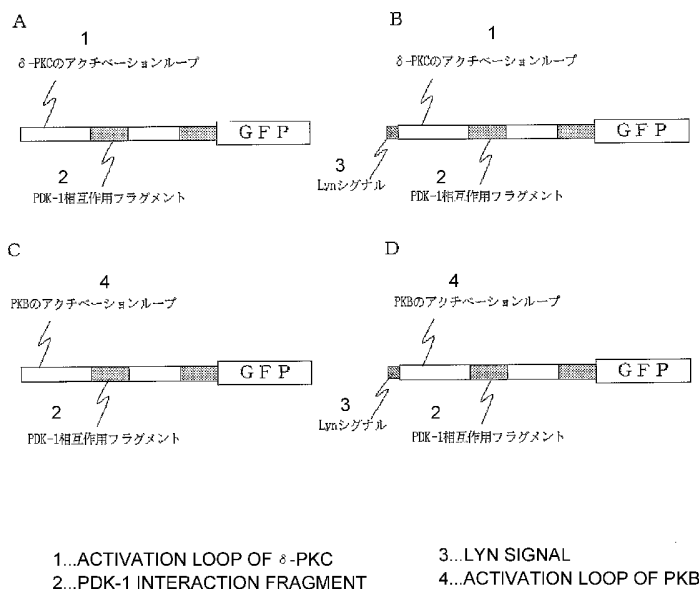
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL,

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 酒井 規雄

/ 続葉有 /

(54) Title: NUCLEIC ACID CONSTRUCT FOR EXPRESSING PDK-1 ACTIVITY INHIBITOR

(54) 発明の名称: P D K - 1 の活性阻害物質の発現用核酸構築物



(57) Abstract: It is intended to provide a means of regulating the phosphorylation activity of PDK-1 and a means of treating diseases caused by disorder in this activity. A nucleic acid construct for expressing an inhibitor of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 activity which contains a nucleic acid encoding a substance capable of inhibiting the activity of the phosphoinositide-dependent protein kinase 1 *in vivo*; a support for the expression of an inhibitor of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 activity in a mammalian cell which carries the nucleic acid construct for the expression as described above; a remedy and a therapeutic method for diseases caused by disorder in the phosphorylation activity of 3-phosphoinositide-dependent protein

/ 続葉有 /

WO 2005/019451 A1



SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

kinase 1 which contains the nucleic acid construct for the expression as described above or the support for the expression as described above as the active ingredient; and the nucleic acid construct for the expression as described above or the support for the expression as described above aiming at the production of a medicinal composition for the above diseases.

(57) 要約: PDK-1によるリン酸化活性の制御手段、及び該活性の異常に起因する疾患の治療手段を提供すること。生体内において、該ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ1の活性を阻害しうる活性阻害物質をコードする核酸を含有した、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ1の活性阻害物質の発現用核酸構築物;該発現用核酸構築物を保持した、哺乳動物細胞における3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ1の活性阻害物質の発現用担体;該発現用核酸構築物又は該発現用担体を有効成分として含有した、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ1によるリン酸化活性の異常に起因する疾患の治療剤及び治療方法;並びに該疾患の治療用医薬組成物の製造のための該発現用核酸構築物又は発現用担体。

明細書

PDK-1の活性阻害物質の発現用核酸構築物

技術分野

本発明は、リン酸化酵素である3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼPDK-1の活性阻害物質に関する。さらに詳しくは、本発明は、生体内において、前記PDK-1によるタンパク質リン酸化を抑制する活性阻害物質を発現させる発現用核酸構築物、該PDK-1の活性阻害物質の発現用担体、PDK-1によるリン酸化活性の異常に起因する疾患の治療剤、該疾患の治療方法等に関する。

背景技術

癌の治療には、例えば、抗癌剤等を用いて、癌細胞そのものを殺すことなどが試みられている。

前記抗癌剤によれば、種々の細胞においてアポトーシスが引き起こされることが知られている〔グンジ(Gunji, H.)ら著、キャンサー リサーチ(Cancer Res.), 第51巻, 741-743頁, 1991; カウフマン(Kaufmann, S. H.)著、キャンサー リサーチ(Cancer Res.), 第49巻, 5870-5878頁, 1989〕。しかしながら、例えば、スタウロスポリン等のタンパク質リン酸化酵素阻害剤は、標的となる癌細胞以外にも非特異的にアポトーシスを引き起こす場合があり、抗癌剤としての使用は困難である場合があるという欠点がある。

発明の開示

本発明の1つの側面は、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼのリ

ン酸化活性を阻害しうる活性阻害物質を発現させること、生体内で該活性阻害物質を発現させること、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼによるリン酸化活性の異常に起因する疾患の治療を必要とする個体内で、該活性阻害物質を発現させること、該活性阻害物質を大量かつ簡便に製造すること等の少なくとも1つを可能にする、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼの活性阻害物質の発現用核酸構築物を提供することにある。また、本発明の他の側面は、前記活性阻害物質を安定して供給すること、該活性阻害物質を生体内で高い効率で発現させること、該活性阻害物質を生体内で高い効率で発現させること、該活性阻害物質を所望の細胞等に特異的に発現させること等の少なくとも1つを可能にする、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼの活性阻害物質の発現用担体を提供することにある。さらに、本発明の他の側面は、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼの活性の異常に起因する疾患、具体的には、癌等に罹患した個体において、所望の細胞、特に、癌細胞において、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼの活性阻害物質を発現させ、該3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼのリン酸化活性を阻害すること、所望の細胞、特に、癌細胞にアポトーシスを引き起こさせること等の少なくとも1つを可能にする治療剤を提供することにある。また、本発明のさらに他の側面は、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼの活性の異常に起因する疾患を治療することを可能にする、治療方法を提供することにある。さらに、本発明のさらに別の側面は、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼの活性の異常に起因する疾患の治療用医薬組成物の製造のための、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼの活性阻害物質の発現用核酸構築物又は発現用担体の使用に関する。

本発明の要旨は、

〔1〕 (A) 配列番号：1又は2に示されるアミノ酸配列、

(B) 配列番号：1又は2に示されるアミノ酸配列において、少なくとも1個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は付加を有するアミノ酸配列、及び

(C) 配列番号：1又は2に示されるアミノ酸配列に対し、BLASTアルゴリズム (Cost to open gap 11, Cost to extend gap 1, expect value 10, wordsize 3) によりアラインメントされ、算出された配列同一性が、少なくとも26%であるアミノ酸配列、

からなる群より選ばれたアミノ酸配列と、

(a) 配列番号：3に示されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号：3に示されるアミノ酸配列において、少なくとも1個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は付加を有するアミノ酸配列、及び

(c) 配列番号：3に示されるアミノ酸配列に対し、BLASTアルゴリズム (Cost to open gap 11, Cost to extend gap 1, expect value 10, wordsize 3) によりアラインメントされ、算出された配列同一性が、少なくとも26%であるアミノ酸配列、

からなる群より選ばれたアミノ酸配列とを含有し、かつ生体内において、ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ1の活性を阻害しうる活性阻害物質をコードする核酸を含有してなる、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ1の活性阻害物質の発現用核酸構築物、

〔2〕 活性阻害物質をコードする核酸が、

(i) 配列番号：4に示されるアミノ酸配列、

(i i) 配列番号：4に示されるアミノ酸配列において、少なくとも1個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は付加を有するアミノ酸配列、及び

(i i i) 配列番号：4に示されるアミノ酸配列に対し、BLASTアルゴリズム (Cost to open gap 11, Cost to extend

gap 1, expect value 10, wordsize 3) によりアラインメントされ、算出された配列同一性が、少なくとも26%であるアミノ酸配列、

からなる群より選ばれたアミノ酸配列

をコードする核酸の下流に作動可能に連結されてなる、前記〔1〕記載の発現用核酸構築物、

〔3〕 活性阻害物質をコードする核酸が、テロメラーゼプロモーター支配下に発現する、前記〔1〕又は〔2〕記載の発現用核酸構築物、

〔4〕 前記〔1〕～〔3〕いずれか1項記載の発現用核酸構築物を保持してなる、哺乳動物細胞における3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ1の活性阻害物質の発現用担体、

〔5〕 前記〔1〕～〔3〕いずれか1項に記載の発現用核酸構築物又は前記〔4〕記載の発現用担体を有効成分として含有してなる、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ1によるリン酸化活性の異常に起因する疾患の治療剤、

〔6〕 疾患が、癌又はウイルス感染症である、前記〔5〕記載の治療剤、

〔7〕 前記〔1〕～〔3〕いずれか1項に記載の発現用核酸構築物の発現産物を有効成分として含有してなる、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ1によるリン酸化活性の異常に起因する疾患の治療剤、

〔8〕 発現産物が、

(I) 配列番号：5又は配列番号：7に示されるアミノ酸配列、

(II) 配列番号：5又は配列番号：7に示される配列において、少なくとも1個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は付加を有するアミノ酸配列、及び

(III) 配列番号：5又は配列番号：7に示されるアミノ酸配列に対し、BLASTアルゴリズム (Cost to open gap 11, Cost to extend gap 1, expect value 10, wordsize 3) によりアラインメントされ、算出された配列同一性が、少なくと

も 26% であるアミノ酸配列、

からなる群より選ばれたアミノ酸配列を含有したポリペプチドである、前記

〔7〕記載の治療剤、

〔9〕 前記〔1〕～〔3〕いずれか1項に記載の発現用核酸構築物又は前記

〔4〕記載の発現用担体を、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ1によるリン酸化活性の異常に起因する疾患に罹患した個体に、治療上有効量投与する、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ1によるリン酸化活性の異常に起因する疾患の治療方法、並びに

〔10〕 3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ1によるリン酸化活性の異常に起因する疾患の治療用医薬組成物の製造のための、前記〔1〕～

〔3〕いずれか1項に記載の発現用核酸構築物又は前記〔4〕記載の発現用担体の使用、

に関する。

図面の簡単な説明

図1は、緑色蛍光タンパク質（GFP）を結合したPDK-1活性阻害物質の一次構造の概略図を示す。パネルAは、PKBAL-PIF-GFPを示し、パネルBは、Lynsig-PKBAL-PIF-GFPを示し、パネルCは、 δ AL-PIF-GFPを示し、パネルDは、Lynsig- δ AL-PIF-GFPを示す。

図2は、細胞における δ AL-PIF-GFP及びLynsig- δ AL-PIF-GFPそれぞれの発現分布を示す。パネルAは、 δ AL-PIF-GFPの発現分布を示し、パネルBは、Lynsig- δ AL-PIF-GFPの発現分布を示す。図中、スケールバーは、10 μ mを示す。

図3は、細胞における δ AL-PIF-GFPによる細胞の形態変化を示す。パネルAは、GFPによる蛍光像を示し、パネルBは、核染色を行なった結果を

示す。図中、スケールバーは、 $10\ \mu\text{m}$ を示す。

図4は、PKBのアクチベーションループのリン酸化における $\delta\text{ALP I F}-\text{GFP}$ の影響を調べた結果を示す図である。図中、パネルAは、抗GFP抗体を用いたウエスタンブロット解析、パネルBは、抗リン酸化PKB (Thr 308) 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行なった結果を示す。また、各パネルにおいて、レーン1は、PKB α -GFPとGFPとを共発現させたCOS-7細胞から調製したタンパク質試料 ($20\ \mu\text{g}$) を用いた場合、レーン2は、PKB α -GFPと $\delta\text{ALP I F}-\text{GFP}$ とを共発現させたCOS-7細胞から調製したタンパク質試料 ($20\ \mu\text{g}$) を用いた場合を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、1つの側面では、

(A) 配列番号：1又は2に示されるアミノ酸配列、

(B) 配列番号：1又は2に示されるアミノ酸配列において、少なくとも1個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は付加を有するアミノ酸配列、及び

(C) 配列番号：1又は2に示されるアミノ酸配列に対し、BLASTアルゴリズム (Cost to open gap 11, Cost to extend gap 1, expect value 10, word size 3) によりアラインメントされ、算出された配列同一性が、少なくとも26%であるアミノ酸配列、

からなる群より選ばれたアミノ酸配列と、

(a) 配列番号：3に示されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号：3に示されるアミノ酸配列において、少なくとも1個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は付加を有するアミノ酸配列、及び

(c) 配列番号：3に示されるアミノ酸配列に対し、BLASTアルゴリズム (Cost to open gap 11, Cost to extend

gap 1, expect value 10, wordsize 3) によりアラインメントされ、算出された配列同一性が、少なくとも26%であるアミノ酸配列、

からなる群より選ばれたアミノ酸配列とを含有し、かつ生体内において、該PDK-1の活性を阻害しうる活性阻害物質をコードする核酸を含有する、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ1（以下、「PDK-1」という）の活性阻害物質の発現用核酸構築物である。

本発明の発現用核酸構築物は、前記（A）～（C）のいずれかのアミノ酸配列と前記（a）～（c）のいずれかのアミノ酸配列とをコードする核酸を含有しているため、PDK-1の活性阻害物質を発現させることができる。したがって、かかる発現用核酸構築物を、PDK-1の活性の異常に起因する疾患の患部に供給することにより、PDK-1の活性の異常を是正することができる。また、PDK-1によるリン酸化活性の異常に起因する疾患の治療を必要とする個体内、細胞内等において、PDK-1のリン酸化活性を阻害しうる活性阻害物質を発現させ、大量かつ簡便に製造することができるという優れた効果を発揮する。

なお、本明細書において、「PDK-1によるリン酸化活性の異常に起因する疾患」とは、PDK-1の活性の異常により引き起こされる疾患を意味し、例えば、癌、ウイルス感染症等が挙げられる。前記癌としては、具体的には、例えば、PDK-1により活性化されるPKBの活性の上昇に基づき、細胞増殖が促進している癌等が挙げられる。なお、本明細書において、「PDK-1によるリン酸化活性の異常」とは、健常個体、罹患していない個体、罹患していない状態にあった個体等と比較した場合、PDK-1によるリン酸化活性の平均値から逸脱した状態を意味する。

また、本明細書において、「PDK-1の活性阻害物質」は、PDK-1によりリン酸化される性質を示す物質をいう。

「PDK-1の活性の阻害」は、例えば、PDK-1によりリン酸化されたア

ミノ酸残基を特異的に認識する抗体を用いて、この抗体が認識するPDK-1の基質タンパク質の量が減少することを確認することにより評価されうる。

なお、PDK-1の活性阻害物質の親和性は、生体内で、PDK-1によるPKBの活性化を抑制し、細胞にアポトーシスを誘導する活性を十分に発揮させる程度であればよい。

PDK-1による前記活性阻害物質のリン酸化は、例えば、PDK-1によりリン酸化されたアミノ酸残基（主に、スレオニン残基等）を特異的に認識する抗体を用いて、前記活性阻害物質がこの抗体で認識されるかどうかをイムノブロット法等により測定されうる。

また、PDK-1と活性阻害物質との親和性は、結合活性によっても評価されうる。前記結合活性は、特に限定されないが、two-hybrid法、共免疫沈降法、表面プラズモン共鳴測定等により測定されうる。

具体的には、two-hybrid法の場合、

- (1) 活性阻害物質をコードする核酸を、preyベクターに組み込み、preyプラスミドを得るステップ；
 - (2) 得られたpreyプラスミドを酵母〔EGY48〔p8op lacZ〕〕に導入して、preyプラスミド保持クローンを得るステップ；
 - (3) PDK-1遺伝子を、baitベクターに組み込み、baitプラスミドを得るステップ；
 - (4) 得られたbaitプラスミドを、前記ステップ(2)で得られたpreyプラスミド保持クローンに導入し、クローンを得るステップ；並びに
 - (5) 前記(4)で得られたクローンを、ロイシン欠失プレート上で3日間培養し、酵母細胞内における前記活性阻害物質との相互作用をロイシン欠失プレート上でのコロニー形成能により評価するステップ；
- を行ない、ロイシン欠失プレート上でコロニーが形成されることを、PDK-1と前記活性阻害物質とが結合することの指標として評価されうる。

また、共免疫沈降法の場合、

- (1) シグナル配列の下流にFLAG配列を有するPDK-1を発現するPDK-1-FLAG発現プラスミドを得るステップ；
 - (2) N末側にHA配列を有する前記活性阻害物質を発現しうるHA-活性阻害物質発現プラスミドを得るステップ；
 - (3) 細胞に、前記ステップ(1)で得られたPDK-1-FLAG発現プラスミドと前記ステップ(2)で得られたHA-活性阻害物質発現プラスミドとを、一過的にコトランスフェクトして、トランスフェクタントを得るステップ；
 - (4) 前記ステップ(3)で得られたコトランスファクタントを培養して、培養細胞を得るステップ；
 - (5) 前記ステップ(4)で得られた培養細胞から、細胞抽出液を得るステップ；
 - (6) 前記ステップ(5)で得られた細胞抽出液に抗FLAG抗体又は抗HA抗体を加えて共免疫沈降を行なうステップ；並びに
 - (7) 共免疫沈降を、ウエスタンブロット解析により検出するステップ；
- を行ない、抗FLAG抗体及び抗HA抗体のいずれを用いた場合においても、複合体の沈降が検出されることを、PDK-1と前記活性阻害物質とが結合することの指標として評価されうる。

表面プラズモン共鳴解析の場合、PDK-1を固定化したチップに、活性阻害物質を含有した溶液を一定の流速で、送液し、光学的（蛍光度、蛍光偏向度等）検出手段、質量分析計（マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析計:MALDI-TOF MS、エレクトロスプレー・イオン化質量分析計:ESI-MS）等の検出手段により、該PDK-1と活性阻害物質とからなる複合体の形成を示すセンサーグラムが呈示された場合、該PDK-1と活性阻害物質とが結合することの指標として評価されうる。かかる表面プラズモン共鳴解析によれば、反応速度等も併せて評価されうる。

「生体内で、PDK-1によるPKBの活性化を抑制し、細胞にアポトーシスを誘導する活性」（アポトーシス誘導活性ともいう）は、クロマチンの凝縮、細胞核の断片化、アポトーシス小体の形成等の形態的变化に基づく検出、細胞死に伴い細胞から漏出する酵素（乳酸脱水素酵素等）の活性の増加の測定、トリパンブルー等による染色、TUNEL法等により評価されうる。

前記（A）において、配列番号：1に示されるアミノ酸配列は、PKB/Aktのactivation loopの配列であり、配列番号：2に示されるアミノ酸配列が、 δ PKCのアミノ酸配列である。本発明の発現用核酸構築物を用いることにより得られる活性阻害物質は、前記配列番号：1又は2に示されるアミノ酸配列を有するため、生体内で、PDK-1によるPKBの活性化を抑制するという驚くべき性質を発現する。

なお、本発明においては、前記activation loopと実質的に同等の機能、すなわち、PDK-1との親和性、アポトーシス誘導活性等を示し、PDK-1によりリン酸化され、PDK-1の偽基質として働き、PDK-1のリン酸化機能を抑えるものであれば、前記配列番号：1又は2に示されるアミノ酸配列の誘導体配列〔例えば、前記（B）又は（C）のアミノ酸配列〕であってもよい。

前記（B）のアミノ酸配列において、アミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は付加の数は、前記activation loopと実質的に同等の機能、すなわち、PDK-1との親和性、アポトーシス誘導活性等を示し、かつPDK-1によりリン酸化される範囲で適宜設定されうる。

なお、本明細書において、「少なくとも1個」とは、1若しくは複数個、好ましくは1若しくは数個をいう。

前記（C）のアミノ酸配列において、配列同一性の算出に用いられるアルゴリズムにおける条件は、例えば、Cost to open gap 11, Cost to extend gap 1, expect value 10, w

ord size 3が挙げられる。他の値は、通常用いられるデフォルト値であってもよい。

前記(C)のアミノ酸配列と、配列番号：1又は2に示されるアミノ酸配列との間の配列同一性は、前記activation loopと実質的に同等の機能、すなわち、PDK-1との親和性、アポトーシス誘導活性等を示し、かつPDK-1によりリン酸化される範囲であればよく、前記条件にて、BLASTアルゴリズムにより適切にアライメントし、算出した場合、少なくとも26%、好ましくは、50%以上、より好ましくは、60%以上、さらに好ましくは、70%以上、よりさらに好ましくは、80%以上、一層好ましくは、90%以上、より一層好ましくは、95%以上であることが望ましい。

なお、前記(B)及び(C)のアミノ酸配列においては、配列番号：9に示されるアミノ酸配列(Thr Phe Cys Gly Thr)が保存されていることが望ましい。

また、本発明の発現用核酸構築物を用いることにより得られる活性阻害物質は、前記(A)～(C)からなる群より選ばれたアミノ酸配列に加え、前記(a)～(c)からなる群より選ばれたアミノ酸配列を有しているため、生体内で、PDK-1によるPKBの活性化をより効率よく抑制し、細胞にアポトーシスを誘導するという優れた効果を発揮する。

前記(a)のアミノ酸配列において、配列番号：3に示されるアミノ酸配列は、PDK-1相互作用断片(PIF)の配列である。

前記配列番号：3に示されるアミノ酸配列は、該アミノ酸配列を有するポリペプチドが、PDK-1の本来の基質であるAGCキナーゼの1つであるプロテインキナーゼC関連キナーゼ-2(PRK2)と結合する活性を呈するものであれば、該配列番号：3に示されるアミノ酸配列の誘導体配列〔例えば、前記(b)又は(c)のアミノ酸配列〕であってもよい。

前記(b)のアミノ酸配列において、アミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は付加の数は、前記PIFと実質的に同等の機能、すなわち、PDK-1との親和性

等を示す範囲で適宜設定されうる。

前記 (c) のアミノ酸配列において、配列同一性は、前記 P I F と実質的に同等の機能、すなわち、P D K - 1 との親和性等を示す範囲であればよい。

また、本発明の発現用核酸構築物は、

(i) 配列番号：4 に示されるアミノ酸配列、

(i i) 配列番号：4 に示されるアミノ酸配列において、少なくとも 1 個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は付加を有するアミノ酸配列、及び

(i i i) 配列番号：4 に示されるアミノ酸配列に対し、B L A S T アルゴリズム (Cost to open gap 11, Cost to extend gap 1, expect value 10, wordsize 3) によりアラインメントされ、算出された配列同一性が、少なくとも 26 % であるアミノ酸配列、

からなる群より選ばれたアミノ酸配列

をコードする核酸をさらに含有してもよい。かかる発現用核酸構築物としては、活性阻害物質をコードする核酸が、前記 (i) ~ (i i i) からなる群より選ばれたアミノ酸配列の下流に作動可能に連結された構築物が挙げられる。前記

(i) ~ (i i i) からなる群より選ばれたアミノ酸配列を含有した発現用核酸構築物によれば、細胞膜に前記活性阻害物質を発現させることができる。

前記 (i) のアミノ酸配列において、配列番号：4 に示されるアミノ酸配列は、細胞膜に存在するチロシンリン酸化酵素 L y n の N 末端配列であり、該配列番号：4 に示されるアミノ酸配列からなる部分がパルミチン化されることにより、かかるアミノ酸配列を有するポリペプチドが細胞膜に局在化する。

したがって、本発明においては、パルミチン化され、細胞膜への局在化能を呈するものであれば、前記配列番号：4 のアミノ酸配列の誘導体配列〔前記 (i i) 又は (i i i) のアミノ酸配列〕であってもよい。

前記 (i i) のアミノ酸配列において、アミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は

付加の数は、前記L y nのN末端配列と同様に、パルミチン化されることにより、細胞膜への局在化能を発揮する範囲で適宜設定されうる。

前記（i i i）のアミノ酸配列において、配列同一性は、前記L y nのN末端配列と同様に、パルミチン化されることにより、細胞膜への局在化能を発揮する範囲であればよい。

前記パルミチン化は、細胞を細胞膜成分と細胞質成分とに分画し、細胞膜成分に多くP D K - 1 活性阻害物質が発現していることをイムノプロット法により検出することにより評価されうる。また、細胞膜への局在化能は、G F P を融合したL y n 付加P D K - 1 活性阻害物質がL y n 付加しているかP D K - 1 物質に比べ、細胞膜に、より多く局在することを蛍光顕微鏡下で観察することにより評価されうる。

本発明の発現用核酸構築物に用いられる活性阻害物質をコードする核酸は、配列表に記載のアミノ酸配列を基に、対応する核酸を合成すること、P K B 又はP K C d e l t a をコードする核酸を鋳型としてP C R を行なうこと等により得られうる。

また、本発明の発現用核酸構築物においては、テロメラーゼプロモーター等のプロモーターの支配下に、前記活性阻害物質をコードする核酸を発現させることにより、癌細胞に特異的に前記活性阻害物質を発現させることができる。具体的には、例えば、

1. 活性阻害物質をコードする核酸が、テロメラーゼプロモーター等の下流に作動可能に連結された構築物、
2. テトラサイクリントランスアクチベーターをコードする核酸が、テロメラーゼプロモーター等のプロモーターの下流に作動可能に連結された構築物と、前記活性阻害物質をコードする核酸が、前記トランスアクチベーターに活性化されるプロモーターの下流に作動可能に連結された構築物との組み合わせ等が挙げられる。

本明細書において、「作動可能に連結された」とは、所望の機能を発揮するポリペプチドが、正常に発現するように、連結された状態をいう。例えば、「核酸が、プロモーターの下流に作動可能に連結された」とは、プロモーターの制御下に核酸から発現産物が生じることを意味する。

前記トランスアクチベーター及び該トランスアクチベーターにより活性化されるプロモーターとしては、テトラサイクリントランスアクチベーター及びTet Op プロモーター等が挙げられる。前記テトラサイクリントランスアクチベーター及びTet Op プロモーターを用いた場合、発現用核酸構築物による活性阻害物質の発現を停止させることができるため、活性阻害物質の時期特異的発現制御、例えば、適度に働くように、発現を停止させる場合、ある一定の期間のみに発現させる場合等に好適である。

なお、前記発現用核酸構築物により発現される活性阻害物質としては、特に限定されないが、

(I) 配列番号：5又は配列番号：7に示されるアミノ酸配列、

(II) 配列番号：5又は配列番号：7に示される配列において、少なくとも1個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は付加を有するアミノ酸配列、及び

(III) 配列番号：5又は配列番号：7に示されるアミノ酸配列に対し、BLASTアルゴリズム (Cost to open gap 11, Cost to extend gap 1, expect value 10, words size 3) によりアラインメントされ、算出された配列同一性が、少なくとも26%であるアミノ酸配列、

からなる群より選ばれたアミノ酸配列を含有したポリペプチド等が挙げられる。

本発明の発現用核酸構築物は、細胞等への核酸の導入に適した担体に保持させることにより、安定して活性阻害物質を発現させることができる。したがって、本発明の発現用核酸構築物によれば、活性阻害物質を安定して供給することができるという優れた効果を発揮する。また、本発明の発現用核酸構築物によれば、

より効率よく、個体、細胞等に導入し、前記活性阻害物質を個体内、細胞内等で高い効率で発現させることができ、該活性阻害物質を所望の細胞等により特異的に発現させることができるという優れた効果を発揮する。

したがって、本発明の他の側面は、前記発現用核酸構築物を保持した、哺乳動物細胞におけるPDK-1の活性阻害物質の発現用担体である。

細胞等への核酸の導入に適した担体としては、ウイルスベクター、例えば、アデノウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター、レトロウイルスベクター等の哺乳動物細胞用ベクター、プラスミドベクターを含有するリポソーム、プラスミドベクターを付着した金粒子等が挙げられる。なかでも、細胞における発現効率の観点から、好ましくは、一過性発現能を有するウイルスベクターが望ましい。

また、本発明の発現用核酸構築物及び発現用担体は、PDK-1によるリン酸化活性の異常に起因する疾患の治療に用いられうる。

したがって、本発明の別の側面は、PDK-1によるリン酸化活性の異常に起因する疾患の治療剤である。

本発明の治療剤は、前記発現用核酸構築物又は前記発現用担体を有効成分として含有することに1つの大きな特徴がある。本発明の治療剤は、前記発現用核酸構築物又は前記発現用担体を含有するため、PDK-1によるリン酸化活性の異常に起因する疾患に罹患した個体において、所望の細胞内で前記活性阻害物質を発現させ、該PDK-1のリン酸化活性を阻害し、PDK-1によるターゲティング機構を抑制し、所望の細胞にアポトーシスを引き起こさせることができるという優れた効果を発揮する。

したがって、本発明の治療剤は、PDK-1によるリン酸化活性の異常に起因する疾患、より具体的には、アポトーシス誘導が治療効果につながる疾患の治療に好適である。

PDK-1によるリン酸化活性の異常に起因する疾患としては、前記と同様で

あり、例えば、癌、例えば、癌、特に、PDK-1により活性化されるPKBの活性の上昇に基づき、細胞増殖が促進している癌、ウイルス感染症等が挙げられる。前記癌としては、例えば、特に、PDK-1により活性化されるPKBの活性の上昇に基づき、細胞増殖が促進されうる乳癌等が挙げられる。

本発明の治療剤は、標的細胞、標的組織、標的臓器等に応じた投与経路により投与されうる。前記投与経路としては、例えば、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内、局所等が挙げられる。

本発明の治療剤における前記発現用核酸構築物又は前記発現用担体の含有量は、疾患、患者の年齢及び体重等に応じて適宜設定することができるが、生体内で、前記活性阻害物質が発現して、PDK-1によるターゲティング機構をより効率よく抑制し、細胞にアポトーシスを誘導するに十分な量（治療上有効量）であればよい。

本発明の治療剤は、前記発現用核酸構築物又は前記発現用担体の他、薬理学的に許容されうる助剤、例えば、核酸を安定に保持しうる緩衝液、賦形剤、結合剤、安定剤、溶解補助剤、等張剤等をさらに含有してもよい。

本発明の治療剤の投与方法としては、リン酸-カルシウム共沈法、微小ガラス管を用いた直接注入法、リポソームによる遺伝子導入法、パーティクル銃で細胞に移入する方法、正電荷ポリマーによる導入法等が挙げられる。

本発明の治療剤について、例えば、癌の場合、以下のような動物実験により薬理評価を行なうことができる。腫瘍の形成が確認されたヌードマウスの癌モデルに適切な用量の治療剤を適切な投与回数投与し、同時に、腫瘍径の変化を観察する。なお、対照群として、治療剤を投与しなかったマウス、又は他の治療法を用いて治療したマウス等が挙げられる対照群に比べ、投与群において、より腫瘍の退縮が見られた場合、動物実験レベルで癌の治療ができたことを示す指標となる。また、組織、細胞等について、アポトーシスの検出を行なってもよい。さらに、本発明の治療剤によるヒトへの臨床試験は、例えば、癌細胞の場合、腫瘍の定期

的な観察（写真撮影等）、C Tスキャン、M R I等での記録により、腫瘍径を測定し、直交する長径と短径から推定腫瘍体積を算出し腫瘍の増殖を計算する。治療効果は、腫瘍の種類に応じた評価指標に基づき評価されうる。また、アポトーシスの有無を組織、細胞等の形態学的観察により評価してもよい。

さらに、本発明は、さらに他の側面では、前記発現用核酸構築物又は前記発現用担体を、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ1によるリン酸化活性の異常に起因する疾患に罹患した個体に、治療上有効量投与することを特徴とする、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ1によるリン酸化活性の異常に起因する疾患の治療方法である。

本発明の治療方法は、前記治療剤を個体に投与する場合と同様に行なわれる。また、かかる治療方法による治療効果の評価は、前記治療剤の薬理評価及び臨床試験と同様に行なわれうる。

また、本発明によれば、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼの活性の異常に起因する疾患の治療用医薬組成物の製造のための、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼの活性阻害物質の発現用核酸構築物又は発現用担体の使用も提供される。本発明の発現用核酸構築物又は発現用担体によれば、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼの活性の異常に起因する疾患の治療方法の開発が可能になる。

以下、本発明を、実施例により詳細に説明するが、本発明は、下記実施例により何ら限定されるものではない。

実施例 1

3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ（「PDK-1」という；配列番号：1）のアクチベーションループ（activation loop）に対応する部分と、PDK-1相互作用フラグメント（「PIF」という；配列番

号：3）とをコードする核酸を2コピー有する核酸構築物（PKBAL-PIF）を作製した。また、前記核酸構築物（PKBAL-PIF）の発現産物のC末端側に、緑色蛍光タンパク質（GFP）が配置されるように、該核酸構築物の下流に、GFPをコードする核酸を配置させ、核酸構築物（PKBAL-PIF-GFP）を得た。

ついで、前記PKBAL-PIFを、哺乳動物細胞用発現ベクターpTB701のSV40プロモーターの下流に組み込み、PKBAL-PIF発現用組換えベクターを得た。また、前記PKBAL-PIF-GFPを、前記哺乳動物細胞用発現ベクターpTB701のSV40プロモーターの下流に組み込み、PKBAL-PIF-GFP発現用組換えベクターを得た。

さらに、細胞膜に存在するチロシンリン酸化酵素LynのN末端領域のアミノ酸配列（配列番号：4）からなるペプチドをコードする核酸を、該ペプチドが、核酸構築物（PKBAL-PIF）の発現産物及び核酸構築物（PKBAL-PIF-GFP）の発現産物のそれぞれのN末端側に付加されるように、各核酸構築物に連結させ、核酸構築物（Lynsig-PKBAL-PIF）及び核酸構築物（Lynsig-PKBAL-PIF-GFP）のそれぞれを得た。

また、PKB/Aktと同様にPDK-1の基質である δ PKCのアクチベーションループ（activation loop）に対応する部分と δ PKCのPIFとをコードする核酸を2コピー有する核酸構築物（ δ AL-PIF）を作製した。また、前記核酸構築物（ δ AL-PIF）の発現産物のC末端側に、GFPが配置されるように、該核酸構築物の下流に、GFPをコードする核酸を配置させ、核酸構築物（ δ AL-PIF-GFP）を得た。

ついで、前記 δ AL-PIFを、前記哺乳動物細胞発現ベクターpTB701のSV40プロモーターの下流に組み込み、 δ AL-PIF発現用組換えベクターを得た。また、前記 δ AL-PIF-GFPを、哺乳動物細胞発現ベクターpTB701のSV40プロモーターの下流に組み込み、 δ AL-PIF-GFP

発現用組換えベクターを得た。

さらに、細胞膜に存在するチロシンリン酸化酵素 Lyn の N 末端領域のアミノ酸配列（配列番号：4）からなるペプチドをコードする核酸を、該ペプチドが、核酸構築物（ δ AL-P I F）の発現産物及び核酸構築物（ δ AL-P I F-GFP）の発現産物のそれぞれの N 末端側に付加されるように、各核酸構築物に連結させ、核酸構築物（Lynsig- δ AL-P I F）及び核酸構築物（Lynsig- δ AL-P I F-GFP）のそれぞれを得た。

得られた各組換えベクターを、エレクトロポレーション法により、それぞれ、哺乳動物細胞 COS-7 株（理化学研究所細胞バンク供給）に導入した。

得られた発現産物のうち、GFP 結合発現産物の一次構造の概略図を図 1 に示す。

また、前記核酸構築物のそれぞれを用い、相同組換え法により、組換えアデノウイルスを作製した。なお、組換えアデノウイルスの作製には、ストラタジーン社製、商品名：pAdEASY System、商品名：AdEasy Adenoviral Vector System を用いた。

HEK 293 細胞（ATCC CRL-1573）を、100 ユニット/ml ペニシリン G ナトリウムと 100 μ g/ml ストレプトマイシンと 10 重量% ウシ胎仔血清とを含む α -MEM 上、60 mm 培養プレートあたり細胞数 $2 \sim 5 \times 10^5$ （約 100 細胞/mm²）になるように接種し、5 体積% CO₂ を含む加湿気相中、37℃で培養した。

12～24 時間後、得られた組換えアデノウイルスベクターで、HEK 293 細胞をトランスフェクションした。4～7 日後、プレートから剥離した細胞を、培養液中の細胞を、1500×g で 5 分間遠心分離して、ウイルス上清を得た。

得られた組換えアデノウイルス上清について、ウイルスタイター値を測定した。

その結果、前記核酸構築物の発現アデノウイルスベクターを得た。

実施例 2

前記実施例 1 で得られた発現ベクターのうち、 δ AL-P I F-G F P の発現プラスミドベクター及びL y n s i g- δ AL-P I F-G F P の発現プラスミドベクターのそれぞれを、エレクトロポレーション法により、サル腎臓癌細胞C O S-7 に導入した。

導入 24 時間後、 δ AL-P I F-G F P 発現細胞及びL y n s i g- δ AL-P I F-G F P の発現細胞のそれぞれについて、G F P による蛍光を指標として観察した。結果を図 2 に示す。

その結果、図 2 に示されるように、 δ AL-P I F-G F P の発現産物は、主に細胞質に発現が見られ、L y n s i g- δ AL-P I F-G F P の発現産物は、主に細胞膜に発現が見られた。

導入 48 時間後、 δ AL-P I F-G F P の発現細胞及びL y n s i g- δ AL-P I F-G F P の発現細胞のそれぞれについて、G F P による蛍光を指標として観察した。

その結果、 δ AL-P I F-G F P の発現細胞及びL y n s i g- δ AL-P I F-G F P の発現細胞共に、球形に形態変化を起こした。また、それぞれの細胞について、ヘキスト 33342 を用いて、染色した結果、形態変化を示した細胞は、いずれもクロマチンの凝集と核の分断化を示し、アポトーシスを起こしていることがわかった。なお、図 3 に、代表例として、 δ AL-P I F-G F P の発現細胞の場合の結果を示す。

したがって、実施例 1 で得られた発現ベクターにより発現される核酸構築物の発現産物は、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ 1 の活性を阻害し、アポトーシスを誘導することがわかった。

実施例 3

テロメラゼプロモーターの支配下にテトラサイクリントランスアクチベータ

一を連結させ、癌細胞特異的にテトラサイクリントランスアクチベーターを発現させるためのベクター1を作製する。

また、実施例1の核酸構築物の上流にTetOp最小プロモーターを連結し、実施例1と同様に発現ベクターを作製する（ベクター2）。

得られたベクター1とベクター2とを樹立された癌細胞及び樹立されていない癌細胞のそれぞれを導入する。

その結果、細胞が、球形に形態変化を起こし、クロマチン凝集、核の分断化を示すことを指標として、核酸構築物の発現産物の効果を評価する。

実施例4

実施例3で得られたベクター1とベクター2とを、固形癌モデルに、血管内投与又は該モデルの癌細胞に局所的に注入する。

その結果、固形癌の大きさの変化を指標として、癌に対する発現産物の効果を評価する。

実施例5

COS-7細胞において、PKB α -GFPと、 δ ALP1F-GFP又は対照としてGFPとを共発現させた。

ついで、抗GFP抗体又はPKBのactivation loopのリン酸化スレオニンを認識する抗リン酸化PKB (Thr308) 抗体を用い、ウエスタンブロット解析を行なった。結果を図4に示す。

図4のパネルAに示されるように、発現させた目的のタンパク質が、それぞれ目的のサイズを保持していることがわかる。また、PKB α -GFPの発現量は、PKB α -GFPとGFPとを共発現させたCOS-7細胞及びPKB α -GFPと δ ALP1F-GFPとを共発現させたCOS-7細胞の間ではほぼ等しいことがわかる。

また、パネルBに示されるように、 δ ALPIF-GFPを共発現させた場合（レーン2）、GFPを共発現させた場合（レーン1）に比べ、PKB α -GFPのバンドが薄く認識されており、 δ ALPIF-GFPがPKB α -GFPのアクチベーションループのリン酸化を抑制していることがわかる。なお、この抗体は、 δ ALPIF-GFPのリン酸化も認識している。

実施例6

前記実施例1で得られた発現ベクターのうち、偽基質 δ AL-PIF-GFPの発現プラスミドベクター及び偽基質Lynsig- δ AL-PIF-GFPの発現プラスミドベクターのそれぞれを、エレクトロポレーション法により、癌由来培養細胞（COS-7細胞及びPC-12細胞）に導入した。

また、前記偽基質の発現プラスミドベクターと、GSTとPDK-1との融合タンパク質（GST-PDK-1）の発現プラスミドベクターとを、エレクトロポレーション法により、癌由来培養細胞（COS-7細胞及びPC-12細胞）に導入した。

なお、前記GST-PDK-1の発現プラスミドベクターは、ヒトPDK-1をコードするcDNAの5'側に、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）をコードするcDNAを付加し、得られた核酸構築物を、前記実施例1の場合と同様のプラスミドベクターに連結することにより作製したベクターである。

対照として、前記偽基質の発現ベクターの代わりに、GFPの発現ベクターを、前記COS-7細胞及びPC-12細胞それぞれに導入した。

遺伝子導入48時間後に、GFPに由来する蛍光を呈する細胞のうち、アポトーシスを起こしている細胞を計数し、アポトーシス誘導率を算出した。なお、アポトーシス誘導細胞は、細胞核を慣用の方法で染色し、蛍光顕微鏡下、クロマチン凝集と核の分断化とを指標として判定した。

また、COS-7細胞での結果を表1に、PC-12細胞での結果を表2に示

す。なお、表中、*は、 $p < 0.05$ vs GFP [Bonferroni multiple comparisons test]、#は、 $p < 0.05$ vs 偽基質のみ、##は、 $p < 0.01$ vs 偽基質のみ [unpaired t-test] を示す。また、結果は、3連の平均を示す。

表 1

	GFP	δ AL-PIF-GFP	Lynsig- δ AL-PIF-GFP
GST-PDK-1 なし	12.7 ± 3.1	$40.9 \pm 3.2^*$	$44.8 \pm 9.8^*$
GST-PDK-1 有り	12.1 ± 2.4	$20.6 \pm 1.8^{##}$	24.3 ± 4.8

表 2

	GFP	δ AL-PIF-GFP	Lynsig- δ AL-PIF-GFP
GST-PDK-1 なし	14.6 ± 3.1	$33.4 \pm 2.5^*$	22.3 ± 4.7
GST-PDK-1 有り	15.1 ± 4.0	$18.5 \pm 4.3^{\#}$	13.5 ± 1.9

その結果、表 1 及び表 2 に示されるように、対照である GFP のみを発現した細胞と比較すると、COS-7 細胞及び PC-12 細胞のいずれにおいても、 δ AL-PIF-GFP の発現によりアポトーシスを示す細胞の割合 (%) は有意に増加した。

また表 1 及び表 2 に示されるように、Lynsig- δ AL-PIF-GFP を発現させた場合、対照である GFP のみを発現した細胞と比較して、COS-7 細胞においては、有意にアポトーシスを示す細胞の割合の増加を引き起こし、PC-12 細胞においても、アポトーシス誘導細胞数は増加した。

したがって、偽基質 δ AL-PIF-GFP の発現及び偽基質 Lynsig- δ AL-PIF-GFP の発現により、癌由来培養細胞において、有意にアポトーシスを誘発することがわかった。

さらに、前記偽基質とともにGST-PDK-1を発現させた場合、表1及び表2に示されるように、GST-PDK-1と δ AL-PIF-GFPとの共発現により、アポトーシスはCOS-7細胞及びPC-12細胞の両方で有意に抑制された。

まかかる結果より、外因的にPDK-1を過剰発現させることにより、偽基質の効果が弱まると考えられたので、前記偽基質によるアポトーシスは、内因性のPDK-1を介して起こっていることが示唆された。

配列表フリーテキスト

配列番号：1は、PKB/Aktのactivation loopの配列である。

配列番号：2は、 δ PKCのactivation loopの配列である。

配列番号：3は、PDK-1相互作用断片(PIF)の配列である。

配列番号：4は、Lynの配列である。

配列番号：5は、PKBAL-PIFから産生したPDK-1の阻害剤の配列である。

配列番号：6は、PKBAL-PIF-GFPから産生したPDK-1のGFP結合阻害剤の配列である。

配列番号：7は、 δ AL-PIFから産生したPDK-1の阻害剤の配列である。

配列番号：8は、 δ AL-PIFから産生したGFP結合阻害剤の配列である。

配列番号：9は、activation loopの部分配列である。

産業上の利用可能性

本発明により、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ1の活性の異常に起因する疾患、癌等への治療手段の開発を行なうことができる。

請求の範囲

1. (A) 配列番号：1又は2に示されるアミノ酸配列、
(B) 配列番号：1又は2に示されるアミノ酸配列において、少なくとも1個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は付加を有するアミノ酸配列、及び
(C) 配列番号：1又は2に示されるアミノ酸配列に対し、BLASTアルゴリズム (Cost to open gap 11, Cost to extend gap 1, expect value 10, word size 3) によりアラインメントされ、算出された配列同一性が、少なくとも26%であるアミノ酸配列、
からなる群より選ばれたアミノ酸配列と、
(a) 配列番号：3に示されるアミノ酸配列、
(b) 配列番号：3に示されるアミノ酸配列において、少なくとも1個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は付加を有するアミノ酸配列、及び
(c) 配列番号：3に示されるアミノ酸配列に対し、BLASTアルゴリズム (Cost to open gap 11, Cost to extend gap 1, expect value 10, word size 3) によりアラインメントされ、算出された配列同一性が、少なくとも26%であるアミノ酸配列、
からなる群より選ばれたアミノ酸配列とを含有し、かつ生体内において、ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ1の活性を阻害する活性阻害物質をコードする核酸を含有してなる、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ1の活性阻害物質の発現用核酸構築物。
2. 活性阻害物質をコードする核酸が、
(i) 配列番号：4に示されるアミノ酸配列、

(i i) 配列番号：4に示されるアミノ酸配列において、少なくとも1個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は付加を有するアミノ酸配列、及び

(i i i) 配列番号：4に示されるアミノ酸配列に対し、BLASTアルゴリズム (Cost to open gap 11, Cost to extend gap 1, expect value 10, wordsize 3) によりアラインメントされ、算出された配列同一性が、少なくとも26%であるアミノ酸配列、

からなる群より選ばれたアミノ酸配列

をコードする核酸の下流に作動可能に連結されてなる、請求項1記載の発現用核酸構築物。

3. 活性阻害物質をコードする核酸が、テロメラーゼプロモーター支配下に発現する、請求項1又は2記載の発現用核酸構築物。

4. 請求項1～3いずれか1項記載の発現用核酸構築物を保持してなる、哺乳動物細胞における3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ1の活性阻害物質の発現用担体。

5. 請求項1～3いずれか1項に記載の発現用核酸構築物又は請求項4記載の発現用担体を有効成分として含有してなる、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ1によるリン酸化活性に起因する疾患の治療剤。

6. 疾患が、癌である、請求項5記載の治療剤。

7. 請求項1～3いずれか1項に記載の発現用核酸構築物の発現産物を有効成分として含有してなる、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ1によ

るリン酸化活性に起因する疾患の治療剤。

8. 発現産物が、

(I) 配列番号：5 又は配列番号：7 に示されるアミノ酸配列、

(I I) 配列番号：5 又は配列番号：7 に示される配列において、少なくとも1個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は付加を有するアミノ酸配列、及び

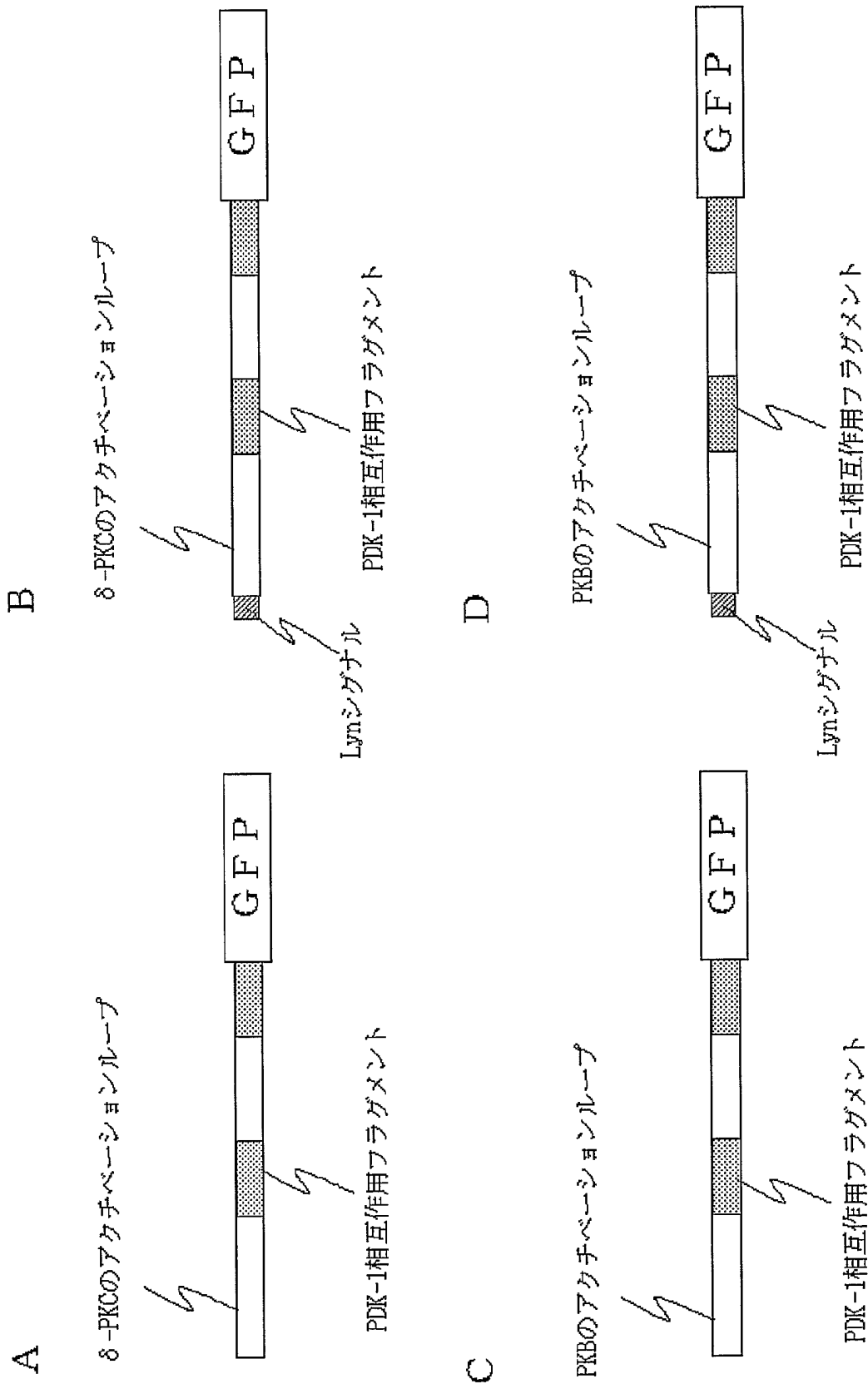
(I I I) 配列番号：5 又は配列番号：7 に示されるアミノ酸配列に対し、BLASTアルゴリズム (Cost to open gap 11, Cost to extend gap 1, expect value 10, words i ze 3) によりアラインメントされ、算出された配列同一性が、少なくとも26%であるアミノ酸配列、

からなる群より選ばれたアミノ酸配列を含有したポリペプチドである、請求項7記載の治療剤。

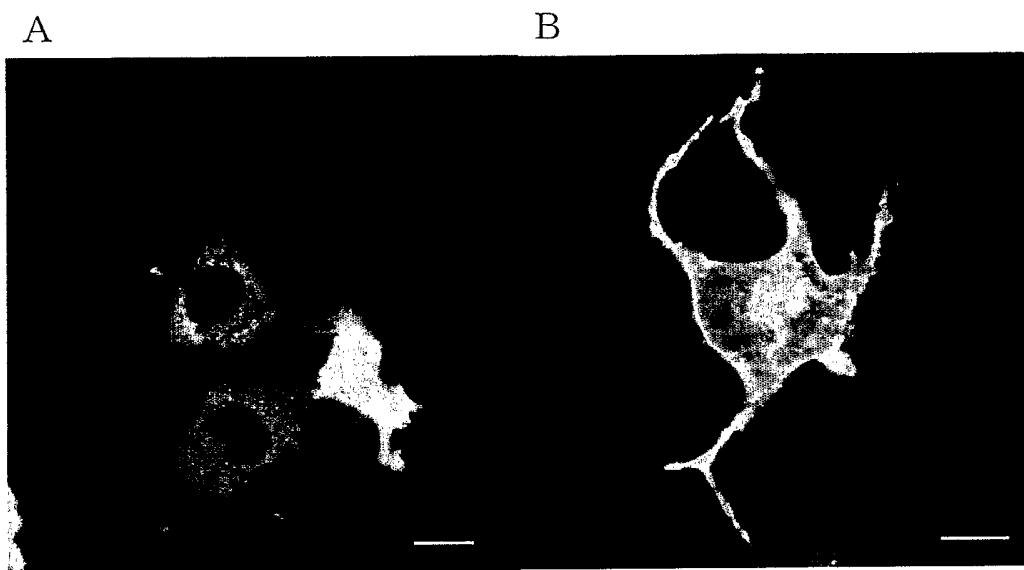
9. 請求項1～3いずれか1項に記載の発現用核酸構築物又は請求項4記載の発現用担体を、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ1によるリン酸化活性の異常に起因する疾患に罹患した個体に、治療上有効量投与する、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ1によるリン酸化活性の異常に起因する疾患の治療方法。

10. 3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ1によるリン酸化活性の異常に起因する疾患の治療用医薬組成物の製造のための、請求項1～3いずれか1項に記載の発現用核酸構築物又は請求項4記載の発現用担体の使用。

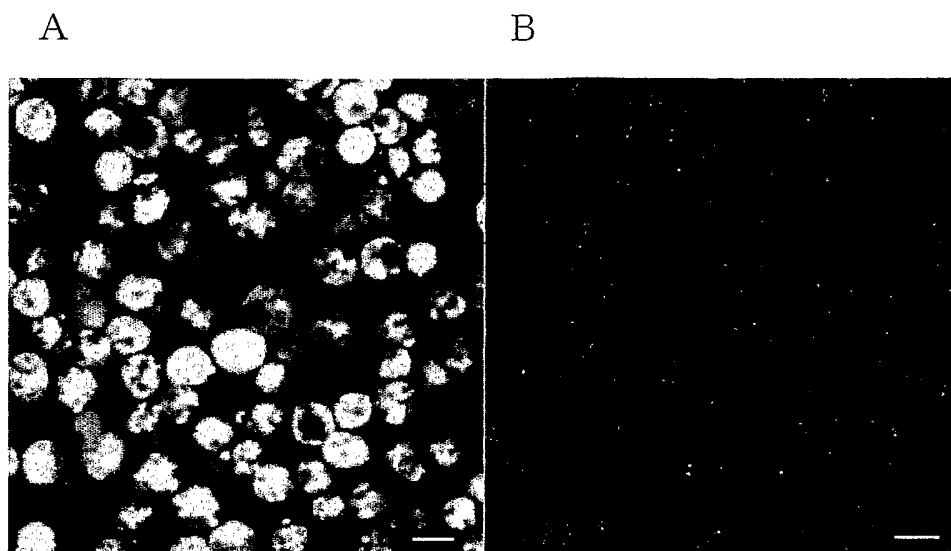
第 1 図



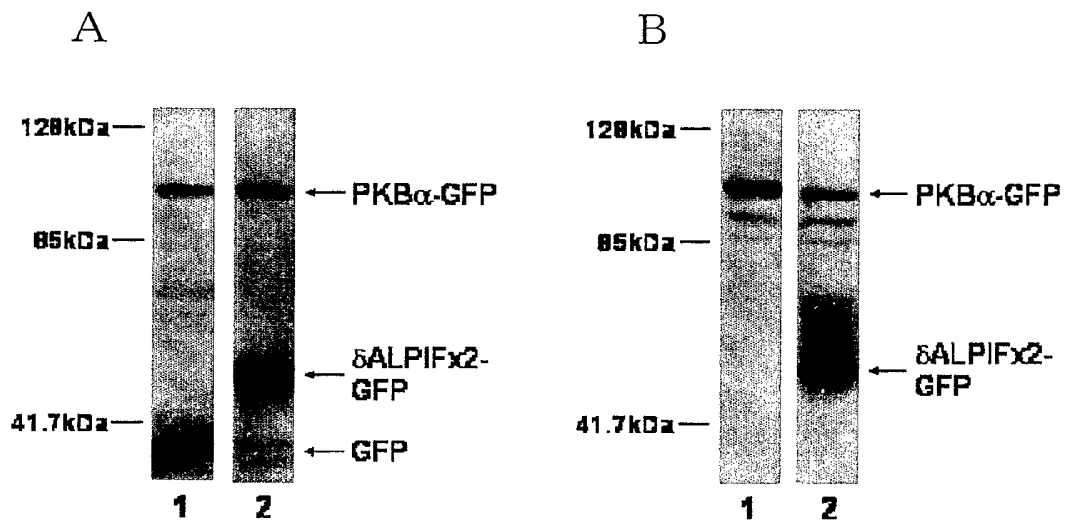
第 2 図



第 3 図



第 4 図



SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

<120> A nucleic acid construct for expressing an inhibitor for PDK-1 activity

<130> 04-024-PCTJP

<150> JP2003-298760

<151> 2003-08-22

<160> 9

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> a sequence of activation loop on PKB/Akt

<400> 1

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

Pro Glu Val

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> a sequence of activation loop on delta PKC

<400> 2

Gly Glu Asn Arg Ala Ser Thr Phe Cys Gly Thr Pro Asp Tyr Ile Ala
1 5 10 15

Pro Glu Ile

<210> 3

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> PDK1-interacting fragment (PIF)

<400> 3

Arg Arg Glu Pro Arg Ile Leu Ser Glu Glu Glu Gln Glu Met Phe Arg
 1 5 10 15

Asp Phe Asp Tyr Ile Ala Asp Trp Cys
 20 25

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> a sequence of Lyn

<400> 4

Met Gly Cys Ile Lys Ser Lys Arg Lys Asp
 1 5 10

<210> 5

<211> 91

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> a sequence of an inhibitor for PDK-1 produced from PKBAL-PIF

<400> 5

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

Ala Pro Glu Val Arg Arg Glu Pro Arg Ile Leu Ser Glu Glu Glu Gln
 20 25 30

Glu Met Phe Arg Asp Phe Asp Tyr Ile Ala Asp Trp Cys Lys Leu Asp
 35 40 45

Gly Ala Thr Met Lys Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro
 50 55 60

Glu Val Arg Arg Glu Pro Arg Ile Leu Ser Glu Glu Glu Gln Glu Met
 65 70 75 80

Phe Arg Asp Phe Asp Tyr Ile Ala Asp Trp Cys
 85 90

<210> 6
 <211> 345
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> a sequence of a GFP-conjugated inhibitor for PDK-1 produced from
 PKBAL-PIF-GFP

<400> 6

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

Ala Pro Glu Val Arg Arg Glu Pro Arg Ile Leu Ser Glu Glu Glu Gln
 20 25 30

Glu Met Phe Arg Asp Phe Asp Tyr Ile Ala Asp Trp Cys Lys Leu Asp
 35 40 45

Gly Ala Thr Met Lys Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro
 50 55 60

Glu Val Arg Arg Glu Pro Arg Ile Leu Ser Glu Glu Glu Gln Glu Met
 65 70 75 80

Phe Arg Asp Phe Asp Tyr Ile Ala Asp Trp Cys Glu Phe Met Val Ser
 85 90 95

Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu
 100 105 110

Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu
 115 120 125

Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr
 130 135 140

Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Ala Tyr
 145 150 155 160

Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp
 165 170 175

Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile
 180 185 190

Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe
 195 200 205

Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe
 210 215 220

Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Phe Asn
 225 230 235 240

Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys
 245 250 255

Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu
 260 265 270

Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu
 275 280 285

Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp
 290 295 300

Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala
 305 310 315 320

Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ser Gly Gly Ser
 325 330 335

Thr Ile Ser Gly Ser Trp Pro Ala Ser
 340 345

<210> 7
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> a sequence of an inhibitor for PDK-1 produced from delta AL-PIF

<400> 7

Met Gly Glu Asn Arg Ala Ser Thr Phe Cys Gly Thr Pro Asp Tyr Ile
 1 5 10 15

Ala Pro Glu Ile Arg Arg Glu Pro Arg Ile Leu Ser Glu Glu Glu Gln
 20 25 30

Glu Met Phe Arg Asp Phe Asp Tyr Ile Ala Asp Trp Cys Lys Leu Gly

35

40

45

Glu Asn Arg Ala Ser Thr Phe Cys Gly Thr Pro Asp Tyr Ile Ala Pro
 50 55 60

Glu Ile Arg Arg Glu Pro Arg Ile Leu Ser Glu Glu Glu Gln Glu Met
 65 70 75 80

Phe Arg Asp Phe Asp Tyr Ile Ala Asp Trp Cys
 85 90

<210> 8

<211> 343

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> a sequence of a GFP-conjugated inhibitor for PDK-1 produced from
 delta AL-PIF

<400> 8

Met Gly Glu Asn Arg Ala Ser Thr Phe Cys Gly Thr Pro Asp Tyr Ile
 1 5 10 15

Ala Pro Glu Ile Arg Arg Glu Pro Arg Ile Leu Ser Glu Glu Glu Gln
 20 25 30

Glu Met Phe Arg Asp Phe Asp Tyr Ile Ala Asp Trp Cys Lys Leu Gly
 35 40 45

Glu Asn Arg Ala Ser Thr Phe Cys Gly Thr Pro Asp Tyr Ile Ala Pro
 50 55 60

Glu Ile Arg Arg Glu Pro Arg Ile Leu Ser Glu Glu Glu Gln Glu Met
 65 70 75 80

Phe Arg Asp Phe Asp Tyr Ile Ala Asp Trp Cys Met Val Ser Lys Gly
 85 90 95

Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly
 100 105 110

Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp
 115 120 125

Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys
 130 135 140
 Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Ala Tyr Gly Val
 145 150 155 160
 Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe
 165 170 175
 Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe
 180 185 190
 Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly
 195 200 205
 Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu
 210 215 220
 Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Phe Asn Ser His
 225 230 235 240
 Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn
 245 250 255
 Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp
 260 265 270
 His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro
 275 280 285
 Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn
 290 295 300
 Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly
 305 310 315 320
 Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ser Gly Gly Ser Thr Ile
 325 330 335
 Ser Gly Ser Trp Pro Ala Ser
 340

<210> 9
 <211> 5
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> a partial sequence of activation loop

<400> 9

Thr	Phe	Cys	Gly	Thr
1				5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004536

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C07K19/00, C12N9/99, A61K38/16, A61K48/00, A61P35/00

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C07K19/00, C12N9/99, A61K38/16, A61K48/00, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

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

WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

Swissprot/PIR/Genseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2003-516760 A (University of Dundee), 20 May, 2003 (20.05.03), Example 2 & WO 2001/044497 A2 & EP 1234188 A2 & US 2003/143656 A1 & AU 2001/021873 A	1-8, 10
A	JP 2002-539780 A (University of Dundee), 26 November, 2002 (26.11.02), & WO 2000/056864 A2 & EP 1165761 A2	1-8, 10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02 June, 2004 (02.06.04)

Date of mailing of the international search report

15 June, 2004 (15.06.04)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004536

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Hill M.M. et al., Insulin-stimulated protein kinase b phosphorylation on Ser-473 is independent of itd activity and occurs through a Staurosporine-insensitive kinase, J.Biol.Chem., 2001, Vol.276, pages 25643 to 25646	1-8, 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004536

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004536

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 9
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
It pertains methods for treatment of the human body by surgery or therapy and diagnostic methods.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N15/09, C07K19/00, C12N9/99, A61K38/16, A61K48/00, A61P35/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N15/09, C07K19/00, C12N9/99, A61K38/16, A61K48/00, A61P35/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN) Swissprot/PIR/Genseq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2003-516760 A (ユニバーシティー オブ ダンディー) 20.05.2003, 実施例 2 等 & WO 2001/044497 A2 & EP 1234188 A2 & US 2003/143656 A1 & AU 2001/021873 A	1-8, 10
A	JP 2002-539780 A (ユニバーシティー オブ ダンディー) 26.11.2002, & WO 2000/056864 A2 & EP 1165761 A2	1-8, 10
☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 02.06.2004	国際調査報告の発送日 15.6.2004	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号	特許庁審査官 (権限のある職員) 深草 亜子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 B 9548

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Hill M.M. et al., Insulin-stimulated protein kinase b phosphorylation on Ser-473 is independent of itd activity and occurs through a Staurosporine-insensitive kinase, J.Bio l.Chem., 2001, Vol.276, p.25643-25646	1-8, 10

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 9 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

手術又は治療による人体の処置方法及び診断方法 である。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。