

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4237945号
(P4237945)

(45) 発行日 平成21年3月11日(2009.3.11)

(24) 登録日 平成20年12月26日(2008.12.26)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00

B

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 P 21/02

C

請求項の数 25 (全 51 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-606725 (P2000-606725)
 (86) (22) 出願日 平成12年3月14日(2000.3.14)
 (65) 公表番号 特表2002-539781 (P2002-539781A)
 (43) 公表日 平成14年11月26日(2002.11.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2000/006574
 (87) 国際公開番号 W02000/056866
 (87) 国際公開日 平成12年9月28日(2000.9.28)
 審査請求日 平成15年6月20日(2003.6.20)
 (31) 優先権主張番号 60/125,108
 (32) 優先日 平成11年3月19日(1999.3.19)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

前置審査

(73) 特許権者 500137976
 アベンティス・ファーマスーティカルズ・
 インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国ニュージャージー州088
 07.ブリッジウォーター.コーポレート
 ドライブ55
 (74) 代理人 100091731
 弁理士 高木 千嘉
 (72) 発明者 クン・グウォウ
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州1940
 3.イーグルビル.イーグルストリームド
 ライブ103.アパートメントナンバー2
 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 AKT核酸、ポリペプチドおよびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列Cys - Gln - Gln - Ser - Asp - Cys - Gly - Met - Leu - Gly - Asn - Trp - Lys - Lysを含む
 ヒトAkt3タンパク質をコードする単離された核酸であって、ここでその核酸はSEQ ID
 NO: 2のアミノ酸配列を含むヒトAkt3タンパク質をコードする核酸である。

【請求項2】

SEQ ID NO: 1 に示される配列を含む、請求項1記載の単離された核酸。

【請求項3】

さらに、一つのポリペプチドタグをコードする配列を含み、それによりその核酸が、タ
 グされたキメラAkt3タンパク質をコードする、請求項1記載の単離された核酸。

10

【請求項4】

さらに、ミリスチル化配列をコードする配列を含む、請求項1記載の単離された核酸。

【請求項5】

請求項1記載の核酸を含むベクター。

【請求項6】

ヒトAkt3タンパク質をコードする核酸が、発現コンピテント宿主細胞においてヒト
 Akt3の発現を可能にする発現調節配列と作動的に結合する、請求項5記載のベクター
 。

【請求項7】

RNA分子、プラスミドDNA分子およびウイルスベクターからなる群より選択される

20

、請求項 6 記載のベクター。

【請求項 8】

レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルスおよびワクシニアウイルスからなる群より選択されるウイルスベクターである、請求項 7 記載のベクター。

【請求項 9】

請求項 5 記載のベクターを感染させた宿主細胞。

【請求項 10】

請求項 6 記載のベクターを感染させた宿主細胞。

【請求項 11】

細菌細胞、酵母細胞および哺乳類細胞からなる群より選択される、請求項 9 記載の宿主細胞。

【請求項 12】

請求項 9 記載の宿主細胞を培地中、ヒト Akt 3 の発現を可能にする条件下で培養し、次いでその培養からヒト Akt 3 タンパク質を単離することを含むヒト Akt 3 タンパク質の製造方法。

【請求項 13】

配列 Cys - Gln - Gln - Ser - Asp - Cys - Gly - Met - Leu - Gly - Asn - Trp - Lys - Lys を含む単離されたヒト Akt 3 タンパク質であって、ここでそのタンパク質は SEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列を含むヒト Akt 3 タンパク質である。

【請求項 14】

さらに一つのタグ配列を含む、請求項 13 記載の単離されたヒト Akt 3 タンパク質。

【請求項 15】

さらにミリスチル化配列を含む、請求項 14 記載の単離されたヒト Akt 3 タンパク質。

【請求項 16】

請求項 13 記載のヒト Akt 3 タンパク質を特異的に結合し、配列 Cys - Gln - Gln - Ser - Asp - Cys - Gly - Met - Leu - Gly - Asn - Trp - Lys - Lys を有するペプチド内の一つのエピトープを特異的に認識する抗体。

【請求項 17】

ポリクロナールである請求項 16 記載の抗体。

【請求項 18】

請求項 1 記載の核酸および製薬的に許容し得るビヒクルを含有する医薬組成物。

【請求項 19】

リポソーム、核タンパク質との複合体、脂質またはデキストランからなる群より選択される形態または未処理形態での請求項 1 記載の核酸および製薬的に許容し得るビヒクルを含有する医薬組成物。

【請求項 20】

請求項 5 記載のベクターおよび製薬的に許容し得るビヒクルを含有する医薬組成物。

【請求項 21】

発現調節配列が、哺乳類細胞中において作用性であるプロモーターを含む、請求項 5 記載のベクター。

【請求項 22】

プロモーターが、ウイルス性、細胞性または合成のプロモーターからなる群より選択される、請求項 21 記載のベクター。

【請求項 23】

ゲノム中に請求項 1 記載の核酸を含む、複製欠損の組換えウイルス。

【請求項 24】

ウイルスがレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ワクシニアウイルスおよび HSV ウイルスからなる群より選択される、請求項 23 記載の複製欠損の組換え

10

20

30

40

50

ウイルス。

【請求項 25】

(a) 作動的に調節領域に連結している請求項 1 記載の核酸または (b) 請求項 13 記載の単離されたヒト Akt3 タンパク質を含有する ASK1 によって誘導されるアポトーシスから生じる細胞死抑制用薬剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、単離された核酸、それらを含むベクターおよび治療における、特に遺伝子治療におけるそれらの使用に関する。より具体的には、本発明は Akt アイソフォーム (Akt3 と称する) をコードする核酸、および遺伝子治療におけるそれらの使用に関する。活性化 Akt3 の発現は、アポトーシス刺激キナーゼ 1 (ASK1) によって誘発されるアポトーシス性細胞死を防止する。

10

【0002】

【従来技術】

Akt およびアポトーシス：

アポトーシス (計画的細胞死) は、胚の発育および種々の疾患 (例えば退行性神経疾患および心臓血管性疾患) の発生病理に重要な役割を果たす (MacLellan et al. (1998) ; Barinaga (1997a) ; Barinaga (1997b))。したがって、最近の研究は、計画的細胞死の調節または実行に必要な種々のプロアポトーシスおよびアンチアポトーシス遺伝子生成物の特定を目的としていた。アンチアポトーシス遺伝子 (例えば Bcl2 または Bcl-x) は、種々の刺激によって誘発される計画的細胞死を抑制する。他方、プロアポトーシス遺伝子 (例えば Bax または Bad) の発現は計画的細胞死をもたらす (Aams et al (1998))。計画的細胞死の実行は、カスパーゼ - 1 関連プロテイナーゼ (カスパーゼ - 1、カスパーゼ - 3、カスパーゼ - 7、カスパーゼ - 8 およびカスパーゼ - 9 などを含む) によって仲介される (Thorneberry et al. (1998))。

20

【0003】

細胞生存 / 細胞死の調節に必要な 2 つの細胞内シグナリング経路が最近研究されている。アポトーシス刺激キナーゼ 1 (ASK1) の活性化は種々のタイプの細胞にアポトーシスをもたらすが (Ichijo et al. (1997))、一方、ホスホイノシチド 3 - キナーゼ (PI3K) および Akt を必要とする経路は細胞防御をもたらす。ASK1 活性は、腫瘍壊死因子アルファ (TNF) 処理または Fas 連結によって誘発されることが示された (Ichijo et al. (1997) ; Chang et al. (1998))。ASK1 優性ネガティブ変異体の過剰発現は TNF または Fas リガンドによって誘発されるアポトーシスを抑制し、ASK1 が TNF または Fas リガンドによって誘発されるアポトーシス性細胞死において重要な役割を果たすことを示唆している。ASK1 がアポトーシスを誘発する分子的メカニズムは明らかではない。ASK1 の異所性発現がストレスによって活性化される種々のシグナリング経路、例えば MKK4 / JNK および MKK6 / p38 経路 (これらは ASK1 誘発アポトーシスを仲介すると思われる (Ichijo et al. (1997))) の活性化をもたらすことが示された。

30

【0004】

PI3K / Akt 経路はまた細胞生存 / 細胞死の調節に重要らしい (Kulil et al. (1997) ; Kauffmann-Zeh et al. ; Hemmings (1997) ; Dudek et al. (1997))。生存因子、例えば血小板由来増殖因子 (PDGF)、神経増殖因子 (NGF) およびインスリン様増殖因子 - 1 (IGF-1) は、PI3K の活性を誘発することによって種々の条件下で細胞の生存を促進する (Kulik et al. (1997) ; Hemmings (1997))。活性化 PI3K は、ホスファチジルイノシトール (3,4,5) - トリホスフェート (PtdIns (3,4,5) - P3) の産生をもたらす (PtdIns (3,4,5) - P3 はセリン / スレオニンキナーゼを含む AH / PH - ドメインに結合してその活性を誘発する) (Frankel et al. (1995) ; Hemmings (1997b) ; Downward (1998) ; Alessi et al. (1996))。PI3K または優性ネガティブ Akt 変異体の特異的な抑制物質は、これら増殖因子またはサイトカインの生存促進活性

40

50

を停止させる。さらに、構成的に活性な P I 3 K または A k t 変異体の誘発は、細胞が通常アポトーシス性細胞死に至る条件下で細胞の生存を促進する (Kulik et al.(1997) ; Duddek et al.(1997))。これらの所見は、P I 3 K / A k t 経路は細胞の生存とアポトーシスの調節に重要な役割を果たすことを示している。

【 0 0 0 5 】

ヒトの A k t 蛋白質キナーゼの 2 つのアイソフォーム、A k t 1 および A k t 2 が特定された (Staal (1987))。ラットの A k t 配列もまた特定された (Konishi et al.(1995))。ヒトの A k t 1 の C 末端のセリン - 4 7 3 はその調節作用に必須であることが示された (Stokeo et al.(1997) ; Stephens et al.(1998))。増殖因子による刺激に際して P I 3 K が活性化される。P I 3 K の生産物、P t d I n s (3 , 4 , 5) - P は A k t 1 と結合し、A k t 1 を細胞質から細胞質内膜の近傍へ移動させ、ここで A k t 1 の残基スレオニン 3 0 8 およびセリン 4 7 3 はリン酸化される (Downward (1998))。これら残基のリン酸化は A k t 1 の活性化に極めて重要である。最近特定された蛋白質キナーゼ、P D K 1 はスレオニン 3 0 8 のリン酸化に必要であることが示されたが、一方セリン 4 7 3 をリン酸化するキナーゼは未だ特定されていない (Stokeo et al.(1997) ; Stephens et al.(1998))。

【 0 0 0 6 】

遺伝子治療 :

遺伝子治療は、患者 (例えば患者の罹患細胞または器官) に遺伝情報を導入することによって欠損または異常 (変異、異常な発現など) を修正することを含む。この遺伝情報は、in vitro で細胞に導入され、続いてこの改変細胞が身体に再導入されるか、または in vivo で直接適当な部位に導入される。これに関して種々のトランスフェクション技術および遺伝子導入技術が文献に記載されている (例えば以下を参照されたい : Roemer & Friedman, Eur. J. Biochem. 208:211(1992))。これらの技術には、“裸出 DNA” のトランスフェクション技術並びに DNA および D E A E - デキストラン複合体 (Pagano et al. J. Virol. 1:891(1967))、DNA および核蛋白質複合体 (Kaneda et al. Science 243:375(1989))、DNA および脂質複合体 (Felgner et al. PNAS 84:7413(1987)) を必要とする技術、リポソームの使用 (Fraley et al. J. Biol. Chem. 255:10431(1980)) などが含まれる。より最近では、遺伝子導入用ベクターとしてウイルスの使用が、物理的トランスフェクション技術に代わる有望な選択肢として出現してきた。これに関して、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、アデノ付随ウイルスおよびアデノウイルスを含む種々のウイルスが一定の細胞集団に感染する能力について調べられた。

本明細書に引用したいずれの文献も、そのような文献が本出願に対する“従来技術”として入手可能であることを認めたものと解されるべきではない。

【 0 0 0 7 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の第一の目的は、新規な A k t 蛋白質またはポリペプチドをコードする単離核酸に関する。より具体的には、本発明は、C y s - G l n - G l n - S e r - A s p - C y s - G l y - M e t - L e u - G l y - A s n - T r p - L y s - L y s なる配列または実質的に同様の配列を含むヒト A k t 3 蛋白質をコードする単離核酸に関する。ここで前記核酸は下記から選ばれる特性を有する :

A . それは、配列番号 5 および配列番号 6 に由来するオリゴヌクレオチドプライマー対を用いてポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) によって増幅できる ;

B . それは、配列番号 1 に示すヌクレオチド配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする ;

C . それは、配列番号 2、そのスプライス変異体およびその対立遺伝子座変異体から成る群から選ばれるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする ;

D . それは、C y s - G l n - G l n - S e r - A s p - C y s - G l y - M e t - L e u - G l y - A s n - T r p - L y s - L y s なる配列または実質的に同様の配列を有するペプチド内のエピトープに対して産生された抗体と特異的に結合するポリペプチドをコ

ードする。

好ましくは、本核酸は配列番号2に示すアミノ酸配列を含むヒトA k t 3蛋白質をコードする。より好ましくは、本核酸は配列番号1に示す配列を含む。本核酸は、場合によってポリペプチドタグをコードする配列を含み、それによってタグされたキメラA k t 3蛋白質をコードすることができる。別の特徴では、本核酸は、場合によってミリスチル化配列をコードする配列を含むことができる。好ましい実施態様では、本核酸は哺乳類細胞でA k t 3蛋白質の発現を可能にする領域を含む。

【0008】

本発明はまた上記の核酸を含有するベクターに関する。好ましくは、ヒトA k t 3蛋白質をコードする核酸は、発現調節を有する宿主細胞でヒトA k t 3を発現させることができる発現制御配列と機能的に結合される。この発現制御配列は、哺乳類細胞で機能することができるプロモーターを含むことができる。本ベクターはプラスミドDNA分子またはウイルスベクターであろう。好ましいウイルスベクターには、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ付随ウイルス、ヘルペスウイルスおよびワクシニアウイルスが含まれる。したがって、本発明はさらに、そのゲノム内に上記のA k t 3をコードする核酸を含む複製欠損組み換えウイルスに関する。

別の実施態様では、本発明は上記のベクターでトランスフェクトされた宿主細胞に関する。本宿主細胞は細菌細胞、酵母細胞または哺乳類細胞であろう。さらに別の実施態様では、本発明はヒトA k t 3蛋白質を製造する方法に関する。本方法は、ヒトA k t 3蛋白質を発現させる条件下で上記の宿主細胞を培養液中で培養することを含む。

【0009】

本発明はさらに、C y s - G l n - G l n - S e r - A s p - C y s - G l y - M e t - L e u - G l y - A s n - T r p - L y s - L y sなる配列または実質的に同様の配列を含み、下記から選ばれる特性を有する単離ヒトA k t 3蛋白質に関する：

A．それは上記の核酸によってコードされる；

B．それは、配列番号2に示すアミノ酸配列、そのスプライス変異体またはその対立遺伝子座変異体を含む；さらに

C．それは、C y s - G l n - G l n - S e r - A s p - C y s - G l y - M e t - L e u - G l y - A s n - T r p - L y s - L y sなる配列または実質的に同様の配列を有するペプチド内のエピトープに対して産生された抗体と特異的に結合する。

好ましくは、本蛋白質は配列番号2に示すアミノ酸配列を含む。本蛋白質は場合によってタグ配列を含むことができる。さらに別の実施態様では、本蛋白質は場合によってミリスチル化配列を含むことができる。

【0010】

本発明はまた抗原性ペプチドおよびそれに対する抗体に関する。より具体的には、本発明は、C y s - G l n - G l n - S e r - A s p - C y s - G l y - M e t - L e u - G l y - A s n - T r p - L y s - L y sなる配列または実質的に同様の配列を含む抗原性ペプチドであって、さらにヒトA k t 3蛋白質の断片であるものに関する。ここで前記A k t 3蛋白質は下記から選ばれる特性を有する：

A．それは上記の核酸によってコードされる；

B．それは、配列番号2に示すアミノ酸配列、そのスプライス変異体またはその対立遺伝子座変異体を含む；さらに

C．それは、C y s - G l n - G l n - S e r - A s p - C y s - G l y - M e t - L e u - G l y - A s n - T r p - L y s - L y sなる配列または実質的に同様の配列を有するペプチド内のエピトープに対して産生された抗体と特異的に結合する。

好ましくは、本抗原性ペプチドは本質的にC y s - G l n - G l n - S e r - A s p - C y s - G l y - M e t - L e u - G l y - A s n - T r p - L y s - L y sなる配列またはその抗原性断片から成る。さらに別の実施態様では、本発明は、上記のヒトA k t 3蛋白質と特異的に結合する抗体に関する。好ましい実施態様では、本抗体は、C y s - G l n - G l n - S e r - A s p - C y s - G l y - M e t - L e u - G l y - A s n - T r

10

20

30

40

50

p - L y s - L y s なる配列を有するペプチド内のエピトープを特異的に認識する。本抗体はポリクローナルでもモノクローナルでもよい。

【0011】

本発明はまた、上記の核酸を細胞に投与することによって細胞のアポトーシスまたは壊死を抑制する方法に関する。好ましくは、本核酸は調節領域に機能的に連結される。本核酸はプラスミドでもウイルスベクターでもよい。好ましい細胞には心臓細胞が含まれる。より好ましくはこの細胞は心筋細胞である。好ましい実施態様では、この細胞は心筋梗塞または虚再灌流障害をもつ患者の細胞である。したがって、本発明はまた、心筋梗塞または虚再灌流障害をもつ患者に調節領域に機能的に連結された上記の核酸を投与することによって、心筋梗塞または虚血再灌流障害を治療する方法に関する。好ましくは、本核酸は患者の心筋細胞に投与される。本核酸はプラスミドまたはウイルスベクターの形態を有するであろう。好ましいウイルスベクターにはレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ付随ウイルス、ワクシニアウイルスおよびHSVウイルスが含まれる。

10

【0012】

本発明はまた、人間または動物の身体を外科的または内科的に処置するための医薬組成物の製造にこれら核酸またはベクターを使用することに関する。本発明はまた、上記のベクター（特にウイルスベクター）および核酸を含む任意の医薬組成物に関する。

【0013】

さらに別の実施態様では、本発明は、A k t 3 蛋白質を候補分子と接触させ、前記分子の存在下でA k t 3 活性を検出することによって細胞でA k t 3 活性を刺激または抑制する分子をスクリーニングする方法に関する。候補分子はA k t 3 の作動薬または拮抗薬のいずれかであろう。好ましい実施態様では、A k t 3 は細胞内で核酸から発現され、測定されるA k t 3 活性はアポトーシスの抑制である。アポトーシスの抑制はマーカー遺伝子の存在によって測定できる。

20

【0014】

一般に本発明はまた、細胞内のA k t 3 蛋白質レベルを増加させることによって細胞のA k t 3 活性を増加させる方法に関する。好ましい実施態様では、A k t 3 蛋白質を発現させることができる条件下でA k t 3 をコードするベクターで細胞をトランスフェクトした。同様に、本発明は、細胞内のA k t 3 蛋白質レベルを低下させることによって細胞のA k t 3 活性を抑制する方法に関する。A k t 3 蛋白質レベルは、A k t 3 アンチセンス核酸を前記アンチセンス核酸が細胞内の条件でA k t 3 m R N A とハイブリダイズするような条件下で細胞に導入することによって低下させることができる。A k t 3 蛋白質レベルはまた、A k t 3 と特異的に結合する一本鎖F v 抗体（s c F v）を、A k t 3 と結合してこれを不活化するために十分なレベルで細胞に導入することによって低下させることができる。

30

【0015】

添付図面において：

図1は図1はA k t 3 配列のアラインメントである。図1 A は、ヒトA k t 1（配列番号14）、A k t 2（配列番号13）およびA k t 3（配列番号2）のアミノ酸配列のアラインメントで、図1 B は、ラットA k t（配列番号17）およびヒトA k t 3（配列番号2）アミノ酸配列のアラインメントである。

40

図2はA k t 3 m R N A の組織分布パターンを示す。A k t 3 特異的プローブは実施例で述べたように調製した。多数のヒト組織m R N A プロット（Clontech）をA k t 3 特異的プローブとハイブリダイズさせた（詳細については実施例を参照されたい）。

図3は活性化A k t 3 変異体の構築を示す。図3 A は活性化A k t 3 の模式図である。ヒトA k t 3 の完全長コード配列をヒトS r c 遺伝子由来ミリスチル化シグナル（M y r）とN - 末端でフレーム内で融合させ、さらにC - 末端でH A タグ（H A）とフレーム内で融合させた（実施例を参照されたい）。図3 B は活性化A k t 3 のH E K 2 9 3 細胞での異所性発現を示す。H E K 2 9 3 細胞にC M V 6 - M y r A k t 3 H A または発現プラスミド（C M V 6）のみをトランスフェクトした。トランスフェクション後24時間で、細

50

胞溶解物を調製し、H A抗体を用いてイムノブロットを実施した。図3 Cは、活性化A k t 3はA k t活性をもつことを示す。H E K 2 9 3細胞に、活性化A k t 3のための発現プラスミド(M y r A k t 3 H A)または発現ベクターのみ(C M V 6)をトランスフェクトした。トランスフェクション後24時間で、細胞溶解物を調製し、H A抗体を用いてイムノブロットを実施した。イムノペレットのA k t 3キナーゼ活性は、G S K 3に由来する基質ペプチドを用いて測定した。B k g d: 非トランスフェクト細胞のバックグラウンドレベル、C M V 6: C M V 6トランスフェクト細胞、A k t 3 c a k: 構成的に活性化されたA k t 3のための発現プラスミド(C M V 6 - M y r A k t 3 H A)でトランスフェクトされた細胞(実施例を参照のこと)。

図4は活性化A k t 3はH E K 2 9 3細胞でA S K 1誘発細胞死を抑制することを示す。H E K細胞に表示のプラスミドとともにC M V - g a l プラスミド(0.1mg)をトランスフェクトした。各トランスフェクションのD N A量はC M Vベクターを添加することによって一定に保たれた。A k t 3 c a k: C M V 6 - M y r A k t 3 H A(0.4mg)、A S K 1: p C D N A 3 H A - A S K 1 - f l(0.4mg)。トランスフェクション後2日して、細胞を固定し、X - g a l 染色を施した。光学顕微鏡下で - g a l 陽性細胞(青色細胞)の数を5つの異なる視野で数えた。

【0016】

【課題を解決するための手段】

本発明は、新規なA k t蛋白質またはポリペプチド(A k t 3と称する)をコードする単離核酸を有利に提供する。したがって、本発明の第一の目的は、哺乳類細胞でのその発現を可能にすることができる領域の制御下で新規なA k t 3蛋白質またはポリペプチドをコードする単離核酸に関する。本発明はまた、A k t蛋白質またはポリペプチドをコードする核酸を含むベクターに関する。本発明はまた、人間または動物の身体の外科的および/または内科的処置のための医薬組成物の調製にこれら核酸またはベクターを使用することに関する。本発明はまた、上記のベクター(特にウイルスベクター)および核酸を含む任意の医薬組成物に関する。

本発明の種々の特徴は、前記核酸、ベクター、ウイルス、組成物および治療方法に関する下記の章で極めて詳細に説明される。種々の章から成る本構成は本発明の理解を容易にすることを意図したもので、本発明を限定しようとするものではない。

【0017】

定義:

以下の用語の定義が本明細書を通して使用され、本発明の範囲と実践の理解に役立つであろう。

具体的な実施態様で、“約”または“およそ”という用語はある数値または範囲の20%以内、好ましくは10%以内、より好ましくは5%以内を意味する。

“核酸”とは、共有結合によって連結されたヌクレオチドと称されるサブユニットで構成されたポリマー化合物である。核酸にはポリリボ核酸(R N A)およびポリデオキシリボ核酸(D N A)(これらは両者とも一本鎖でも二本鎖でもよい)が含まれる。D N Aにはc D N A、ゲノムD N A、合成D N Aおよび半合成D N Aが含まれる。

“遺伝子”とは、ポリペプチドをコードするヌクレオチドの集合物を指し、c D N AおよびゲノムD N Aが含まれる。

“組み換え(リコンビナント)D N A分子”とは、分子生物学的操作を経たD N A分子である。

【0018】

“ベクター”とは、宿主細胞に核酸を導入する任意の手段である。ベクターはレプリコンであって、付加したまた別のD N Aセグメントを増殖させるためにこの別のD N Aセグメントが前記レプリコンに結合されている。“レプリコン”とは、in vivoでD N A複製の自律的ユニットとして機能する(すなわちそれ自身の制御下で複製することができる)任意の遺伝的エレメント(例えばプラスミド、コスミド、染色体、ウイルス)である。“ベクター”という用語は、in vitro、ex vivoまたはin vivoで細胞に核酸を導入するウイル

10

20

30

40

50

ス性および非ウイルス性の両手段を含む。ウイルスベクターには、下記で極めて詳細に説明するようにレトロウイルス、アデノ付随ウイルス、ポックスウイルス、バキュロウイルス、ワクシニアウイルス、ヘルペスシンプレックスウイルス、エプスタイン＝バーウイルスおよびアデノウイルスベクターが含まれる。非ウイルスベクターには、プラスミド、リボソーム、荷電をもつ脂質（サイトフェクチン）、DNA蛋白質複合体およびバイオポリマーが含まれる。核酸の他に、ベクターはまた1つまたは2つ以上の調節領域、および/または核酸移入の成果（どの組織に移入されたか、発現の期間など）の選別、測定およびモニタリングに役立つ選別マーカーを含むことができる。

【0019】

“クローニングベクター”とは、レプリコン（例えばプラスミド、ファージまたはコスミド）で、別の付加DNAセグメントを増殖させるために前記レプリコンに別のDNAセグメントを結合させることができる。クローニングベクターは1つの細胞タイプでの複製能力および別の細胞タイプでの発現能力を有するであろう（シャトルベクター）。

“カセット”とは、特定の制限部位に挿入することができるDNAセグメントを指す。このDNAセグメントは問題のポリペプチドをコードし、さらにこのカセットおよび制限部位は、転写および翻訳のための適切な読み枠への本カセットの挿入を保証できるようにデザインされる。

外因性または異種DNAが細胞内に導入されたとき、この細胞は前記外因性または異種DNAを“トランスフェクト”されたという。前記トランスフェクトされたDNAが表現型の変化を生じたとき、この細胞は外因性または異種DNAによって“形質転換”されたという。形質転換DNAは、細胞のゲノムを構成している染色体DNAに組み込まれる（共有結合により連結される）ことができる。

【0020】

“核酸分子”とは、リボヌクレオシド（アデノシン、グアノシン、ウリジンまたはシチジン；“RNA分子”）またはデオキシリボヌクレオシド（デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシチミジンまたはデオキシシチジン；“DNA分子”）のリン酸エステルポリマーまたはその任意のホスホエステル類似体、例えばホスホロチオエートおよびチオエステルを指し、これらは一本鎖型または二本鎖らせんである。二本鎖DNA-DNA、DNA-RNAおよびRNA-RNAらせんが可能である。核酸分子、特にDNAまたはRNA分子という用語は、それら分子の一次および二次構造を指すだけであって、それらをいずれの特定の三次構造にも限定するものではない。したがってこの用語には、とりわけ直線状または環状DNA分子で見いだされる二本鎖DNA（例えば制限フラグメント）、プラスミドおよび染色体が含まれる。特定の二本鎖DNA分子の構造についていう場合、本明細書ではDNAの非転写鎖（すなわちmRNAと相同な配列を有する鎖）の5'から3'方向の配列のみを提示するという一般的慣行にしたがって配列が記載される。“組み換え（リコンビナント）DNA分子”とは、分子生物学的操作を経たDNA分子である。

【0021】

核酸分子は、その一本鎖形が別の核酸分子、例えばcDNA、ゲノムDNAまたはRNAと適当な温度および溶液イオン強度条件下で（Sambrook et al. 上掲書参照）アニールすることができる。前記核酸分子はこれら他の核酸分子と“ハイブリダイズ”することができる。温度およびイオン強度条件はハイブリダイゼーションの“厳正度（ストリンジェンシー）”を決定する。相同な核酸についての予備的スクリーニングの場合、低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件（ T_m が55°Cに対応する）を用いることができる。これは、例えば5×SSC、0.1%のSDS、0.25%のミルクおよびホルムアミド無し；または5×SSC、0.5% SDSである。中等度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件はより高い T_m に対応し、例えば40%ホルムアミドと5×または6×SSCである。高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件はもっとも高い T_m に対応し、例えば50%のホルムアミド、5×または6×SSC

10

20

30

40

50

である。ハイブリダイゼーションには2つの核酸が相補的な配列を含むことが必要であるが、ただしハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに依存するが塩基間のミスマッチも可能である。核酸をハイブリダイズさせるために適したストリンジェンシーは、核酸の長さおよび相補性の度合い、当分野で周知の変数に左右される。2つのヌクレオチド間の類似性または相同性の度合いが大きければ大きいほど、これらの配列を含む核酸ハイブリッドの T_m 値は高くなる。核酸のハイブリダイゼーションの相対的安定性(T_m の高さに対応する)は以下の順序で低下する: RNA:RNA、DNA:RNA、DNA:DNA。長さが100ヌクレオチド以上のハイブリッドの場合、 T_m を算出する等式が推定された(Sambrook et al. 上掲書9.50-0.51参照)。より短い核酸(すなわちオリゴヌクレオチド)とのハイブリダイゼーションの場合、ミスマッチの位置はより重要となり、オリゴヌクレオチドの長さはその特異性を決定する(Sambrook et al. 上掲書9.50-0.51参照)。好ましくは、ハイブリダイズできる核酸の最小の長さは少なくとも約10ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約15ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約20ヌクレオチドである。

具体的な実施態様では、“標準的なハイブリダイゼーション条件”は T_m 55°Cを指し、上記の条件を利用する。好ましい実施態様では、 T_m は60°Cで、より好ましい実施態様では、 T_m は65°Cである。

【0022】

本明細書で用いられるように、“オリゴヌクレオチド”という用語は、核酸、一般に少なくとも18ヌクレオチドで、ゲノムDNA分子、cDNA分子、またはAkt3をコードするmRNA分子とハイブリダイズすることができるものを指す。オリゴヌクレオチドは、例えば ^{32}P -ヌクレオチドで標識するか、またはビオチンのような標識を共有結合させたヌクレオチドで標識することができる。ある実施態様では、標識オリゴヌクレオチドは、Akt3をコードする核酸の存在を検出するためのプローブとして用いることができる。別の実施態様では、オリゴヌクレオチド(その一方または両方を標識してもよい)は、完全長のAkt3またはAkt3のフラグメントをクローニングするために、またはAkt3をコードする核酸の存在を検出するためにPCRプライマーとして用いることができる。さらに別の実施態様では、本発明のオリゴヌクレオチドは、Akt3 DNA分子と三重らせんを形成することができる。一般に、オリゴヌクレオチドは合成によって、好ましくは核酸合成装置で調製される。したがって、オリゴヌクレオチドは天然に存在しないホスホエステル類似体結合、例えばチオエステル結合などにより調製できる。

【0023】

DNAの“コード配列”は二本鎖DNA配列で、これは、適当な調節配列の制御下に配置されたとき細胞内でin vitroまたはin vivoで転写されポリペプチドに翻訳される。コード配列の境界は5'(アミノ)末端の開始コドンおよび3'(カルボキシ)末端の終止コドンによって決められる。コード配列は、原核細胞配列、真核細胞のmRNAに由来するcDNA、真核細胞(例えば哺乳類)のDNAに由来するゲノムDNA配列および合成DNAさえも含むが、ただしこれらに限定されない。コード配列が真核細胞での発現を目的としている場合は、通常はポリアデニル化シグナルおよび転写終了配列がコード配列の3'側に配置されるであろう。

【0024】

転写および翻訳制御配列は、DNA調節配列、例えばプロモーター、エンハンサー、ターミネーターなどで、宿主細胞でのコード配列の発現をもたらす。

“プロモーター配列”は細胞内のRNAポリメラーゼと結合し下流の(3'方向)コード配列の転写を開始させることができるDNA調節領域である。本発明での定義の場合、前記プロモーターはその3'末端で転写開始部位と接し、上流(5'方向)に伸長し、バックグラウンドを越える検出可能なレベルの転写を開始させるために必要な最低数の塩基またはエレメントを含む。プロモーター配列内に、転写開始部位(簡便にはヌクレアーゼS1によるマッピングによって範囲が定められる)およびRNAポリメラーゼの結合に必要な蛋白質結合ドメイン(コンセンサス配列)が見いだされるであろう。

R N A ポリメラーゼがコード配列を m R N A に転写するとき、コード配列は細胞内で転写および翻訳制御配列の“制御下”にあり、続いてこれはトランス-R N A スプライス処理を受け（コード配列がイントロンを含む場合）、さらにコード配列によってコードされる蛋白質に翻訳される。

【 0 0 2 5 】

本明細書で用いられるように、“相同”という用語は“共通の進化起源”をもつ蛋白質間の関係を指し、これら蛋白質はスーパーファミリー由来の蛋白質（例えば免疫グロブリンスーパーファミリー）および異なる種の同種蛋白質（例えばミオシンの軽鎖など）を含む（Reeck et al. Cell 50:667(1987)）。そのような蛋白質（およびそれらのコード遺伝子）は、その高い配列類似性によって示されるように配列相同性を有する。

10

したがって、“配列類似性”という用語は、共通の進化起源を共有する場合もしない場合も蛋白質における核酸またはアミノ酸配列間の同一性または一致の度合いを指す（Reeck et al. 上掲書参照）。しかしながら、一般的な用法および本出願では、例えば“高度に”というような副詞で修飾される場合は、“相同”という用語は配列類似性を意味し、共通の進化起源を意味しない。

【 0 0 2 6 】

具体的な実施態様では、ヌクレオチドの少なくとも約 5 0 %、好ましくは少なくとも約 7 5 %、もっとも好ましくは少なくとも約 9 0 または 9 5 % が D N A 配列の一定の長さにわたってマッチするとき、2つの D N A 配列は“実質的に相同”または“実質的に類似”である。実質的に相同な配列は、配列データベースで入手可能な標準的ソフトを用いて比較するか、または例えば個々の系で規定されるストリンジェントな条件下でサザンハイブリダイゼーション実験で比較することによって特定できる。適当なハイブリダイゼーション条件を規定することは当業者の範囲内である（例えば以下を参照されたい：Maniatis et al. 上掲書；DNA Cloning, Vols I & II, 上掲書；Nucleic Acid Hybridization, 上掲書）。

20

【 0 0 2 7 】

“アンチセンス核酸”とは、センス配列と相補的なヌクレオチド配列である。アンチセンス核酸は、センス鎖によってコードされるポリペプチドの発現を下方調節または阻止するために用いることができる。

転写および翻訳制御配列は D N A 調節配列、例えばプロモーター、エンハンサー、ターミネーターなどで、宿主細胞でのコード配列の発現をもたらす。

30

“シグナル配列”は、細胞の表面で発現させるために蛋白質のコード配列の開始部に含まれる。この配列は成熟ポリペプチドの N - 末端でシグナルペプチドをコードし、シグナルペプチドは宿主細胞にこのポリペプチドの移動を指令する。“移動シグナル配列”という用語は、この種のシグナル配列を指すために本明細書では使用される。移動シグナル配列は、真核細胞および原核細胞に本来存在する多様な蛋白質に結合して見いだされ、しばしば両タイプの生物で機能を有する。

【 0 0 2 8 】

“調節領域”とは、第二の核酸配列の発現を調節する核酸配列を意味する。調節領域は、個々の核酸の発現に本来必要な配列（同種領域）を含むことができるが、また異なる蛋白質または合成蛋白質でもその発現に必要な異種起源の配列を（異種領域）含むことができる。特に、この配列は真核細胞遺伝子またはウイルス遺伝子の配列でもよいし、また特異的態様もしくは非特異的態様で、または誘発性もしくは非誘発性態様で遺伝子の転写を刺激または抑制する誘導配列でもよい。調節領域には、複製起点、R N A スプライス部位、プロモーター、エンハンサー、転写終了配列、ポリペプチドを標的細胞の分泌経路に誘導するシグナル配列、およびプロモーターが含まれる。

40

【 0 0 2 9 】

“異種起源”の調節領域は、発現される核酸に天然には付随していない調節領域である。異種調節領域には、異なる種の調節領域、異なる遺伝子の調節領域、ハイブリッド調節配列、および天然には存在しないが当業者がデザインできる調節配列が含まれる。

50

“異種”DNAとは、細胞内または細胞の染色体部位に天然には分布していないDNAを指す。好ましくは異種DNAにはその細胞にとって外来性の遺伝子が含まれる。

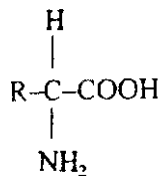
“相同組み換え”とは、外来DNA配列の別のDNA分子への挿入、例えばベクターの染色体挿入を指す。好ましくは、相同組み換えではベクターは特定の染色体部位を標的とする。固有の相同組み換えの場合、相補的な結合およびベクターの染色体への取り込みを可能にするために、ベクターは染色体の配列に対して十分に長い相同領域を含む。相同な領域が長ければ長いほど、さらに配列類似性の度合いが大きければ大きいほど、相同組み換えの効率は増加するであろう。

【0030】

“ポリペプチド”は共有結合によって連結されたアミノ酸残基で構成されたポリマー化合物である。アミノ酸は下記の構造を有する：

【0031】

【化1】



【0032】

アミノ酸は側鎖Rを基準にして7つの群に分類される：(1)鎖式側鎖、(2)ヒドロキシ(OH)を含む側鎖、(3)硫黄原子を含む側鎖、(4)酸性またはアミド基を含む側鎖、(5)塩基性の基を含む側鎖、(6)芳香環を含む側鎖、(7)プロリン、側鎖がアミノ基と融合したイミノ酸。

“蛋白質”は生細胞で構造的および機能的役割を果たすポリペプチドである。

ポリペプチドまたは蛋白質の“変種”は、ポリペプチドまたは蛋白質に由来し、ポリペプチドまたは蛋白質の少なくとも1つの生物学的特性を保持する一切の類似体、フラグメント、誘導体または変異体である。ポリペプチドまたは蛋白質の多様な変種が天然に存在する。これらの変種は蛋白質をコードする構造遺伝子のヌクレオチド配列に相違を有することを特徴とする対立遺伝子座変異体でもよいし、種々のスプライシングによる修飾、または翻訳後修飾を含むものでもよい。当業者は、ただ1つまたは多数のアミノ酸置換、欠失、付加または置き換えをもつ変種を製造できる。これらの変種にはとりわけ以下が含まれる：(a)1つまたは2つ以上のアミノ酸残基が保存的または非保存的アミノ酸で置換されている変種、(b)1つまたは2つ以上のアミノ酸がポリペプチドまたは蛋白質に付加されている変種、(c)1つまたは2つ以上のアミノ酸が置換基を含む変種、および(d)ポリペプチドまたは蛋白質が別のポリペプチド(例えば血清アルブミン)と融合している変種。これら変種を得る技術(遺伝子的(サブレーション、欠失、突然変異誘発など)、化学的および酵素的技術を含む)は当業者にはよく知られている。好ましくは本発明の変種は少なくとも約14アミノ酸を含む。

そのような対立遺伝子座変異体、類似体、フラグメント、誘導体、変異体および改変物(また別のmRNAスプライシング形およびまた別の翻訳後修飾形を含む)が、ポリペプチドの生物学的特性のいずれかを保持するペプチド誘導体を生じる場合、それらは本発明の範囲内に包含される。

【0033】

“異種蛋白質”とは天然には該当細胞内で産生されない蛋白質を指す。

アミノ酸の約40%以上が同一であるか、または60%以上が類似している(機能的に同一)とき、この2つのアミノ酸配列は“実質的に相同”であるか、または“実質的に類似”している。好ましくは、類似または相同配列は、例えばGCG(Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Version 7, Madison, Wisconsin)パイルアップ(pileup)プログラムを用いたアラインメントによって特定できる。

“一致する”という用語は、類似性または相同性が測定される分子とその正確な位置が同

10

20

30

40

50

じであろうと異なっていようと、類似配列または相同配列を指すために本明細書では用いられる。核酸またはアミノ酸配列のアラインメントはスペースを含むことができる。したがって、“一致する”という用語は、配列類似性を意味し、アミノ酸残基またはヌクレオチド塩基の番号には及ばない。

【0034】

A k t 3 タンパク質をコードする遺伝子

本発明は、A k t 3 の全長若しくは天然型、およびそれらのヒト A k t 3 特異的抗原断片のいかなるものをも含む、本発明のヒト A k t 3 タンパク質またはポリペプチドをコードする遺伝子の単離を企図する。本明細書で使用する、「A k t 3」とは A k t 3 ポリペプチドを指し、「a k t 3」とは A K T 3 ポリペプチドをコードする遺伝子を指す。本発明の目的のために、「A k t 3」という用語は、アポトーシスを阻害することが可能であり、かつ配列 Cys - Gln - Gln - Ser - Asp - Cys - Gly - Met - Leu - Gly - Asn - Trp - Lys - Lys、或いは実質的に類似の配列を含むタンパク質またはポリペプチドのいかなるものをも意味する。好ましくは、配列 Cys - Gln - Gln - Ser - Asp - Cys - Gly - Met - Leu - Gly - Asn - Trp - Lys - Lys、或いは実質的に類似の配列は、A k t 3 タンパク質の C 末端に生じる。

【0035】

好ましくは、本発明に係る新規な A k t 3 は配列番号 2 に記載するアミノ酸配列からなる。本発明に係る好適な核酸は、配列番号 2 に記載するアミノ酸配列をコードする。より好ましくは、その核酸は配列番号 1 に記載する配列からなる。

【0036】

本発明の第一の主題は、選択肢として哺乳動物細胞中で発現させる領域の制御下、新規な A k t タンパク質またはポリペプチドをコードする単離された核酸に関する。また、本発明は前記 A k t タンパク質またはポリペプチドをコードする核酸を含むベクターに、およびこれらの核酸類またはベクター類を人間または動物の外科的および/または治療的処置を目的とする薬学的組成物の調製に使用することに関する。本発明は、さらにウイルス性ベクターのようなベクターを含むいかなる薬学的組成物、および上記に定義した核酸に関する。

【0037】

本発明に従うと、当該技術分野の熟練度の範囲内で慣用的な分子生物学、微生物学、および組換え DNA 技術が用いられる。このような手法は、文献で十分に説明されている。例えば、Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (ここで「Sambrookら、1989」とする); DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II (D. N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization [B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1985)]; Transcription And Translation [B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1984)]; Animal Cell Culture [R. I. Freshney, ed. (1986)]; Immobilized Cells AND Enzymes [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); F. M. Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994)を参照。

【0038】

ゲノム DNA であるか c DNA であるかにかかわらず、いかなる供給源、特にヒト c DNA またはゲノムライブラリーから A k t 3 をコードする遺伝子を単離することができる。a k t 3 遺伝子を得る一般的な方法は、上記のように周知である(例えば、上掲「Sambrookら、1989」を参照)。

【0039】

したがって、いかなる動物細胞でも a k t 3 遺伝子の分子クローニング用の核酸供給源として役に立つことができる可能性がある。クローン化された DNA (例えば、DNA ライブラリー) から公知である標準的な手順によって DNA を得ることができる。好ましくは、前記タンパク質発現の高レベルを有する組織 (A k t 3 発現の高いレベルの形跡がある

10

20

30

40

50

細胞であるから、心臓、脾臓および骨格筋 c D N A 等) から作成された c D N A ライブラリーから、または化学合成によって、c D N A クローニングによって、或いは所望の細胞から精製されたゲノム D N A、その断片のクローニングによって得られる。例えば、上掲「Sambrookら、1989」; Glover, D. M. (ed.). 1985, DNA Cloning: A Practical Approach. MRL Press. Ltd., Oxford. U.K. Vol. 1. IIを参照。ゲノム D N A に由来するクローンは、コード領域に加えて、調節およびイントロン D N A 領域を含むかもしれないが、c D N A に由来するクローンは、イントロン配列を含まないことになる。供給源が何であれ、前記遺伝子は、その遺伝子の増殖用に適当なベクターに分子的にクローニングされねばならない。

【 0 0 4 0 】

D N A 断片が生成されると、所望の a k t 3 遺伝子を含む特定の D N A 断片の確認は数々の方式で達成される。例えば、D N A 断片は標識されたプローブへの核酸ハイブリダイゼーションによってスクリーニングできる (Benton and Davis, 1977, Science 196: 180; Grunstein and Hogness, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 3961)。そのプローブに対して実質的な相同性を有するこれらの D N A 断片がハイブリダイズすることになる。上述のように、相同性が高ければ、よりストリンジェントな条件を使用することができる。特定の実施形態において、ノーザンハイブリダイゼーション条件を使用して、a k t 3 遺伝子の m R N A スプライシング変異体を同定する。

【 0 0 4 1 】

遺伝子の性質に基づいてさらなる選択を実施することができるが、これらは例えば、その遺伝子が本明細書に開示された A k t 3 タンパク質の等電的性質、電気泳動的性質、アミノ酸組成、または部分アミノ酸配列を有するタンパク質をコードするかどうか等である。こうして、前記遺伝子の存在は、その発現産物の物理的、化学的、または免疫学的性質に基づくアッセイによって検出できる。例えば、適切な R N A をハイブリッド選択する c D N A クローンまたは D N A クローンは、選択でき、これらは A k t 3 について知られているのと同様なまたは同一の電気泳動的移動度、等電点電気泳動または非平衡 p H ゲル電気泳動的挙動、タンパク質分解酵素マップ、或いは抗原性性質等を有するタンパク質を生産する。特定の実施形態において、発現されたタンパク質は、ポリクローナル抗体によって認識されるが、それはアミノ酸配列 Cys - Gln - Gln - Ser - Asp - Cys - Gly - Met - Leu - Gly - Asn - Trp - Lys - Lys 内にあるようなヒト A k t 3 に特異的なエピトープに対して、作製される。

【 0 0 4 2 】

本発明は、本発明の A k t 3 のアレル変異体、スプライシング変異体、類似体、および誘導体をであって、A k t 3 と同一または相同的機能活性を有するものをコードする遺伝子 (c D N A 等)、並びに他種からのその相同体にも関する。A k t 3 に関連する誘導体および類似体の製造および使用は、本発明の範囲内である。そのような変異体、類似体、誘導体および相同体類は、配列 Cys - Gln - Gln - Ser - Asp - Cys - Gly - Met - Leu - Gly - Asn - Trp - Lys - Lys、または実質的に類似の配列を保持すべきである。特定の実施形態では、その誘導体または類似体は、機能的に活性であり、すなわち本発明の全長、野生型の A k t 3 に関連する一つ以上の機能的活性を示すことができる。

【 0 0 4 3 】

機能的に等価な分子をもたらす置換、付加、または欠失によってコード核酸配列を改変して、A k t 3 誘導体を作ることができる。好ましくは、天然型 A k t 3 と比べて高められた、または増加された機能的活性を有する誘導体が作られる。

【 0 0 4 4 】

核酸コード配列の縮退のために、a k t 3 遺伝子と実質的に同一のアミノ酸配列をコードする他の D N A 配列 (単一アミノ酸変異体を含むアミノ酸配列を含めて) を本発明の実施に際して使用してもよい。これらには、限定はされないが、アレル遺伝子、他種からの相同的遺伝子、およびその配列内の同一のアミノ酸残基をコードする異なるコドンの置換によって改変され、かくしてサイレント変質を生む a k t 3 遺伝子の全てまたは部分を含む

10

20

30

40

50

核酸配列が包含される。同様に、本発明の A k t 3 誘導体には、限定はされないが、一次配列として A k t 3 タンパク質のアミノ酸配列の全てまたは部分（機能的に等価なアミノ酸残基によってその配列内残基が置換され、保存的なアミノ酸置換が結果としてもたらされている改変された配列を含む）を含むものが包含される。例えば、配列内の一つ以上のアミノ酸残基は、類似の極性であり、機能的等価体として作用する別のアミノ酸で置換することができるが、これによりサイレント変質がもたらされる。その配列内のアミノ酸に対する置換体は、該アミノ酸が属するクラスの他のメンバーから選択され得る。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸には、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびメチオニンが含まれる。芳香環構造を有するアミノ酸は、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンである。極性で中性アミノ酸には、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンが含まれる。正に帯電した（塩基性）アミノ酸には、アルギニン、リシン、およびヒスチジンが含まれる。負に帯電した（酸性）アミノ酸には、アスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれる。そのような改変は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動または等電点によって測定される見かけの分子量に影響を及ぼすとは予想されない。

【 0 0 4 5 】

特に好ましい置換は、以下の通りである。

正の電荷が維持されるように、ArgをLysで置換およびその逆；

負の電荷が維持されるように、AspをGluで置換およびその逆；

遊離OHが維持され得るように、ThrをSerで置換；および

遊離CONH₂OHが維持され得るように、AsnをGlnで置換。

【 0 0 4 6 】

アミノ酸置換は、また特に好ましい性質を持つアミノ酸で置換するために導入してもよい。例えば、別のCysとのジスルフィド架橋用の潜在的な部位にCysを導入してもよい。特に「触媒」部位としてHisを導入してもよい。すなわち、Hisは酸若しくは塩基として作用し、生化学的触媒反応において最も知られたアミノ酸である。Proは、その独特な平面構造の理由から導入されてもよく、タンパク質構造のターンを誘発する。

【 0 0 4 7 】

本発明の A k t 3 誘導体および類似体をコードする遺伝子は、公知である様々な方法によって作製することができる。その作製をもたらす操作は、遺伝子またはタンパク質段階で起こりうる。例えば、クローン化 A k t 3 遺伝子配列を公知である無数の戦略によって、修飾できる（上掲Sambrookら、1989）。その配列を制限エンドヌクレアーゼ、続いて所望ならさらに酵素的改変によって適当な部位で開裂し、単離そして連結（インビトロ）できる。A k t 3 の誘導体または類似体をコードする遺伝子を作製するにあたって、修飾された遺伝子が、所望の活性がコードされている領域中で翻訳終止シグナルに邪魔されずに A k t 3 遺伝子と同一の翻訳リーディングフレーム内にあるのが保証されるように注意が払われるべきである。

【 0 0 4 8 】

さらに、A k t 3 コード核酸配列をインビトロまたはインビボで変異させて、翻訳、開始および/または終止配列を創製および/または破壊するか、或いはコード領域中に変異を創製し、そして/または新たな制限エンドヌクレアーゼ部位を形成するかまたは既に存在する部位を破壊して、さらなるインビトロ修飾を容易にすることができる。好ましくは、そのような変異が変異された A k t 3 遺伝子産物の機能的活性を増強する。公知であるいかなる突然変異の手法をも使用することができ、それらは限定されないが、次のものを含む。すなわち、インビトロ部位特異的突然変異（Hutchinson, C., et al., 1978, J. Biol. Chem. 253: 6551; Zoller and Smith, 1984, DNA 3: 479-488; Oliphant et al., 1986, Gene 44: 177; Hutchinson, et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 710）、T A B（登録商標）リンカー（Pharmacia）の使用等である。部位特異的突然変異には、P C R手法が好ましい（Higuchi, 1989, "Using PCR to Engineer DNA", in PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H. Erlich, ed., Stoc

kton Press, Chapter 6, pp. 61-70を参照)。

【0049】

確認され、単離された遺伝子を適当なクローニングベクターにそれから挿入できる。当該技術分野で公知である多数のベクター/宿主系を用いることができる。限定はされないが、可能なベクター類には、プラスミドまたは改変されたウイルスが含まれる。しかし、ベクター系は用いる宿主細胞に適合しなくてはならない。ベクターの実例としては、大腸菌、ラムダ誘導体等のバクテリオファージ、またはpBR322誘導体またはpUCプラスミド誘導体(例えば、pGEXベクター、pmal-c、pFLAG)等プラスミドが挙げられるが、これらには限定されない。前記クローニングベクターへの挿入は、例えばDNA断片を相補的な付着末端を有するクローニングベクターに連結することによって達成することができる。しかしながら、そのDNAを断片化するのに使用する相補的な制限酵素部位がクローニングベクター中に存在しない場合、DNA分子の末端を酵素的に修飾してもよい。別法として、望ましいいかなる部位でもDNA末端に核酸配列(リンカー)を連結することによって生成され得る。これらの連結されたリンカーは、制限エンドヌクレアーゼ認識配列をコードする化学合成された特定のオリゴヌクレオチドを含む。組換え分子を形質転換、トランスフェクション、感染、電気穿孔等で宿主細胞に導入でき、前記遺伝子配列の多くのコピーが生成される。好ましくは、クローン化遺伝子がシャトルベクタープラスミド上に含まれ、それは大腸菌等のクローン化細胞中での拡張さらに、もしこれが望ましいならば、適当な発現細胞株への続く挿入のための容易な精製をもたらす。例えば、大腸菌プラスミドからの配列を酵母2μプラスミドからの配列に結合することによって、大腸菌および酵母菌(サッカロミセスセレビシエ)の両方での複製用に、一種以上の生物中で複製できるベクターであるシャトルベクターを作製することができる。

【0050】

Akt3ポリペプチドの発現

Akt3、その抗原性断片、誘導体、類似体または機能的活性な誘導体(そのキメラタンパク質を含む)をコードする核酸配列を適当な発現ベクターに挿入することができるが、これはすなわち挿入されたタンパク質コード配列の転写および翻訳に必要な要素を含むベクターである。このような要素を本明細書では、「プロモーター」と定義する。かくして、本発明の核酸は本発明の発現ベクター中でプロモーターに作動的に関連付けられている。cDNAおよびゲノム配列の両方ともそのような調節配列の制御下、クローニングおよび発現され得る。また、好ましくは、発現ベクターが複製開始点を含む。

【0051】

必要な転写および翻訳シグナルは、組換え発現ベクター上に提供され得る。或いは、Akt3および/またはその側面領域をコードする天然型遺伝子によって供給されてもよい。

【0052】

可能な宿主・ベクター系としては、ウイルス(ワクシニア・ウイルス、アデノウイルス等)に感染した哺乳動物細胞系、ウイルス(バキュロウイルス等)に感染した昆虫細胞系、酵母ベクターを含む酵母のような微生物、またはバクテリオファージ、DNA、プラスミドDNA、若しくはコスミドDNAで形質転換されたバクテリアが挙げられるが、これらには限定されない。ベクターの発現要素は、その能力および特異性が変わり得る。利用する宿主/ベクター系に依存して、多数の適当な転写および翻訳要素のいずれか1つを使用することができる。

【0053】

組換えによってコード配列を一体化した後、本発明の組換えAkt3タンパク質、その機能的な断片、誘導体、キメラ構築体、または類似体は、染色体中に発現される。これに関して、いくつかの増幅系の1つを用いて、安定な遺伝子発現の高レベルを達成できる(上掲、Sambrookら、1989を参照)。

【0054】

Akt3をコードする核酸を含む前記組換えベクターが導入された細胞を適当な細胞増殖培地中、その細胞によるAkt3の発現がもたらされる条件下で培養する。DNA断片の

クローニングベクターへの挿入について、以前に報告された方法の1つを使用して、適当な転写/翻訳制御シグナルおよびタンパク質コード配列からなる遺伝子を含む発現ベクターを構築する。これらの方法には、インビトロ組換えDNAおよび合成手法、並びにインビトロ組換え(遺伝子組換え)が含まれる。

【0055】

Akt3ポリペプチドをコードする核酸は、作動的に結合されて、いかなる調節領域(すなわち、公知であるプロモーター/エンハンサー要素)によって制御されてもよいが、これらの調節要素は発現について選択された宿主標的腫瘍において、機能的でなければならない。調節領域は、宿主細胞での機能的な転写のためのプロモーターと、同様に目的遺伝子の3'に位置する領域であり、転写の終止シグナルおよびポリアデニル化部位を規定するものを含む。これら全ての要素が1つの発現ベクターを構成する。

10

【0056】

本発明において使用できるプロモーターは、構成的プロモーターと調節される(誘導可能な)プロモーターの両方を包含する。そのプロモーターは、当然前記核酸の発現に關与する。それは異種供給源からでもよい。特に、それは真核生物遺伝子またはウイルス遺伝子のプロモーター配列でもよい。例えば、それは感染することが望ましい細胞のゲノムに由来するプロモーター配列であってもよい。同様に、ウイルス(例えばEIAおよびMLPのようなアデノウイルス、サイトメガウイルス、またはラウス肉腫ウイルス等)のゲノムに由来するプロモーター配列であってもよい。さらに、活性化若しくは調節配列、或いは組織特異的または優勢発現を可能にする配列(エノラーゼおよびGFAPプロモーター等)を付加することによって、プロモーターを修飾してもよい。加えて、核酸がプロモーター配列を含まないときは、それを挿入できる。

20

【0057】

本発明の実施に有用ないくつかのプロモーター類は、偏在するプロモーター(HPRT、ビメンチン、アクチン、チューブリン等)、中間径フィラメントプロモーター(デスミン、ニューロフィラメント、ケラチン、GFAP等)、治療遺伝子プロモーター(MDRタイプ、CFTR、第VIII因子等)、組織特異的プロモーター(平滑筋細胞のアクチンプロモーター等)、分裂細胞で優先的に活性化されるプロモーター、刺激に応答するプロモーター(ステロイドホルモン受容体、レチノイン酸受容体等)プロモーター、テトラサイクリン調節転写モジュレーター、サイトメガロウイルス(CMV)、前初期レトロウイルス性LTR、メタロチオネイン、SV-40、アデノウイルスE1a、およびアデノウイルス主後期(MLP)プロモーターである。テトラサイクリン調節転写モジュレーターおよびCMVプロモーターは、WO96/01313、US5,168,062および5,385,839に記載されており、それらの内容は本明細書に参考文献として援用される。

30

【0058】

さらに詳しくは、Akt3タンパク質の発現が、当該技術分野で公知のいかなるプロモーター/エンハンサー要素によっても制御され得るが、これらの制御要素は発現用に選択された宿主中で機能的でなければならない。遺伝子発現を制御するのに使用されるプロモーター類としては、限定はされないが以下のものが挙げられる。すなわち、SV40初期プロモーター領域(Benoist and Chambon, 1981, Nature 290: 304-310)、ラウス肉腫ウイルスの3'LTRに含まれるプロモーター(Yamamoto, et al., 1980, cell 22: 787-797)、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター(Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 1441-1445)、メタロチオネイン遺伝子の調節配列(Brinster et al., Nature 296: 39-42)、 γ -ラクタマーゼプロモーターのような原核生物発現ベクター(Villa-Kamaroff, et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 3727-3731)、またはtacプロモーター(DeBoer, et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 21-25、また"Useful protein from recombinant bacteria" in Scientific American, 1980, 242: 74-94を参照)、Gal4プロモーターのような酵母または他の真菌類からのプロモーター要素、ADC(アルコールデヒドロゲナーゼ)プロモーター、PGK(ホスホグリセロールキナーゼ)プロモーター、アルカリホスファターゼプロモーター、組織特異

40

50

性を示し、トランスジェニック動物に利用されてきた動物転写調節領域、膵臓細胞中で活性なエラスターゼI遺伝子調節領域 (Swift et al., 1984, Cell 38: 639-646; Ornit z et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50: 399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7: 425-515)、膵臓細胞中で活性なインスリン遺伝子制御領域 (Hanahan, 1985, Nature 315: 115-122)、リンパ細胞中で活性な免疫グロブリン遺伝子調節領域 (Crosschedl et al., 1984, Cell 38: 647-658; Adames et al., 1985, Nature 318: 533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 1436-1444)、睾丸、乳房、リンパおよびマスト細胞中で活性なマウス乳房腫瘍ウイルス調節領域 (Leder et al., 1986, Cell 45: 485-495)、肝臓で活性なアルブミン遺伝子調節領域 (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1: 268-276)、肝臓で活性なフェトプロテイン遺伝子調節領域 (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5: 1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 235: 53-58)、肝臓で活性な1-抗トリプシン遺伝子調節領域 (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1: 161-171)、骨髄性細胞中で活性なグロビン遺伝子調節領域 (Morgam et al., 1985, Nature 315: 338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46: 89-94)、脳のオリゴデンドロサイト中で活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子調節領域 (Readhead et al., 1987, Cell 48: 703-712)、骨格筋で活性なミオシン軽鎖2-遺伝子調節領域 (Sani, 1985, Nature 314: 283-286)、および視床下部で活性な性腺刺激ホルモン放出遺伝子調節領域 (Mason et al., 1986, Science 234: 1372-1378)である。

【0059】

Akt3をコードする核酸を含有する本発明の発現ベクターは、次の5つの一般的なアプローチによって確認することができる。(a)所望のプラスミドDNAまたは特定のmRNAのPCR増幅、(b)核酸ハイブリダイゼーション、(c)選択マーカー遺伝子機能の存在または不存在、(d)適当な制限エンドヌクレアーゼを用いる解析、および(e)挿入配列の発現である。第1のアプローチでは、PCRによって核酸を増幅し、増幅産物の検出をもたらすことができる。第2のアプローチでは、発現ベクターに挿入された外来遺伝子の存在を、挿入マーカー遺伝子に相長的である配列を含むプローブを用いるハイブリダイゼーションによって検出できる。第3のアプローチでは、ベクター中への外来遺伝子の挿入によって引き起こされる、ある種の「選択マーカー」遺伝子機能(例えば、ガラクトシダーゼ活性、チミジンキナーゼ活性、抗生物質への耐性、形質転換表現型、バキュロウイルスにおける吸蔵体の形成等)の存在または不存在に基づいて組換えベクター/宿主系を確認および選択できる。別の例では、ベクターの前記「選択マーカー」遺伝子配列内にAkt3をコードする核酸が挿入された場合、Akt3挿入体を含有する組換え体をその遺伝子機能の不存在によって確認することができる。第4のアプローチでは、組換え発現ベクターを適当な制限酵素での消化によって確認する。第5のアプローチでは、発現されたタンパク質が機能的に活性なコンフォメーションを取るとすれば、その組換え体によって発現される遺伝子産物の活性、生化学的または免疫学的な特徴についてアッセイすることにより組換え発現ベクターを確認することができる。

【0060】

本発明のDNA配列を発現させるのに、様々な宿主/発現ベクター系が用いられる。例えば、有用な発現ベクターは、染色体DNA配列、非染色体DNA配列および合成DNA配列のセグメントからなる。適当なベクター類としては、SV40および既知のバクテリアプラスミドの誘導体(大腸菌プラスミドcolE1、pCR1、pBR322、pMal-C2、pET、pGEX(Smith et al., 1988, gene 67: 31-40)、pMB9およびそれらの誘導体、RP4等のプラスミド等)、ファージDNA(例えばNM989のようなファージ1の多数の誘導体、およびM13、糸状菌一本鎖ファージDNAのような他のファージDNA)、酵母プラスミド(2μプラスミドまたはその誘導体等)、真核生物細胞で有用なベクター(昆虫または哺乳動物細胞で有用なベクター等)、プラスミドおよびファージDNAの組み合わせに由来するベクター(ファージDNAまたは他の発現調節配列を使用するように修飾されたプラスミド等)、およびその他が挙げられる。

【0061】

例えば、バキュロウイルス発現系においては、以下のものを用いることができる。限定はされないが、p V L 9 4 1 (BamHIクローニング部位;Summers)、p V L 1 3 9 3 (BamHI、SmaI、XbaI、EcoRI、NotI、XmaIII、BglIII、およびPstIクローニング部位;Invitrogen)、p V L 1 3 9 2 (BglIII、PstI、NotI、XmaIII、EcoRI、XbaI、SmaI、およびB a m H Iクローニング部位; SummersおよびInvitrogen)、およびp B l u e B a c I I I (BamHI、BglIII、PstI、NcoI、およびHindIIIクローニング部位、青ノ白の組換え体のスクリーニングが可能である; Invitrogen)のような非融合型の導入ベクター類、ならびに限定はされないが、p A c 7 0 0 (BamHIおよびKpnIクローニング部位であり、そのB a m H I認識部位が開始コドンより始まるもの;Summers)、p A c 7 0 1およびp A c 7 0 2 (pAc700と同一であるが、異なるリーディングフレームを有する)、p A c 3 6 0 (ポリヘドリン開始コドンの36bp下流のBamHIクローニング部位;Invitrogen(195))、およびp B l u e B a c H i s A、B、C (BamHI、BglIII、PstI、NcoI、およびHindIIIクローニング部位、P r o B o n d精製用N末端ペプチドを有する3個の異なるリーディングフレームとプラークの青ノ白組換え体のスクリーニングが可能である;Invitrogen(220))のような融合型の導入ベクター類である。

【 0 0 6 2 】

本発明に使用することが企図される哺乳動物発現ベクター類には、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(D H F R)プロモーターのような誘発可能なプロモーターを有するベクターが含まれ、これは例えばD H F R発現ベクター有するいかなるベクター、またはp E D等のD H F Rノメトトレキセート共増幅ベクター(PstI、SalI、SbaI、SmaI、およびEcoRIクローニング部位を持ち、その発現ベクターはクローン化遺伝子とD H F Rの両者を発現する;Kauffman, Current Protocol in Molecular Biology, 16, 12 (1991)を参照)である。代わりに、p E E 1 4のようなグルタミンシンターゼノメチオニンスルホキシミン共増幅ベクター(HindIII、XbaI、SmaI、SbaI、EcoRI、およびB c I Iクローニング部位、そのベクターはグルタミンシンターゼとクローン化遺伝子を発現する;Clontech)がある。別の実施形態において、エプスタイン・バーウイルス(EBR)の制御下エピソーム発現を指向するベクターを用いることができるが、これは例えば、p R E P 4 (BamHI、SfiI、XhoI、NotI、NheI、HindIII、NheI、PvuII、およびK p n Iクローニング部位、構成的ラウス肉腫ウイルスL T R(RSV-LTR)プロモーター、ハイグロマイシン選択マーカー;Invitrogen)、p C E P 4 (BamHI、SfiI、XhoI、NotI、NheI、HindIII、NheI、PvuII、およびKpnlクローニング部位、構成的ヒトサイトメガウイルス(hCMV)前初期遺伝子、ハイグロマイシン選択マーカー;Invitrogen)、p M E P 4 (KpnI、PvuI、NheI、HindIII、NotI、XhoI、SfiI、BamHIクローニング部位、誘発可能なメタロチオネインIIa遺伝子プロモーター、ハイグロマイシン選択マーカー;Invitrogen)、p R E P 8 (BamHI、XhoI、NotI、HindIII、NheI、およびKpnIクローニング部位、RSV-LTRプロモーター、ヒスチジノール選択マーカー;Invitrogen)、p R E P 9 (KpnI、NheI、HindIII、NotI、XhoI、SfiI、およびBamHIクローニング部位、RSV-LTRプロモーター、G418選択マーカー;Invitrogen)、およびp E B V H i s (RSV-LTRプロモーター、ハイグロマイシン選択マーカー、P r o B o n dレジンを通じて精製可能であり、かつエンテロキナーゼで開裂されるN末端ペプチド;Invitrogen)である。本発明に使用するのに選択可能な哺乳動物発現ベクター類には、p R c / C M V (HindIII、BstXI、NotI、SbaI、およびApaIクローニング部位、G148選択マーカー;Invitrogen)、p R c / R S V (HindIII、SpeII、BstXI、NotI、XbaIクローニング部位、G148選択マーカー;Invitrogen)、およびその他が含まれる。本発明に従って、使用するワクシニアウイルス哺乳動物発現ベクター類(上掲Kaufman, 1991を参照)には、限定はされないがpSCII (SmaIクローニング部位、TKおよび-gal選択)、p M J 6 0 1 (SalI、SmaI、AflI、NarI、BspMII、BamHI、ApaI、NheI、SacII、KpnI、およびHindIIIクローニング部位、TKおよび-gal選択)、およびp T K g p t F 1 S (EcoRI、PstI、SalI、AccI、HindII、SbaI、BamHI、およびHpaクローニング部位、TKおよびまたはXPRT選択)が含まれる。

【 0 0 6 3 】

10

20

30

40

50

本発明に従えば、A k t 3を発現させるのに酵母発現系もまた使用できる。例えば、2つ挙げると、非融合型 p Y E 2 ベクター (XbaI、SphI、ShoI、NotI、GstXI、EcoRI、BstXI、BamHI、SacI、KpnI、およびHindIIIクロニング部位; Invitrogen) または融合型 p Y E S H i s A、B、C (XbaI、SphI、ShoI、NotI、BstXI、EcoRI、BamHI、SacI、KpnI、およびHindIIIクロニング部位、ProBondレジンで精製され、かつエンテロキナーゼで開裂されるN末端ペプチド; Invitrogen) であるが、これらは本発明に従って用いることができる。

【0064】

特定の組換えDNA分子が確認され、単離されると、公知であるいくつかの方法を用いて、増殖する。適当な宿主系と増殖条件が確立されると、組換え発現ベクターを増殖し、そして大量に調製することができる。前記で解説した通り、使用できる発現ベクターには、以下のベクター類またはそれらの誘導体が含まれるが、これらには限定されない。いくつかのみを挙げれば、ヒトまたは動物ウイルス(ワシニアウイルスまたはアデノウイルス等)、昆虫ウイルス(バキュロウイルス等)、酵母ベクター、バクテリオファージベクター(ラムダ等)、およびプラスミドとコスミドDNAベクターである。

【0065】

さらに、挿入配列の発現を調節するか、または所望の特定の様式に遺伝子産物を修飾し、プロセスする宿主細胞株が選択される。異なる宿主細胞は、タンパク質の翻訳と翻訳後プロセスおよび修飾について特徴、特異的な機序を備える。発現される外来タンパク質の望ましい修飾とプロセスを確実にする適切な細胞株または宿主系を選択することができる。酵母中での発現によって、生物学的に活性な産物を生産することができる。真核生物細胞中での発現によって、ネイティブなフォールディングの可能性を増加することができる。さらに、哺乳動物細胞中での発現によって、A k t 3 活性を再構成するか、または構成するツールを提供できる。またさらに、異なるベクター/宿主発現系は、プロセス反応、例えば蛋白分解に異なる程度、影響を及ぼす。

【0066】

ベクターは、公知である方法によって所望の宿主細胞に導入されるが、これらは例えば、トランスフェクション、電気穿孔、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合、D E A E デキストラン、リン酸カルシウム沈降法、リポフェクション(リソソーム融合)、遺伝子銃またはDNAベクター輸送体の使用(例えば、Wu et al., 1992, J. Biol. Chem. 267: 963-967; Wu and Wu, 1988, J. Biol. Chem. 263: 14621-14624; Hartmutら、カナダ特許出願2,012,311号、1990年3月15日出願を参照)である。

【0067】

上述のように培養流体を回収するか、または封入体を可溶化(例えば、界面活性剤と処理)し、さらに所望ならば超音波処理、若しくは他の機械的な処理によって、可溶型タンパク質を得ることができる。可溶化された、すなわち可溶タンパク質は様々な手法によって単離することができるが、これらは例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)、等電点電気泳動法、二次元ゲル電気泳動、クロマトグラフィー(イオン交換、アフィニティー、免疫アフィニティー、サイズカラムクロマトグラフィー等)、遠心分離、示差溶解、免疫沈降法、またはタンパク質の精製用の他のいかなる標準的な手法によってである。

【0068】

A k t 3 に対する抗体

本発明によれば、融合タンパク質を含む、組換えまたは化学合成により製造されるA k t 3 ポリペプチドおよびその断片、他の誘導体またはアナログは、抗原または免疫原として抗体産生に用いることができる。好ましくは、抗体はヒトA k t 3 に特異的に結合するが、他の型のA k t には結合しないものである。より好ましくは、抗体は配列: Cys-Gln-Gln-Ser-Asp-Cys-Gly-Met-Leu-Gly-Asn-Trp-Lys-Lys またはこれと実質的に類似の配列を有するポリペプチド内のエピトープを認識するものである。

【0069】

イムノグロブリン(抗体)またはT細胞抗原受容体などの免疫系の抗原認識分子と特異的

10

20

30

40

50

に相互作用しうる場合に、分子は「抗原性」である。抗原性ポリペプチドは少なくとも5アミノ酸、好ましくは少なくとも10アミノ酸を含む。分子の抗原性部分は、抗体もしくはT細胞受容体認識に対して免疫優性である部分とすることができるか、または抗原性部分を免疫のためのキャリア分子とコンジュゲートすることにより、分子に対する抗体を産生させるために用いられる部分とすることができる。抗原性分子は、それ自体免疫原性、即ちキャリアなしに免疫応答を誘導しうるものである必要はない。

【0070】

そのような抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、F a b断片およびF a b発現ライブラリーを包含するが、これらに限定されない。本発明の抗A k t 3抗体は、交叉反応性であってもよく、例えば異なる種由来のA k t 3を認識しうる。ポリクローナル抗体は交叉反応性である可能性が大きい。また、本発明の抗体はA k t 3の単一型、例えばヒトA k t 3に対して特異的であり得る。そのような抗体はヒトA k t 3に対して特異的であるのが好ましい。

10

【0071】

当該技術分野において公知の種々の方法がポリクローナル抗体の製造に使用することができる。抗体の製造には、A k t 3ポリペプチドまたはその誘導体を注射することにより種々の宿主動物を免疫することができ、当該動物にはウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ等が包含されるが、これらに限定されない。一態様において、A k t 3ポリペプチドまたはその断片は、免疫原性キャリア、例えばウシ血清アルブミン(B S A)またはキーホールリンペットヘモシニアン(K L H)とコンジュゲートさせることができる。宿主の種により種々のアジュバンドを用いて免疫学的応答を増強させることができ、アジュバンドには(完全および不完全)フロイトアジュバンド、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、リソレクチン、プルロニックポリオール、ポリアミン、ペプチド、油性エマルジョン、キーホールリンペットヘモシニアン、ジニトロフェノールなどの界面活性剤、並びに潜在的にB C G (bacille Calmette-Guerin) およびCorynebacterium parvumなどの有用なヒトアジュバンドが包含されるが、これらに限定されない。

20

【0072】

A k t 3ポリペプチド、またはその断片、アナログもしくは誘導体に対するモノクローナル抗体の調製には、培養における連続細胞系により抗体分子を産生する任意の技術を用いることができる。これらは、元々KohlerとMilsteinにより開発されたハイブリドーマ技術[Nature 256:495-497 (1975)]、同様にトリオマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術[Kozbor等, Immunology Today 4:72 1983]; Cote等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:2026-2030 (1983)]、ヒトモノクローナル抗体を製造するためのE B V - ハイブリドーマ技術[Cole等., in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss. Inc., pp. 77-96 (1985)]が包含されるが、これらに限定されない。本発明の別の態様において、モノクローナル抗体は、無菌動物において製造することができる[国際特許公開WO 89/12690, 1989年12月28日公開]。実際、本発明によれば、A k t 3ポリペプチドに特異的なマウス抗体分子由来の遺伝子を適当な生物活性のあるヒト抗体分子由来の遺伝子と共にスプライシングすることにより、キメラ抗体を製造するために開発された技術[Morris on等, J. Bacterial. 159:870 (1984); Neuberger等, Nature 312:604-608 (1984); Take da等, Nature 314:452-454 (1985)]を用いることができるが、そのような抗体は本発明の範囲内である。それ自体が免疫応答、特にアレルギー反応を誘導する異種抗体よりヒト抗体またはヒト型化抗体が非常に好ましいため、そのようなヒト抗体またはヒト型化キメラ抗体はヒトの疾患または疾病(後述する)の治療において用いるのが好ましい。

30

40

【0073】

本発明によれば、一本鎖F v (s c F v)抗体の製造のために記載される技術[Huston に対する米国特許第5,476,786号 および第5,132,405号; 米国特許第4,946,778号]を適用して、A k t 3ポリペプチド特異的な一本鎖抗体を製造することができる。本発明の別の態様は、A k t 3ポリペプチドまたはその誘導体もしくはアナログに対して所望の特異性を有するモノクローナルF a b断片を迅速且つ簡単に特定しうる、F a b発現ライブラリ

50

ー [Huse 等, Science 246:1275-1281 (1989)] の構築のために記載される技術を利用する。

【0074】

抗体分子のイデオタイプを含む抗体断片は、公知の技術により産生させることができる。例えば、そのような断片は、抗体分子のペプシン消化により製造しうる $F(a b')_2$ 断片； $F(a b')_2$ 断片のジスルフィド架橋を還元することにより製造しうる $F a b'$ 断片、および抗体をパインと還元剤で処理することにより製造しうる $F a b$ 断片が含まれるが、これらに限定されない。

【0075】

抗体に製造において、所望の抗体のスクリーニングは、当該技術分野において知られた技術、例えばラジオイムノアッセイ、E L I S A (酵素結合免疫吸着アッセイ)、サンドイッチイムノアッセイ、免疫放射定量測定法、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、in situイムノアッセイ (例えば金コロイド、酵素または放射線標識を使用)、ウェスタンブロット、沈降反応、凝集反応 (例えばゲル凝集アッセイ、血液凝集アッセイ)、完全固定アッセイ、免疫蛍光アッセイ、プロテイン A アッセイおよび免疫電気泳動アッセイなどにより実施することができる。ある態様において、抗体結合は、一次抗体上の標識を検出することにより検出する。別の態様において、一次抗体は、二次抗体または試薬の一次抗体への結合を検出することにより検出する。他の態様において、二次抗体は標識される。イムノアッセイにおいて結合を検出する多くの手段が当該技術分野において知られており、これらは本発明の範囲内である。例えば、A k t 3 ポリペプチドの特異的エピトープを認識する抗体を選択するには、1つはそのようなエピトープを含む A k t 3 ポリペプチド断片に結合する生成物に対する生成したハイブリドーマをアッセイする。好ましい断片は、配列：Cys-Gln-Gln-Ser-Asp-Cys-Gly-Met-Leu-Gly-Asn-Trp-Lys-Lysを含む。特定の種の動物由来の A k t 3 ポリペプチドに対して特異的な抗体を選択するには、その種の動物の細胞により発現したまたはそれから単離した A k t 3 ポリペプチドとの陽性結合に基づいて選択することができる。

【0076】

前述の抗体は、例えばウェスタンブロット、A k t 3 ポリペプチドイメージング、適当な生理的試料におけるその標識の in situ測定など、上述したまたは当該技術分野において知られた検出技術の任意のものを使用する、A k t 3 ポリペプチドの局在および活性に関して知られている方法において用いることができる。

【0077】

特定の態様において、A k t 3 ポリペプチドの活性を作動させるまたは拮抗する抗体を産生させることができる。そのような抗体は、リガンドを特定する後述のアッセイを用いて試験することができる。特に、そのような抗体は細胞内で発現する s c F v 抗体でありうる。

【0078】

遺伝子治療およびトランスジェニックベクター

アポトーシスおよび壊死による心筋細胞の死は、急性心筋梗塞および心不全の原因となる。ヒト A k t 3 は、A S K 1 誘導アポトーシスおよび低酸素症誘導アポトーシス並びに細胞死を阻害する。故に、本発明は、ヒト A k t 3 タンパク質をコードする核酸を患者に投与する遺伝子治療を含む。急性心筋梗塞の場合、A k t 3 を用いる遺伝子治療は、細胞死の量および最終的な梗塞の大きさを減少させると期待され、これにより梗塞後の機能が改善し、生活の質が向上し、死亡率が減少する。また、梗塞の大きさの減少は、梗塞後に心不全に進行する患者の数を減少させると期待される。心機能不全を有する患者において、A k t 3 を用いた遺伝子治療により筋細胞の損失の低減は、心室膨張の進行を遅延させ、疾病の進行を遅くし、生活の質を向上させ、入院の必要性を減少させると期待される。

【0079】

急性心筋梗塞において、虚血 - 再灌流障害の進行は細胞死を招く。A k t 3 は細胞死を阻害する。故に、A k t 3 遺伝子治療は、虚血 - 再灌流障害を伴う、例えば心筋虚血再灌流

10

20

30

40

50

障害、発作、肝障害、腎不全、器官移植（特に心臓移植）および冠動脈バイパス移植を含む他の疾病状態の治療に有効であると期待されるが、これらには限定されない。また、A k t 3 遺伝子治療は、アルツハイマー病、肝変性および変形性関節症を含むがこれらには限定されない、アポトーシスを介した細胞死を伴う他の疾病状態の治療に有効であると期待される。

【 0 0 8 0 】

ベクターに適切に組み込まれた本発明の核酸、およびこれを含有する医薬組成物は、多くの病状の治療に用いることができる。これらは、任意のタイプの組織、特に心臓においてインビボにて遺伝子の運搬および発現に用いることができる。さらに、治療すべき病状に基づいて治療を目的とすることができる（特定の組織への運搬は、特にベクターの選択により決定することができ、発現は特定のプロモーターの選択により決定される）。本発明の核酸またはベクターは、低酸素症誘導細胞死、アポトーシス、心筋梗塞、壊死、細胞増殖、代謝産物の合成、タンパク質合成、DNA複製および/または転写などから保護するなどの種々の細胞機能に特異的に作用しうるタンパク質のヒトまたは動物におけるインビボおよび細胞内産生のために有利に使用される。故に、本発明は、ある原因によるまたは異なる病状から生じる、特にアポトーシスを伴う細胞機能障害を特異的、局所的および有効に治療することを可能にする。

【 0 0 8 1 】

上述のように、ベクターは本発明の核酸を宿主細胞中に運搬するための任意の手段である。好ましいベクターは、レトロウィルス、ヘルペスウィルス、アデノウィルスおよびアデノ随伴ウィルスなどのウィルスベクターが好ましい。故に、A k t 3 タンパク質またはそのポリペプチドドメイン断片をコードする遺伝子は、ウィルスベクターを用いてまたはDNAの直接導入により細胞内または細胞外に導入される。標的組織における発現は、受容体またはリガンドを用いて特定の細胞をトランスジェニックベクターの標的にすることより、組織特異的プロモーターを用いて、またはこれら両方により実施することができる。

【 0 0 8 2 】

本発明の発現ベクターは、既に指摘したように、A k t 3 活性のモジュレーターのスクリーニングまたは生物学的試験のための細胞をトランスフェクトするため、または細胞外遺伝子治療のため、例えばA k t 3 活性のレベルを増強または減少させるため、インビボまたは細胞内にA k t 3 遺伝子もしくはA k t 3 アンチセンス遺伝子をデリバリーするために用いることができる。抗A k t 3 s c F vを発現するベクターは、後に述べる技術を用いて導入することができる。

【 0 0 8 3 】

インビボまたは細胞外標的化および治療手段において慣用されるウィルスベクターは、DNAに基づくベクターおよびレトロウィルスベクターである。ウィルスベクターを構築するおよび使用する方法は、当該技術分野において知られている[例えば、Miller とRosman, BioTechniques 7:980-990 (1992)を参照]。ウィルスベクターは、標的細胞中にて自立的に複製し得ない複製欠損であるのが好ましい。一般的に、本発明の範囲内で使用される複製欠損ウィルスベクターのゲノムは、標的細胞中においてウィルスの複製に必要な少なくとも1つの領域を欠失している。これらの領域は、当業者に知られた任意の技術により、（全体または一部において）削除するかまたは非機能的にすることができる。これらの技術は、全体的除去、置換（他の配列によって、特に挿入された核酸によって）、部分的欠失または（複製に）必須な領域への1つ以上の塩基の挿入が包含される。そのような技術は、遺伝子操作技術を用いてまたは突然変異誘発剤で処理することにより、インビボ（単離されたDNAにおいて）または原位置[in situ]にて実施することができる。複製欠損ウィルスは、ウィルス粒子の封入に必要なゲノム配列を保持しているのが好ましい。

【 0 0 8 4 】

DNAウィルスベクターは、例えば単純ヘルペス(HSV)、パピローマウィルス、エプスタインバーウィルス(EBV)、アデノウィルス、アデノ随伴ウィルス(AAV)、

10

20

30

40

50

ワクシニアウイルスなどの弱毒化または欠損DNAウイルスを包含するが、これらに限定されない。

【0085】

完全にまたはほとんど全てのウイルス遺伝子を欠失した欠損ウイルスが好ましい。欠損ウイルスは、細胞中に導入した後に複製能が無くなり、故に増殖ウイルス感染を引き起こさない。欠損ウイルスベクターの使用は、ベクターが他の細胞に感染しうることなく、特定の、局所の細胞への投与を可能にする。故に、特定の組織を特異的な標的とすることができ。特別なベクターの例には、欠損ヘルペスウイルス1 (HSV1) ベクター [Kaplit等, Molec. Cell. Neurosci. 2:320-330 (1991)]、グリコプロテインL遺伝子を欠損する欠損ヘルペスウイルス [特許公開RD 371005 A] または他の欠損ヘルペスウイルス [1994年9月29日公開の国際特許公開WO 94/21807; 1994年4月2日公開の国際特許公開WO 92/05263]、弱毒化アデノウイルスベクター、例えばStratford-Perricaudet等 [J. clin. Invest. 90:626-630 (1992); さらにLa Salle等, Science 259: 988-990 (1993) を参照] に記載のベクター、および欠損アデノ随伴ウイルスベクター [Samulski等, J. Virol. 61:3096-3101 (1987); Samulski等, J. Virol. 63:3822-3828 (1989); Lebowski等, Mol. Cell. Biol. 8:3988-3996 (1988)] が包含されるが、これらに限定されない。

10

【0086】

インビボ投与には、適当な免疫抑制治療をウイルスベクター、例えばアデノウイルスベクターと同時に用いて、ウイルスベクターおよびトランスフェクションされた細胞の免疫不活化を回避するのが好ましい。例えば、免疫抑制性サイトカイン、例えばインターロイキン-12 (IL-12)、インターフェロン- (IFN-) または抗CD4抗体を投与して、ウイルスベクターに対する体液性または細胞性免疫応答を阻止することができる [例えばWilson, Nature Medicine (1995)を参照]。また、最小限の抗原を発現するよう操作されたウイルスベクターを用いることは有利である。

20

【0087】

当然、本発明は、遺伝子治療用途のためのAkt3の治療上の有効量を発現するベクターのデリバリーを考慮している。本明細書において用いる用語「治療上の有効量」は、宿主の活性、機能および反応の臨床的に顕著な欠損を少なくとも15%まで、好ましくは少なくとも50%まで、より好ましくは少なくとも90%まで低減する、最も好ましくは完全に阻止するために十分な量を意味する。また、治療上の有効量は、宿主における臨床的に顕著な状態の改善を引き起こすのに十分な量である。

30

【0088】

アデノウイルスベクター

好ましい態様において、ベクターはアデノウイルスベクターである。アデノウイルスは、修飾して本発明の核酸を種々の細胞タイプに効果的にデリバリーし得る、真核細胞性DNAウイルスである。アデノウイルスの種々の血清型が存在する。これら血清型の好ましいものには、タイプ2もしくはタイプ5のヒトアデノウイルス (Ad2もしくはAd5) または動物起源のアデノウイルス (W094/26914を参照) が挙げられ、これらは本発明の範囲内である。本発明の範囲内において使用しうる動物起源のアデノウイルスは、イヌ、ウシ、ネズミ (例えばMavl. Beard等, Virology 75 (1990) 81)、ヒツジ、ブタおよびサル (例えばSAV) 起源のアデノウイルスが包含される。動物起源のアデノウイルスは、イヌのアデノウイルスであるのが好ましく、より好ましくはCAV2アデノウイルスである (例えばManhattanまたはA26/61株 (ATCC VR-800))。

40

【0089】

本発明の複製欠損アデノウイルスベクターは、ITR、封入化配列および目的の核酸を含むのが好ましい。より好ましくはアデノウイルスベクターの少なくともE1領域が非機能的なものである。E1領域における欠失は、Ad5アデノウイルスの配列の455~332ヌクレオチド (PvuII-BglII断片) または382~3446ヌクレオチド (HinfII-Sau3A断片) であるのが好ましい。他の領域もまた、特にE3領域 (W095/02697)、E2領

50

域 (W094/28938)、E 4 領域 (W094/28152, W094/12649 および W095/02697) または後期遺伝子 L 1 - L 5 の任意の領域を変異させてもよい。

【0090】

好ましい態様において、アデノウィルスベクターは、E 1 領域 (Ad 1.0) において欠損を有する。E 1 欠失アデノウィルスの例は、EP 185,573 に開示されており、その内容は本明細書に引用することにより組み入れる。別の好ましい態様において、アデノウィルスベクターは E 1 および E 4 領域 (Ad 3.0) において欠失を有する。E 1 / E 4 欠失アデノウィルスの例は W095/02697 および W096/22378 に開示されており、その内容は本明細書に引用することにより組み入れる。他の好ましい態様において、アデノウィルスベクターは、E 4 領域および核酸配列を E 1 領域に挿入した、E 1 領域における欠失を有する (FR 94 13355 を参照、その内容は本明細書に引用することにより組み入れる)。

10

【0091】

本発明の複製欠損組換えアデノウィルスは、当業者に知られた任意の技術により作成することができる (Levrero 等, Gene 101 (1991) 195, EP 185573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917)。特に、これらはアデノウィルスと特に目的の DNA 配列を運搬するプラスミドの間での相同的組換えにより作成することができる。相同的組換えは、アデノウィルスとプラスミドの適当な細胞系への同時トランスフェクションの後に達成される。用いられる細胞系は、好ましくは (i) 前記成分によりトランスフェクション可能であり、(ii) 複製欠損アデノウィルスのゲノムの一部分を補足しうる配列を含有するものであり、組換えの危険性を回避するための組込み型であるのが好ましい。使用しうる細胞系の例は、そのゲノム中に組込まれた Ad 5 アデノウィルスのゲノムの左側部分 (12%) を含有するヒト胎児性腎臓細胞系 293 (Graham 等, J. Gen. Virol. 36 (1977) 59)、並びに特許出願 W094/26914 および W095/02697 に記載される E 1 および E 4 の機能を補足しうる細胞系である。組換えアデノウィルスは、当業者によく知られた標準分子生物学的技術を用いて回収し、そして精製される。

20

【0092】

アデノ随伴ウィルスベクター

アデノ随伴ウィルス (AAV) は、安定で且つ部位特異的な様式で感染させる細胞のゲノムに組込まれうる比較的サイズの小さい DNA ウィルスである。これらは、細胞増殖、形態または分化における作用を何ら誘導することなく、広範囲の細胞に感染することができ、そしてこれらはヒトの病態に包含されないものである。AAV ゲノムはクローン化され、配列決定され、そして特徴付けされている。これは約 4700 塩基を含み、ウィルスの複製起点として保存されている、約 145 塩基の逆方向末端反復 (ITR) 領域を各末端に含有する。ゲノムの残留物は、2つの必須領域に分割され、封入機能：ウィルス複製およびウィルス遺伝子の発現に伴われる rep 遺伝子を含むゲノムの左側部分：ウィルスのカプシドタンパク質をコードする cap 遺伝子を含むゲノムの右側部分を運搬する。

30

【0093】

遺伝子導入のためのインビトロおよびインビボにおける AAV 由来のベクターの使用は記載されている (WO 91/18088; WO 93/09239; US 4,797,368; US 5,139,941; EP 488 528 を参照)。これらの刊行物には、rep および / または cap 遺伝子が欠損し、目的の遺伝子により置換されている種々の AAV 誘導構築物および前記目的の遺伝子をインビトロ (培養細胞中) またはインビボ (生物中に直接) 導入するためのこれら構築物の使用が記載されている。本発明の複製欠損組換え AAV は、2つの AAV 逆方向末端反復 (ITR) 領域により挟まれている目的の核酸配列を含むプラスミドと AAV 封入遺伝子 (rep および cap 遺伝子) を運搬するプラスミドを、ヒトヘルパーウィルス (例えばアデノウィルス) を用いて細胞系中に同時トランスフェクションして、感染させることにより作成することができる。作成される AAV 組換え体は、次いで標準技術により精製される。

40

【0094】

従って、本発明はまた、そのゲノムが AAV の ITR により挟まれた Akt 3 をコードする核酸配列を含む、AAV 誘導組換えウィルスに関する。本発明はまた、AAV 由来の 2

50

つのLTRにより挟まれたAkt3をコードする核酸配列を含むプラスミドに関する。そのようなプラスミドは、適する場合にはリボソームベクター（偽ウイルス）中に組込まれるプラスミドを用いて、核酸配列を導入するために使用することができる。

【0095】

レトロウイルスベクター

別の態様において、遺伝子はレトロウイルスベクター、例えばAnderson等、米国特許第5,399,346号：Mann等、1983. Cell 33:153：Temin等、米国特許第4,650,764号：Temin等、米国特許第4,980,289：Markowitz等、1988. J. Virol. 62:1120：Temin等、米国特許第5,124,263号：EP 453242, EP 178220：Bernstein等、Genet. Eng. 7 (1985) 235:McCormick, BioTechnology 3 (1985) 689：Dougherty 等による、1995年3月16日公開の国際特許公開W095/07358およびKuo等、1993. Blood 82:845に記載されるベクター中に導入することができる。レトロウイルスは、分裂細胞に感染する組込みウイルスである。レトロウイルスのゲノムは、2つのLTR、封入化配列および3つのコード領域（gag、polおよびenv）を含む。組換えレトロウイルスベクターにおいて、gag、polおよびenv遺伝子は通常は全体または一部において欠失しており、目的の異種核酸配列で置換されている。これらのベクターは、異なるタイプのレトロウイルス、例えばHIV、MoMuLV（ネズミモロネー白血病ウイルス）、MSV（ネズミモロネー肉腫ウイルス）、HaSV（ハービー肉腫ウイルス）、SNV（脾臓壊死ウイルス）、RSV（ラウス肉腫ウイルス）およびフレンドウイルスから構築することができる。欠損レトロウイルスベクターはW095/02697に開示されている。

【0096】

通常、核酸配列を含む組換えレトロウイルスを構築するためには、LTR、封入化配列およびコード配列を含むプラスミドを構築する。この構築物はパッケージング細胞をトランスフェクションするために用いられ、細胞系はプラスミド中において欠損しているレトロウイルス機能をトランス[in trans]で補足しうるものである。故に、パッケージング細胞は通常、gag、polおよびenv遺伝子を発現しうる。そのようなパッケージング細胞は先行技術に記載され、特に細胞系PA3I7 (US4,861,719)、PsiCRIP細胞系 (WO 90/02806) および GP⁻envAm⁺12細胞系 (WO 89/07150) である。さらに、組換えレトロウイルスベクターは、LTR内に転写活性を抑制するための変異、同様にgag遺伝子の一部を包含しうる多数の封入化配列 (Bender等、J. Virol. 61 (1987) 1639) を含有しうる。組換えレトロウイルスベクターは、当業者に知られた標準技術により精製される。

【0097】

レトロウイルスベクターは、感染粒子として機能するようまたは1回のトランスフェクションを行うように構築することができる。前者の場合、ウイルスは発癌形質転換性の原因となるものを除いてその遺伝子の全てを保持するように、そして異種遺伝子を発現するよう変異させる。非感染性ウイルスベクターは、ウイルス封入シグナルを破壊するが、異種遺伝子および封入シグナルを含むよう操作された同時導入ウイルスを封入するために必要な構造遺伝子を保持するように作成する。故に、産生されるウイルス粒子は、別のウイルスを産生することができない。

【0098】

標的遺伝子のデリバリーは、1995年10月公開の国際特許公開W0 95/28494に記載されている。

【0099】

非ウイルスベクター

また、ベクターはリポフェクションによりインピボにて導入することができる。過去10年間で、インピトロにおける核酸の封入およびトランスフェクションのためのリボソームの使用は増加している。合成カチオン脂質は、リボソーム媒介トランスフェクションに伴う問題点および危険性を制限するよう設計され、これを用いてマーカーをコードする遺伝子のインピボトランスフェクションのためのリボソームを作製することができる [Feigne

r等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:7413-7417 (1987); Mackey等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:8027-8031 (1988); Ulmer等, Science 259:1745-1748 (1993) を参照]。カチオン脂質の使用は、陰性荷電した核酸の封入を促進することができ、さらに陰性荷電した細胞膜との融合を促進することができる [FeignerとRingold, Science 337:387-388 (1989)]。特に有用な脂質化合物および核酸運搬のための組成物は、国際特許公開W095/18863およびW096/17823、並びに米国特許第5,459,127に記載されている。インビボで特定の器官に外来遺伝子を導入するためのリポフェクションの使用はある利点を有する。特定の細胞に対するリポソームの分子標的化はある範囲の利益を示す。特定の細胞タイプに対する指向性トランスフェクションが細胞異質性の組織、例えば脾臓、肝臓、腎臓および脳などにおいて特に有利であることは明らかである。脂質は、標的化の目的のために他の分子と化学的結合させることができる [上述のMackey等を参照]。標的とされるポリペプチド、例えばホルモンもしくは神経伝達物質、および抗体などのタンパク質、または非ペプチド分子は、リポソームと化学結合させることができる。

【0100】

他の分子、例えばカチオン性オリゴペプチド (例えば国際特許公開W095/21931)、DNA結合タンパク質由来のペプチド (例えば国際特許公開W096/25508) またはカチオン性ポリマー (例えば国際特許公開W095/21931) などまた、インビトロにおける核酸のトランスフェクションを促進するために有用である。

【0101】

裸のDNAプラスミドとしてベクターをインビボで導入することが可能である (米国特許第5,693,622号、第5,589,466号および第5,580,859号)。遺伝子治療用の裸のDNAベクターは、当該技術分野において知られた方法、例えばトランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合、DEAEデキストラン法、リン酸カルシウム沈殿法、遺伝子銃の使用またはDNAベクタートランスポーターの使用により所望の宿主細胞中に導入することができる [例えば、Wu等, J. Biol. Chem. 267:963-967 (1992); WuとWu, J. Biol. Chem. 263:14621-14624 (1988); Hartmut等, 1990年3月15日出願のカナダ国特許出願第2,012,311号; Williams等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2726-2730 (1991)を参照]。受容体媒介DNAデリバリー法もまた使用することができる [Curriel等, Hum. Gene Ther. 3:147-154 (1992); WuとWu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)]。好ましい裸のDNAベクターには、条件的複製起点を有するpCORプラスミド (W097/10343を参照) および複製起点とマーカー遺伝子を欠失するミニサークルプラスミド [minicircle] (W096/26270を参照) が含まれる。

【0102】

医薬組成物およびデリバリー

本発明はまた医薬組成物に関する。そのような組成物は、既に定義した、Aktタンパク質もしくはポリペプチドまたはAktタンパク質もしくはポリペプチドをコードする核酸、および医薬上許容しうるキャリアまたはベヒクルを含む。本発明の組成物は、特に遺伝子治療のための生体物質製剤に適する。故に、好ましい態様において、組成物はヒトAkt3タンパク質またはポリペプチドをコードする核酸を含む。

【0103】

本発明のウィルス性または非ウィルス性の任意のベクターは、医薬上許容しうるキャリアまたはベヒクル中においてインビボで導入されるのが好ましい。用語「医薬上許容しうる」は、生理的に許容しうるものであり、ヒトに投与した場合に例えば胃の不調、めまいなどの典型的なアレルギーまたは同様な不都合な反応を生じない分子それ自体および組成物を意味する。好ましくは、本明細書にて用いる用語「医薬上許容しうる」は、連邦政府、州政府または米国薬局方、または動物において、より好ましくはヒトにおいて使用するための他の一般的に認知された薬局方に列記された管理機関により承認されていることを意味する。用語「キャリア」は、化合物を投与する際に用いる、希釈剤、アジュバンド、賦形剤またはベヒクルを意味する。そのような医薬キャリアは水および、例えば石油、動物油、植物油または合成油、例えば落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油などを包含する油など

の無菌液体とすることができる。水または水溶液、生理食塩水並びに水溶性デキストロースおよびグリセロール溶液をキャリアとして、特に注射可能な溶液において用いることが好ましい。適する医薬キャリアは、E. W. Martinによる“Remington's Pharmaceutical Sciences”に記載されている。

【0104】

本発明の医薬組成物は、局所投与、経口投与、非経口投与、鼻腔投与、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、眼内投与などの目的で製剤化しうる。好ましくは、医薬組成物は注射可能な製剤用の医薬上許容しうるベヒクルを含有する。これらは、特に無菌の等張性生理食塩水（リン酸一ナトリウムもしくは二ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムもしくは塩化マグネシウムなどの塩またはその塩の混合物）、または乾燥、特に凍結乾燥したもので、適する無菌の水または生理食塩水の添加により注射可能な溶液を形成しうる組成物とすることができる。

10

【0105】

組成物は、特に等張性の、無菌の生理食塩水（リン酸一ナトリウムもしくは二ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムもしくは塩化マグネシウムなどの塩またはその塩の混合物）、または乾燥、特に凍結乾燥した組成物であり、その場合に応じて、無菌水もしくは生理食塩水の添加にて注射可能な溶液を構成しうるものである。

【0106】

好ましい無菌の注射可能な製剤は、無毒性の非経口的に許容しうる溶媒または希釈液中の溶液または懸濁液とすることができる。医薬上許容しうるキャリアまたはベヒクルは、塩溶液、緩衝塩溶液、等張塩溶液（例えばリン酸一ナトリウムもしくは二ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムもしくは塩化マグネシウムなどの塩またはその塩の混合物）、リンガー液、デキストロース、水、無菌水、グリセロール、エタノールおよびこれらの組合せである。1,3-ブタノールおよび無菌の不揮発性油は、溶媒または懸濁媒体として適宜用いられる。合成モノ-またはジ-グリセリドを含む任意の混合不揮発性油を用いることができる。脂肪酸、例えばオレイン酸もまた、注射可能な製剤中における使用が見出される。

20

【0107】

本発明の核酸の投与量は、それ単独でまたは投与に際して用いられるベクター中に組み込まれたもののいずれかにおいて、異なるパラメータに従って、特に用いられる投与様式、問題とされる病態、発現させるべき遺伝子または所望される治療期間に応じて調節することができる。一般的には、本発明の組換えウィルスの場合、これらは $10^4 \sim 10^{14}$ p f uの範囲、好ましくは $10^6 \sim 10^{10}$ p f uの投与形態において製剤化され、投与される。用語「p f u（プラーク形成単位）」は、ウィルス溶液の感染力に相当し、適する細胞培養物の感染および通常は48時間後の感染細胞プラーク数の測定により決定される。ウィルス溶液のp f u力価を測定する技術は、文献に詳細に記載されている。

30

【0108】

本明細書にて用いられる用語「治療上の有効量」は、宿主の活性、機能および反応における臨床上の顕著な欠損を少なくとも15%まで、好ましくは少なくとも59%まで、より好ましくはすくなくとも90%まで減少させる、そして最も好ましくは防止するのに十分な量を意味する。また、治療上の有効量は、宿主において臨床上の顕著な状態の改善を引き起こすのに十分な量を意味する。

40

【0109】

本発明の組成物は、非経口的または粘膜を介して、例えば経口的、鼻腔にもしくは直腸に、または経皮的に投入することができる。好ましくは、投与は皮経口的、例えば静脈注射、さらに細動脈内投与、筋肉内投与、経皮的投与、皮下的投与、腹腔内投与、心室内投与および頭蓋内投与が包含されるが、これらに限定されない。組成物の投与は、治療すべき部位に、特に心臓内に直接注射することにより導入することができる。

【0110】

心臓への投与の好ましい経路は、心臓内への直接注射である（米国特許第5,693,622号）

50

。心臓は、当該技術分野で利用可能な任意の技術、例えば磁気共鳴造影法またはコンピュータ断層撮影法などを用いて造影することができ、治療用組成物は例えば定位注射により投与される。心臓への投与はまた、カテーテルを介して行うことができる（米国特許5,851,521号）。

【0111】

他の態様において、ヒトAkt3ポリペプチドまたは当該ポリペプチドをコードする核酸を含む組成物は、制御放出システムにおいてデリバリーすることができる。例えば核酸またはポリペプチドは、静脈内注入、移植可能な浸透圧ポンプ、経皮パッチ、リポソームまたは他の投与様式を用いて投与することができる。ある態様において、ポンプを使用してもよい[上述のLanger; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald等, Surgery 88:507 (1980); Saudek等, N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)を参照]。

他の態様において、ポリマー物質を用いることができる「Medical Applications of Controlled Release. Langer と Wise (eds.), CRC Press: Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability. Drug Product Design and Performance. Smolen and Ball (eds.), Wiley: New York (1984); Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983)を参照; さらにLevy等, Science 228:190 (1985); During等, Ann. Neurol. 25:351 (1989); Howard等, J. Neurosurg. 71:105 (1989)を参照」。

他の態様において、制御放出システムを治療の標的、即ち心臓の近位に位置させることができ、故に全身性投与のフラクションのみが必要とされる[例えばGoodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2. pp. 115-138 (1984)を参照]。他の制御放出システムは、Langerによる評論[Science 249:1527-1533 (1990)]において検討されている。

【0112】

故に、本発明の組成物は、静脈内、動脈内、腹膜内、筋肉内または皮下における投与経路によりデリバリーすることができる。また、適切に製剤化された組成物は、鼻腔内投与または経口投与により投与することができる。生体物質の一定供給は、治療上有効な投与量（即ち被検者において代謝の変化を誘導するのに有効な投与量）を必要とされる間隔、例えば1日、毎12時間などで供給することができる。これらのパラメータは、治療する病状の重大性、実施される食事制限などの他の作用、被検者の体重、年齢および性別、並びに当業者による標準有効医療行為に従って容易に決定しうる他の基準次第である。

【0113】

本発明の範囲内の生体物質が投与される生物はヒトであるのが好ましいが、任意の動物とすることができる。故に、本発明の方法および医薬組成物が任意の動物、特にほ乳類に対する投与、即ち獣医学的用途に特に適することは当業者であれば容易に理解することができる、そして動物には家庭の動物、例えばネコまたはイヌ、家畜、例えばウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジおよびブタなど、野生動物（自然または動物園内における野生動物）、実験動物、例えばマウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、イヌ、ネコなど、鳥類、例えばニワトリ、七面鳥、鳴き鳥などが含まれるがこれに限定されない。

【0114】

スクリーニングアッセイ

本発明のAkt3タンパク質をコードする遺伝子の同定および単離は、天然のものから単離できるよりもはるかに多い量でのAkt3発現、または特別に操作されて、細胞のトランスフェクション後または形質転換後に発現するAkt3活性を示す指示細胞におけるAkt3発現を提供する。従って、本発明は、Akt3ポリペプチドの構造に基づくアゴニストおよびアンタゴニストの合理的設計に加えて、当該技術分野において知られた種々のスクリーニングアッセイを用いてAkt3の特異的リガンドを特定する別法を考慮するものである。

【0115】

Akt3はアポトーシスから細胞を保護する。故に、アポトーシスを阻害するその能力を促進するAkt3のアゴニストは、心筋梗塞または虚血再灌流障害を被る患者の治療にお

10

20

30

40

50

けるその活性を改善すると期待される。一方、増加した細胞の生存は腫瘍の進行の要因であり、故に腫瘍形成および/または進行の原因となっている。従って、A k t 3 活性の阻害剤は、腫瘍細胞の生存を減少させ、その結果として腫瘍の退行をもたらすと期待される。

【 0 1 1 6 】

当該技術分野において知られた任意のスクリーニング技術を使用して、A k t 3 アゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングすることができる。例えば、ヒト A k t 3 および A S K 1 の両方を発現する適する細胞系、例えばヒト胎児性腎臓細胞 H E K 2 9 3 などは、マーカー遺伝子、例えば - ガラクトシダーゼをコードする核酸を用いてトランスフェクションすることができる。次いで、細胞はアゴニストまたはアンタゴニストを含む試験溶液に露呈され、次に - ガラクトシダーゼ活性について染色される。試験溶液に露呈していないコントロール細胞と比較して - g a l 陽性細胞がより多く存在することは、試験溶液中に A k t 3 アゴニストが存在することを示す。逆に、試験溶液に露呈していないコントロール細胞と比較して - g a l 陽性細胞がより少なく存在することは、試験溶液中に A k t 3 アンタゴニストが存在することを示す。

【 0 1 1 7 】

本発明は、低分子リガンドまたはリガンドのアナログおよび模倣するものについてのスクリーニング、同様にインビボにて A k t 3 と結合する、そしてこれを作動するまたはこれと拮抗する天然分子についてのスクリーニングを考慮するものである。例えば、A k t 3 活性を作動するまたはこれと拮抗する分子についての本発明のアッセイを用いて、天然生成物のライブラリーをスクリーニングすることができる。

【 0 1 1 8 】

A k t 3 の一次配列、および機能が知られているタンパク質の配列との類似性の知見は、タンパク質の阻害剤またはアゴニストとしての最初の手かがりを提供することができる。アゴニストの同定およびスクリーニングは、さらにタンパク質の構造的特徴を、例えば X 線結晶学、中性子回折、核磁気共鳴スペクトロメトリーおよび構造決定のための他の技術を用いて決定することにより促進される。これらの技術は、アゴニストおよびアンタゴニストの合理的設計または同定を提供する。

【 0 1 1 9 】

他の手法は組換えバクテリオファージを用いて、大きなライブラリーを作成する。ファージ法 [Scott と Smith, 1990, Science 249:386-390 (1990) ; Cwirla 等, Proc. Natl. Acad. Sci. 87:6378-6382 (1990) ; Devlin 等, Science. 249:404-406 (1990)] を用いて、非常に大きなライブラリー ($10^6 \sim 10^8$ の化学エンティティ) を構築することができる。第 2 の手法は主に化学的方法を用いる、例えば Geysen 法 [Geysen 等, Molecular Immunology 23:709-715 (1986) ; Geysen 等, J. Immunologic Method 102:259-274 (1987)] および Fodor 等の方法 [Science 251:767-773 (1991)] である。Furka 等 [14th International Congress of Biochemistry, Volume 5, Abstract FR:013 (1988) ; Furka, Int. J. Peptide Protein Res. 37:487-493 (1991)]、Houghion [1986 年 12 月に特許された、米国特許第 4,631,211 号] および Rutter 等 [1991 年 4 月 23 日付で特許された、米国特許第 5,010,175 号] は、アゴニストまたはアンタゴニストとして試験することができるペプチドの混合物の製造方法を記載している。

【 0 1 2 0 】

別の態様において、合成ライブラリー [Needels 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10700-4 (1993) ; Ohmeyer 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10922-10926 (1993) ; Lam 等, 国際特許公開 WO 92/00252 ; Kocis 等, 国際特許公開 WO 9428028、各々について本明細書にて引用することによりその全てを組み入れる] などを用いて、本発明の A k t 3 リガンドについてスクリーニングすることができる。

【 0 1 2 1 】

スクリーニングは、A k t 3 を発現する組換え細胞、または精製したタンパク質を用いて、例えば上述のように組換えにより製造した精製タンパク質を用いて実施することができ

る。例えば、上述の引用文献において記載したように、標識した可溶性 A k t 3 を用いてライブラリーをスクリーニングすることができる。

【 0 1 2 2 】

ある態様において、A k t 3 を直接標識してもよい。別の態様において、標識二次試薬を用いて、A k t 3 が目的の分子、例えば固相支持体に結合させた分子に結合するのを検出することができる。結合は、酵素標識による発色団の in situ 形成により検出することができる。適する酵素には、アルカリフォスファターゼおよび西洋わさびペルオキシダーゼが包含されるが、これらに限定されない。別の態様において、2 種類の発色性基質と目的の別々のアクセプター分子上における 2 種類の酵素標識を用いる 2 色アッセイを用いてもよい。交叉反応性および単一反応性リガンドは、2 色アッセイを用いて特定することができ

10

【 0 1 2 3 】

本発明において使用する他の標識には、着色ラテックスビーズ、磁性ビーズ、蛍光標識（例えばフルオレセインイソチオシアネート（F I T C）、フィコエリトリン（P E）、テキサスレッド（T R）、ローダミン、一連の遊離またはキレートランタニド塩、特に E u³⁺、2 ~ 3 の蛍光発色団 [fluorophore]）、化学発光性分子、ラジオアイソトープまたは磁気共鳴造影標識が含まれる。2 色アッセイは、2 種類以上の着色ラテックスビーズまたは異なる波長にて放射する蛍光発色団を用いて実施することができる。標識は、可視的にまたは機械的 / 光学的手段により検出することができる。機械的 / 光学的手段には、蛍光分析装置、即ち F A C S に類似したものおよびマイクロマニピュレーター転移手段が含まれる。

20

【 0 1 2 4 】

本明細書にて説明したように、A k t 3 タンパク質レベルは、タンパク質の代謝標識により評価することができる。代謝標識が [³⁵S] - メチオニンを補足した培養培地の存在下に組織検査のインビトロインキュベーション中に生じるため、検出されるマーカーの各レベルは、インビトロ条件により影響を受ける。本発明は、[³⁵S] - メチオニンを用いた代謝（または生合成）標識に加えて、さらに [¹⁴C] - アミノ酸および [³H] - アミノ酸（安定部分におけるトリチウム置換を有する）を用いた標識を考慮するものである。故に、化合物の試料またはライブラリーは、この部分の標識後に直接分析することができるが、前記標識は例えば銀、金、クマシーブルーまたはアミド - シュワルツを用いる比色染色、さら

30

に 2 ~ 3 の技術：同位元素標識、例えば [³²P] - オルトリン酸、[¹²⁵I]、[¹³¹I] を用いた標識；蛍光または化学発光タグ；および標識抗体またはマーカーの特異的結合パートナーを用いた免疫検出である。

本発明は、下記の実施例を参照することによりより理解することができるが、これらは本発明の説明のために示すものであり、本発明を何ら限定するものではない。

【 0 1 2 5 】

【実施例】

一般的な分子生物学的手法

プラスミド D N A の予備的な抽出、セシウムクロライドグラジエントによるプラスミド D N A の遠心、アガロースまたはアクリルアミドゲル電気泳動、エレクトロエリューションによる D N A 断片の精製、フェノールまたはフェノール / クロロホルムを用いたタンパク質抽出、塩溶媒中での D N A のエタノールまたはイソプロパノール沈殿、大腸菌の形質転換などの分子細胞生物学において伝統的に使用されてきた方法は同分野における技術者によく知られているし、文献に十分な説明が記述されている [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; (1989 年第二版); Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987]。

40

【 0 1 2 6 】

従来のクローニング法には P B r 3 2 2 や p U C 型プラスミドそして M 1 3 シリーズのファージが含まれている。これらは商業的に入手可能である (Bethesda Research Laborato

50

ries社)。

【0127】

ライゲーションに関しては、DNAフラグメントはアガロースまたはアクリルアミドゲル電気泳動によりサイズによって分離し、フェノールまたはフェノール/クロロホルム混合液により抽出し、エタノール沈殿をし、それから供給元が推奨する方法に従ってファージ T4 DNA ライゲース (Biolabs社) の存在下でインキュベートする。

【0128】

5'突出末端のフィルインは供給元の仕様書に従い、大腸菌 DNA ポリメラーゼ I (Biolabs社) 由来のクレノーフラグメントを利用して行った。3'突出末端の除去は供給元が推奨する方法に従って使用したファージ T4 DNA ポリメラーゼ (Biolabs社) の存在下で行った。5'突出末端の除去は S1 ヌクレアーゼを用いた処理制御によって行った。

【0129】

合成オリゴヌクレオチドによるインビトロダイレクトミュータジェネシスは、テイラーら [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] により開発された方法に従い、アマシャム社から販売されているキットを使用して行った。

【0130】

PCR法 [Polymerase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R. K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. and Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] による DNA 断片の酵素的増幅は“DNAサーマルサイクラー”(Perkin Elmer Cetus社)を用い、製造元の仕様書に従って実施可能である。

【0131】

核酸配列の確認はサンガーらによって開発された方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] により、アマシャム社から販売されているキットを使用して実施可能である。

プラスミドDNAはキアゲンプラスミド精製システムにより、製造元の使用説明書に従って精製可能である。

【0132】

実施例1：ヒトAkt3のクローニング

本実施例ではAkt3タンパク質をコードする核酸のクローニングについて述べる。

実施例1.1：Akt3遺伝子のcDNAライブラリースクリーニング

データベースサーチによって、ヒトcDNAクローンの一つがヒトAkt1とAkt2に相同性を有するが、それらとは異なっているヒトcDNAのストレッチを含んでいることが明らかとなった。これ以前には未知のヒトAktのアイソフォーム(ここにヒトAkt3と命名する)の完全長コード配列を単離するために、ヒトAkt3のN末端側に対する5'-UTRとコード領域に相当するcDNAプローブを使用し、ヒト心臓由来cDNAライブラリーをスクリーニングした。

【0133】

ヒトcDNAクローン(ID# 479072)は購入した(Genome System Inc.社)。ヒトAkt3の5'-UTR(非翻訳領域)と5'側コード配列の一部をカバーするこのDNAフラグメントは、以下のプライマーを使用したポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅された：Akt3-5'UTR-F3 (5' TCC AAA CCC TAA AGC TGA TAT CAC 3'; SEQ ID NO: 3)とAkt3-c-R1 (5' CCT GGA TAG CTT CTG TCC ATT C 3'; SEQ ID NO: 4)。cDNAプローブはランダムプライムDNAラベリングキット(ベーリンガーマンハイム社)を使用し、供給元の使用説明書に従い、[- p 3 2] dCTPでラベルした。プローブは製造元の使用説明書に従い、バイオラッド社製クロマトグラフィースピナラムを用いて精製した。

【0134】

100万個を超えるファージクローンが最初にcDNAファージライブラリースクリーニング(Clontech社, Cat# HL5027t)に対して使用された。宿主細胞XL1-BはLB培地中(20mg/ml テトラサイクリン、0.2%マルトースと10mM MgCl₂添加)にて一晩、37

10

20

30

40

50

でインキュベートした。ファージ感染及びメンブレンリフティングはManiatis (1989) の記載に従って行った。メンブレンは変性し、復元し、そしてベイクした後、65℃、4時間、ハイブリダイゼーション液にてプレハイブリダイゼーションを行った。変性させたp32ラベルプローブ(10分間、熱変性させた)をメンブレンに加え、一晚、ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、メンブレンは65℃にて2×SSC/0.1% SDS、1×SSC/0.1% SDS及び0.5×SSC/0.1% SDSで連続洗浄した。メンブレンを風乾し、コダック社 X線フィルムに感光させた。この一次スクリーニング後、二次、三次スクリーニングに対してポジティブクローンを選択した。結果的に得られたポジティブファージを精製し、宿主細胞BM25.8-25を使用し、製造元(ベーリンガー・マンハイム社)の使用説明書に従って、ファージDNAをプラスミドDNAに変換した。

10

【0135】

完全長配列と更なる特徴付けのために二つのポジティブクローンを選択した。これらのクローンのうちの一つ(クローン#9)はヒトAkt3の5'-UTRとN末端側コード配列の一部(アミノ酸1~127番目)から成る。第二クローン(クローン#1)はヒトAkt3配列の大部分(アミノ酸15番目~C末端)と3'-UTRから成る。完全長のcDNA配列はこれら二つの部分的クローンの融合により形成された。ヒトAkt3をコードする完全長の配列はSEQ ID NO: 1に示されている。それに相当するアミノ酸配列はSEQ ID NO: 2に示されている。ヒトAkt3配列のラットAkt3配列とのアライメントは図1Aに示されている。ヒトAkt3配列のヒトAkt1とAkt2のアライメントは図1Bに示されている。

20

【0136】

重要なことには、Akt3はAkt1やAkt2よりも短く、そしてAkt2と分子のC末端側においてAkt1、またはAkt2と優位な相同性がない。とりわけ、ヒトAkt3のC末端部の最後の14アミノ酸はヒトAkt1とAkt2にある配列と異なっている。Akt1のC末端のSer473はその制御に極めて重要である(Stokeo et al. 1997, Stephens et al. 1998)。増殖因子刺激によって、PI3Kの活性は上昇する。PI3K産物であるPtdIns(3,4,5)-PはAkt1に結合し、その結果、細胞質から内部細胞質膜の近傍の場所へのAkt1の移動が起こり、そしてそこでAkt1の308番目のスレオニンと473番目のセリン残基がリン酸化される(Downward, 1998)。これらのアミノ酸残基のリン酸化はAkt1の活性化に重要である。Thr308のリン酸化は最近、同定されたプロテインキナーゼ、PDK1によるものである。しかし、Ser473をリン酸化するキナーゼ(リン酸化酵素)は未だ同定されていない(Stokeo et al. 1997, Stephens et al. 1998)。ヒトAkt3にはSer473がないということが、異なるリン酸化パターンがあること、そして故に、Akt3活性の異なった制御を暗示している。

30

【0137】

実施例1.2: ノーザンブロット解析によるAkt3遺伝子の組織発現分布の決定

Akt3の発現パターンを調べるため、ヒトマルチティッシュmRNAブロット(ヒト多組織由来mRNAブロット)をヒトAkt3に特異的な5'-UTR配列由来でp32にてラベル化したcDNAプローブを用い、ハイブリダイゼーションを行った。ヒトマルチティッシュmRNAブロットはクロンテック社から購入した。5'-UTRに相当するヒトAkt3 cDNA断片は以下のプライマーを使用し、PCR増幅を行った: Akt3-5' UTR-F1 (5'-TTT CGG AGG CTC TAG TTT GGT G-3'; SEQ ID NO: 15)とAkt3-5' UTR-R1 (5'-CCC AAC TTG GAG AAA TGG TAC-3'; SEQ ID NO: 16)。製造元の使用説明書に従い、ランダムプライムDNAラベリングキット(ベーリンガー・マンハイム社)を使用して50ngのcDNAをラベリングした。ハイブリダイジングブロットの使用は製造元の使用説明書に従い、それを精製そしてボイル(煮沸変性)したプローブと68℃、1時間はハイブリダイゼーションさせて行った(クロンテック社)。ハイブリダイゼーション後、そのブロットを溶液1(2×SSC, 0.05% SDS)中で室温にて2回洗浄(各洗浄につき20分間)した。それから、そのブロットを溶液2(0.1% SSC, 0.1% SDS)中で5

40

50

0にて30分間、洗浄した。洗浄後、そのプロットをコダック社X線フィルムに、-80で一晩感光させた。その結果はAkt3が各組織で遍在的に発現しており、特に心臓で観察された発現レベルが最も高くなっていることを実証している(図2)。

【0138】

実施例2：Akt3発現プラスミドの構築

PI3Kの活性化は血清、または増殖因子による刺激により誘導される。活性化型PI3KはPI3をPI3-Pに変換する、そしてそれはAkt1のAH/pHドメインに結合し、細胞質から細胞質膜へのAkt1の移動を誘導し(Downward 1998, Alessi et al. 1996)、そしてそこでAktはPDK1によってさらにリン酸化され、そして活性化される(Stokoe et al. 1997, Stephens et al. 1998)。N末端にv-Srcのみリスチレーション配列を融合させた(膜局在のために)Aktでは結果的に、Myr-Akt mutant(ミュータント)が膜に局在するようになる。Aktが局在するこの膜は構成的に活性であり(Kulik et al. 1997)、そして種々の刺激によって誘発されるアポトーシスを阻害する。

【0139】

本実施例は活性化型Akt3の発現プラスミドの構築について記述するものである。最初の二つの部分的cDNAクローン(上記記述のクローン#1とクローン#9)を完全長のAKT3コーディング配列を得るために融合した。ヒトSrc由来のミリスチレーションからなるDNA配列を完全長のAkt3配列のN末端に融合させた。HA-tag(タグ)配列を完全長のAkt3配列のC末端に融合させた(発現の検出のため)。このキメラMyrAkt3HAに対する配列をCMVプロモーターの制御下に置いた。完全なコンストラクトはCMV6-MyrAkt3HAと呼んだ(図2A)。

【0140】

実施例2.1：CMV6-MyrAktHA

本実施例はAkt3の発現可能なプラスミドの構築とヒトAkt3の構成的な活性化フォームについて記述するものである。完全長のAkt3コーディング配列は以下のプライマーを使用し、クローン#1のPCR増幅によって得られた：hAKT3c19-PCR5(F)：(5'-ATG AGC GAT GTT ACC ATT GTG AAA GAA GGT TGG GTT CAG AAG AGG GGA GAA TAT ATA AAA AAC TGG AGG CCA AG-3'; SEQ ID NO：5)、これはAkt3タンパク質の最初の24アミノ酸のコーディング配列を含んでいる、そしてhAKT3c11-PCR3(R)：(5'-TTA TTT TTT CCA GGT ACC CAG CAT GCC-3'; SEQ ID NO：6)。

【0141】

構成的に活性的なAkt3フォームを作製するため、完全長のAkt3コーディング配列は以下のプライマーを使用し、PCR増幅によって得られた：

MyrAkt3Ha-F1 (5'-GCG CGC GAA TTC CCA CCA TGG GTA GCA ACA
AGA GCA AGC CCA AGG ATG CCA GCC AGC GGC GCC GCA GCA GCG ATG TTA CCA
TTG TGA AAG-3'; SEQ ID NO：7)、

これはコザック配列(CCACC)、ヒトsrc遺伝子由来ミリスチレーション配列(下線部)とヒトAkt3タンパク質の最初の8アミノ酸(太文字)を含んでいる、そして

MyrAkt3Ha-R (5'-GCG CGC GGG CCC TTA GGC GTA GTC GGG GAC
GTC GTA CGG GTA TTT TTT CCA GTT ACC CAG CAT GCC-3'; SEQ ID NO：8)、

これはHA-tagのコーディング配列(太文字)を含んでいる。pCDNA3-Myr-Akt-HAの作製のために、PCR産物を制限酵素EcoRI/ApaIで消化し、そしてpCDNA3.1のEcoRI/ApaIサイトにサブクローニングした。MyrAktHAのコーディング配列は同様にPCR増幅を行い、そしてベクターCMV6のKp

10

20

30

40

50

n I / E c o R I サイトにサブクローニングした。P C R 反応に使用したプライマーは：C M V 6 - A K T 3 c a t - F (5'-CGG GGT ACC ACC ATG GGT AGC AAC AAG AGC AAG CCC AAG GAT GCC AGC CAG-3'; SEQ ID NO: 9)とC M V 6 - A K T 3 c a t - R (5'-CCG GAA TTC TTA GGC GTA GTC GGG GAC GTC-3'; SEQ ID NO: 10)であった。プラスミドはシーケンス解析により、確認した。

【 0 1 4 2 】

実施例 2.2：ヒト A K T 3 の発現

本実施例は組織培養におけるヒト A K T 3 の発現について記述するものである。H E K 2 9 3 細胞と C O S - 7 細胞は 1 0 % ウシ胎児血清 (FBS) を添加した D M E 培地で培養した。細胞は 3 7 °C、5 % C O₂ インキュベーター内で増殖させた。

プラスミド C M V 6 - [M y r A k t 3 H A] を H E K 2 9 3 細胞へトランジェント (一過性) にトランスフェクションした。コントロールとして、H E K 2 9 3 細胞に C M V 6 ベクターをトランスフェクトした。各トランスフェクションを行う前日に、細胞は $0.2 \times 10^6 / \text{cm}^2$ の密度となるようにスプリット (分割) しておいた。トランスフェクションはリポフェクトアミン (Gibco BRL 社) を使用し、製造元の使用説明書に従って行った。手短に言えば、D N A を D M E 培地 (血清と抗生物質なしの) と混ぜ合わせた。リポフェクトアミンを添加した (D N A : リポフェクトアミン = 1 mg : 4 ml)。軽く混合した後、D N A / リポフェクトアミン混合液を室温で 3 0 分間静置した。細胞を 1 × P B S で洗浄し、D N A / リポフェクトアミン混合液 2 3 時間、さらしておいた。トランスフェクション後、細胞を 1 × P B S で 2 回洗浄し、培地を D M E M - 1 0 % F B S に交換した。

【 0 1 4 3 】

トランスフェクションから 2 4 時間後、細胞を溶解した。ライセート (溶解物) は抗 H A 抗体で免疫沈降させ、免疫沈降物のリン酸化活性は A k t 1 に対する下流ターゲットである G S K - 3 (Cross et al. 1995) 由来のペプチドを使用して決定した。A k t に対するインビトロリン酸化アッセイはクロスら (Cross et al. 1995) の方法に従い、トランスフェクション後 2 4 時間で行った。細胞は 1 × P B S 溶液で 2 回洗浄し、そして細胞溶解緩衝液 (50mM トリス / 塩酸, pH7.4, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0.5mM バナジル酸ナトリウム (Na₃VO₄), 0.1% β-メルカプトエタノール, 1% トライトン X-100, 50mM フッ化ナトリウム, 5mM ピロリン酸ナトリウム, 10mM グリセロリン酸ナトリウム, 0.5mM PM SF, 2ug/ml アプロチニン, 2mg/ml ロイペプチンと 1mM ミクロシスチン (microcystin)) で溶解した。不溶性画分は 4 °C、1 5 分間の遠心にて除去した。細胞溶解液はポリクローマル抗 H A 抗体 (BABC0 社) と回転装置上で 4 °C、1 時間インキュベートした。プロテイン A - アガロースビーズは 1 時間溶解液に添加しておいた。免疫沈降後、ペレット (沈降物) を洗浄液 A (0.5M NaCl を添加した細胞溶解緩衝液) で 3 回洗浄し、洗浄液 B (50mM トリス / 塩酸, pH7.4, 0.03% Brij35, 0.1mM EGTA と 0.1% β-メルカプトエタノール) で 3 回洗浄し、そしてキナーゼ緩衝液 (20mM MOPS, pH7.2, 25mM β-グリセロリン酸ナトリウム pH7.0, 1mM バナジル酸ナトリウム (Na₃VO₄) と 1mM ジチオスレイトール) で 3 回洗浄した。洗浄後、ペレットをキナーゼ反応液 [100mM ATP, 0.1mg/ml クロスタイド (Crosstide) 基質ペプチド (UBI 社), 20mM MgCl₂, 10mM プロテインキナーゼ A インヒビター / PKI (UBI 社) と 10mCi (g-32P)-ATP] 4 0 ul に再懸濁させた。反応は 3 0 °C で 3 0 分間、行った。反応の完了後、混合液を軽く遠心し、そして上清 3 0 ul を円形の p 8 1 ニトロセルロース紙上に添加した。ニトロセルロース紙は 1 8 0 mM リン酸溶液で 3 回洗浄した (各洗浄は 1 0 分間)、そしてアセトンで 2 回洗浄した (各洗浄は 2 分間)。ニトロセルロース紙の放射活性はシンチレーションカウンター機器により測定した。C M V 6 [M y r A k t 3 H A] をトランスフェクトしたサンプルのキナーゼ活性はコントロールベクター C M V 6 をトランスフェクトした細胞のそれ、つまり同アッセイで認められたバックグラウンドレベルと同等よりも 2 0 倍高かった (図 2 B)。

【 0 1 4 4 】

トランスフェクトした細胞における M y r A k t 3 H A の発現について調べるために、トランスフェクト細胞から調整した細胞溶解液について抗 H A 抗体を用いたイムノプロット

ングを行った。細胞溶解液は上記のように調整し、そしてSDSポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行った。タンパク質をニトロセルロースメンブレンにトランスファー（転写）し、そしてそれをブロッキング溶液（1×PBS, 0.2% ツイーン20, 5% 脱脂乾燥ミルク）にて4日一晩処理した。メンブレンをマウスモノクローナル抗HA抗体（ブロッキング液で500倍希釈）と室温にて3時間、インキュベートした。ブロッキング液で3回洗浄（各15分間）した後、メンブレンをHRP（西洋ワサビペルオキシダーゼ）標識ウサギ抗マウスIgG抗体（ブロッキング液で1000倍希釈）と室温にて1時間、インキュベートした。ブロッキング液で3回洗浄（各10分間）した後、0.2% ツイーン20を添加した1×PBSで3回洗浄した。メンブレンをECL（PIERCE社）にて、製造元の使用説明書に従って現像し、そしてコダック社X線フィルムに感光させた。図2Cに示されている通り、CMV6-[MyrAkt3HA]をトランスフェクトしたサンプルにおいては、強い~60KDのバンド（MyrAkt1HAのサイズと同程度、データ示さず）があるが、CMV6をトランスフェクトしたサンプルでは認められない（ネガティブコントロール）。以上をひとまとめにして考えると、これらのデータはCMV6-[MyrAkt3HA]のトランスフェクションは、結果として機能的なAkt活性を生じさせることを証明している。

【0145】

実施例3：ヒトASK1のクローニング

本実施例はヒトASK1蛋白をコードする核酸のクローニングについて記述するものである。ASK1の完全長のcDNAクローンはヒト心臓由来cDNAファージライブラリーをスクリーニングすることによって得られた。スクリーニングに使用したプローブはpT7T3dをEcoRI/NotIで制限処理して得られたクローン#26237（Image Consortium社）の断片であった。ライブラリースクリーニング、プラーク精製、そしてファージDNAのプラスミドDNAの変換は上記記載の方法により行った。ASK1のコーディング配列の大部分（アミノ酸150~アミノ酸1376）を含むクローン#4、以下、全長ASK1と呼ぶことにする。全長ASK1は以下のプライマーを使用してPCR増幅を行った：ASK1-Clone#4F（5'-AAG GGC CGC CAG TGT GCT GGA GAG ATG AGC GAT GCC TTC-3'; SEQ ID NO: 11）とASK1-Clone#4R（5'-CCC TCT AGA TGC TCA TTC TGC ATT TGA TCC AGC TG-3'; SEQ ID NO: 12）。PCR産物は精製し、そしてベクターpCDNA3-nHAのBstXI/XbaIサイトにサブクローニングした。pCDNA3-nHA-ASK1（FL）と名付けたプラスミドの配列が正しいことを塩基配列解析により確認した。イチジョウら（1997）は同様に、ヒトASK1のクローニングと配列について記述している。

【0146】

実施例4：ASK1誘発の細胞死の阻害

アポトーシス刺激キナーゼ1（ASK1）の過剰発現はアポトーシス細胞死につながる（イチジョウら、1997）。本実施例はヒトAkt3の発現がASK1によって誘発される細胞死を阻害することを実証する。ASK1（pCDNA3-HA-ASK1FL）の発現プラスミドのみか、或いはそれとAkt3（CMV6-MyrAkt3HA）の発現プラスミドと組み合わせ、プラスミドCMV6-galをヒト胎児腎臓由来HEK2932個トランスフェクトした。トランスフェクションから2日後、以下の手順に従ってgalactosidase活性により、細胞を染色した。細胞を1×PBS（Mg²⁺とCa²⁺が入っていない）で3回洗浄し、3%ホルムアルデヒドのPBS溶液で室温にて10分間、固定した。固定した細胞を1×PBSで3回洗浄し、それから37℃にて湿潤室中で一晩、PBS中で4mMフェロシアン化カリウム、4mMフェリシアン化カリウム、4mM MgCl₂、400mg/ml X-Galとした溶液にて染色した。染色細胞を1×PBSで3回洗浄し、そして70%グリセロール溶液で封入した。

- gal 陽性細胞を光学顕微鏡下でカウントした。

【0147】

図3に示されているように、ASK1発現プラスミドのトランスフェクション（Akt3発現プラスミドの非存在下）はgal 陽性細胞の劇的な減少を引き起こしている。しかし、gal 陽性細胞の存在を測定することにより、Akt3発現プラスミドとのコ

トランスフェクションでは有意にASK1誘発の細胞死を阻害している。以上をひとまとめにして考えてみると、これらのデータは活性化型Akt3がASK1によって誘発される細胞死を抑制していることを実証している。Akt3の抗アポトーシス活性と心臓組織におけるその高発現との組み合わせから、心臓蛋白質としてのその有用性を支持するものである。

【0148】

ASK1は種々のタイプの細胞でアポトーシスによる細胞死を誘発する(イチジョウら、1997)。しかし、ASK1が誘発するアポトーシスの分子機構は解明されていない。ASK1の異所性発現は結果として、MKK4/JNKやMKK6/p38経路のような種々のストレス活性化シグナル経路の活性化につながるということが示されてきた、そしてこれらの経路の活性化はASK1誘発アポトーシスを仲介していることが示唆されてきた(イチジョウら、1997)。しかし、p38に対する特異的阻害剤の添加はASK1誘発アポトーシスに関して、ほとんどまたは全く効果がなく(データは示していない)、このことからASK1はp38キナーゼ活性とは独立してアポトーシス細胞死を誘発することを示唆している。

10

【0149】

本結果は活性化型Akt3が有意にASK1誘発アポトーシスを阻害することを実証しており、ASK、またはその下流のターゲットの一つがASK1誘発アポトーシス経路を阻害していることを示唆している。IGF-1はPI3K/Akt依存的な機構を通してJNK活性を抑制することが報告されてきた(Okubo et al. 1998)。Akt3は同様にJNKのキナーゼ活性を阻害することにより作用しているのかもしれない。

20

【0150】

本発明はここに記載されている特定の実施例によって、その範囲を制限されるべきものではない。実際に、ここに記載したものに加え、本発明の種々の態様が前述の明細書本文や添付の図から当業者に対して明瞭となるであろう。その様な態様は追加されるクレーム範囲内に入ることを意図されている。

さらに塩基サイズ、またはアミノ酸サイズの全て、そして記載の核酸若しくはポリペプチドの分子量、若しくは分子量値の全ては概算であり、そして本文明細書に記載されていることが理解されよう。

ここで種々の刊行物が引用されており、そしてその開示はその全体が参照によって本明細書に加入される。

30

【0151】

Aams JM. et al. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science. Vol.281(5381): 1322-1326.

Alessi DR. et al. 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. EMBO J. Vol.15(23): 6541-6551.

Barinaga M. 1998a. Is apoptosis key in Alzheimer's disease? Science Vol.281: 1303-1304.

Barinaga M. 1998b. Stroke-damaged neurons may commit cellular suicide. Science Vol.281: 1302-1303.

40

Chang HY et al. 1998. Activation of apoptosis signal-regulating kinase (ASK1) by the adapter protein DAXX. Science. Vol.281 (5384): 1860-1863.

Cross DA. et al.1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. Nature Vol.378(6559):785-789.

Downward J. 1998. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. Curr. Opin. Cell Biol. Vol.10(2): 262-267.

Dudek H. et al. 1997. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. Science Vol.275(5300): 661-665.

Franke TF. et al. 1995. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. Cell Vol.81(5): 727-73

50

6.

Franke TF. et al. 1997. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. Cell Vol.88(4): 435-437.

Hemmings BA. 1997a. Akt signalling: linking membrane events to life and death decisions. Science Vol.275(5300): 628-630.

Hemmings BA. 1997b. PtdIns(3.4.5)P3 gets its message across. Science Vol.277: 534.

Ichijo H. et al. 1997. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. Science. Vol. 275: 90-94.

Kauffmann-Zeh A. et al. 1997. Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. Nature Vol.385(6616): 544-548. 10

Klippel A. et al.1997. A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. Mol. Cell Biol. Vol.17(1): 338-344.

Komshi H. et al. 1995. Molecular cloning and characterization of a new member of the RAC protein kinase family: association of the pleckstrin homology domain of three types of RAC protein kinase with protein kinase C subspecies and beta gamma subunits of G proteins. Biochem. Biophys. Res. Co/am. Vol.216(2): 526-534.

Kulik G. et al. 1997. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. Mol. Cell Biol. Vol.17(3): 1595-1606. 20

MacLellan WR. et al. 1998. Death by design: programmed cell death in cardiovascular biology and diseases. Circ. Res. Vol.81(2): 137-144.

Okubo Y. et al. 1998. Insulin-like growth factor-1 inhibits the stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. J. Biol. Chem. Vol.273: 25961-25966.

Pullen N. et al. 1998. Phosphorylation and activation of p70S6K by PDK1. Science Vol.279: 707-710.

Sambrook J., Fritsch EF. & Maniatis T. 1989. Molecular Cloning (2nd edition). S

taal SP. 1987. Molecular cloning of the Akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol.84(14): 5034-5037. 30

Stephens L. et al. 1998. Protein kinase B kinases that mediated phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate-dependent activation of protein kinase B. Science Vol.279: 710-714.

Stokoe D. et al. 1997. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate in the activation of protein kinase B. Science Vol.277: 567-570.

Thomberry NA. et al. 1998. Caspases: enemies within. Science Vol.281: 1312-1316.

【図面の簡単な説明】

【図1A】 ヒトAkt1（配列番号14）、Akt2（配列番号13）およびAkt3（配列番号2）のアミノ酸配列のアラインメントである。 40

【図1B】 ラットAkt（配列番号17）およびヒトAkt3（配列番号2）アミノ酸配列のアラインメントである。

【図2】 Akt3 mRNAの組織分布パターンを示す。

【図3A】 活性化Akt3の模式図である。

【図3B】 活性化Akt3のHEK293細胞での異所性発現を示す。

【図3C】 活性化Akt3はAkt活性をもつことを示す。

【図4】 活性化Akt3はHEK293細胞でASK1誘発細胞死を抑制することを示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Guo, Kun
 Pagnoni, Marco
 Clark, Kenneth
 Ivashchenko, Yuri

<120> AKT NUCLEIC ACIDS, POLYPEPTIDES, AND USES THEREOF

<130> A3278A-WO

<140>

<141>

<150> 60/125,108

<151> 1999-03-19

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1570

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (126)..(1523)

<400> 1

gtcgacgttg caggetgagt catcactaga gagggggaag ggcagcagca gcagagaatc 60

caaaccctaa agctgatatc acaaagtacc atttctccaa gttggggggt cagaggggag 120

tcatac atg agc gat gtt acc att gtg aaa gaa ggt tgg gtt cag aag agg 170

Met Ser Asp Val Thr Ile Val Lys Glu Gly Trp Val Gln Lys Arg

1

5

10

15

gga gaa tat ata aaa aac tgg agg cca aga tac ttc ctt ttg aag aca 218

Gly Glu Tyr Ile Lys Asn Trp Arg Pro Arg Tyr Phe Leu Leu Lys Thr

20

25

30

gat ggc tca ttc ata gga tat aaa gag aaa cct caa gat gtg gat tta 266

Asp Gly Ser Phe Ile Gly Tyr Lys Glu Lys Pro Gln Asp Val Asp Leu

35

40

45

cct tat ccc ctc aac aac ttt tca gtg gca aaa tgc cag tta atg aaa 314

Pro Tyr Pro Leu Asn Asn Phe Ser Val Ala Lys Cys Gln Leu Met Lys

50

55

60

aca gaa cga cca aag cca aac aca ttt ata atc aga tgt ctc cag tgg 362

Thr Glu Arg Pro Lys Pro Asn Thr Phe Ile Ile Arg Cys Leu Gln Trp

65

70

75

act act gtt ata gag aga aca ttt cat gta gat act cca gag gaa agg 410

Thr Thr Val Ile Glu Arg Thr Phe His Val Asp Thr Pro Glu Glu Arg

80

85

90

95

gaa gaa tgg aca gaa gct atc cag gct gta gca gac aga ctg cag agg 458

Glu Glu Trp Thr Glu Ala Ile Gln Ala Val Ala Asp Arg Leu Gln Arg

10

20

30

40

100	105	110	
caa gaa gag gag aga atg aat tgt agt cca act tca caa att gat aat			506
Gln Glu Glu Glu Arg Met Asn Cys Ser Pro Thr Ser Gln Ile Asp Asn			
115	120	125	
ata gga gag gaa gag atg gat gcc tct aca acc cat cat aaa aga aag			554
Ile Gly Glu Glu Glu Met Asp Ala Ser Thr Thr His His Lys Arg Lys			
130	135	140	
aca atg aat gat ttt gac tat ttg aaa cta cta ggt aaa ggc act ttt			602
Thr Met Asn Asp Phe Asp Tyr Leu Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Phe			
145	150	155	
ggg aaa gtt att ttg gtt cga gag aag gca agt gga aaa tac tat gct			650
Gly Lys Val Ile Leu Val Arg Glu Lys Ala Ser Gly Lys Tyr Tyr Ala			
160	165	170	175
atg aag att ctg aag aaa gaa gtc att att gca aag gat gaa gtg gca			698
Met Lys Ile Leu Lys Lys Glu Val Ile Ile Ala Lys Asp Glu Val Ala			
180	185	190	
cac act cta act gaa agc aga gta tta aag aac act aga cat ccc ttt			746
His Thr Leu Thr Glu Ser Arg Val Leu Lys Asn Thr Arg His Pro Phe			
195	200	205	
tta aca tcc ttg aaa tat tcc ttc cag aca aaa gac cgt ttg tgt ttt			794
Leu Thr Ser Leu Lys Tyr Ser Phe Gln Thr Lys Asp Arg Leu Cys Phe			
210	215	220	
gtg atg gaa tat gtt aat ggg ggc gag ctg ttt ttc cat ttg tct aga			842
Val Met Glu Tyr Val Asn Gly Gly Glu Leu Phe Phe His Leu Ser Arg			
225	230	235	
gag cgg gtg ttc tct gag gac cgc aca cgt ttc tat ggt gca gaa att			890
Glu Arg Val Phe Ser Glu Asp Arg Thr Arg Phe Tyr Gly Ala Glu Ile			
240	245	250	255
gtc tct gcc ttg gac tat cta cat tcc gga aag att gtg tac cgt gat			938
Val Ser Ala Leu Asp Tyr Leu His Ser Gly Lys Ile Val Tyr Arg Asp			
260	265	270	
ctc aag ttg gag aat cta atg ctg gac aaa gat ggc cac ata aaa att			986
Leu Lys Leu Asn Leu Met Leu Asp Lys Asp Gly His Ile Lys Ile			
275	280	285	
aca gat ttt gga ctt tgc aaa gaa ggg atc aca gat gca gcc acc atg			1034
Thr Asp Phe Gly Leu Cys Lys Glu Gly Ile Thr Asp Ala Ala Thr Met			
290	295	300	
aag aca ttc tgt ggc act cca gaa tat ctg gca cca gag gtg tta gaa			1082
Lys Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Glu			
305	310	315	
gat aat gac tat ggc cga gca gta gac tgg tgg ggc cta ggg gtt gtc			1130
Asp Asn Asp Tyr Gly Arg Ala Val Asp Trp Trp Gly Leu Gly Val Val			
320	325	330	335
atg tat gaa atg atg tgt ggg agg tta cct ttc tac aac cag gac cat			1178
Met Tyr Glu Met Met Cys Gly Arg Leu Pro Phe Tyr Asn Gln Asp His			
340	345	350	

10

20

30

40

gag aaa ctt ttt gaa tta ata tta atg gaa gac att aaa ttt cct cga 1226
 Glu Lys Leu Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu Asp Ile Lys Phe Pro Arg
 355 360 365
 aca ctc tct tca gat gca aaa tca ttg ctt tca ggg ctc ttg ata aag 1274
 Thr Leu Ser Ser Asp Ala Lys Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu Ile Lys
 370 375 380
 gat cca aat aaa cgc ctt ggt gga gga cca gat gat gca aaa gaa att 1322
 Asp Pro Asn Lys Arg Leu Gly Gly Gly Pro Asp Asp Ala Lys Glu Ile
 385 390 395
 atg aga cac agt ttc ttc tct gga gta aac tgg caa gat gta tat gat 1370
 Met Arg His Ser Phe Phe Ser Gly Val Asn Trp Gln Asp Val Tyr Asp
 400 405 410 415
 aaa aag ctt gta cct cct ttt aaa cct caa gta aca tct gag aca gat 1418
 Lys Lys Leu Val Pro Pro Phe Lys Pro Gln Val Thr Ser Glu Thr Asp
 420 425 430
 act aga tat ttt gat gaa gaa ttt aca gct cag act att aca ata aca 1466
 Thr Arg Tyr Phe Asp Glu Glu Phe Thr Ala Gln Thr Ile Thr Ile Thr
 435 440 445
 cca cct gaa aaa tgt cag caa tca gat tgt ggc atg ctg ggt aac tgg 1514
 Pro Pro Glu Lys Cys Gln Gln Ser Asp Cys Gly Met Leu Gly Asn Trp
 450 455 460
 aaa aaa taa taaaaagtaa gtttcaatag ctataaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1570
 Lys Lys
 465

10

20

<210> 2
 <211> 465
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Ser Asp Val Thr Ile Val Lys Glu Gly Trp Val Gln Lys Arg Gly
 1 5 10 15
 Glu Tyr Ile Lys Asn Trp Arg Pro Arg Tyr Phe Leu Leu Lys Thr Asp
 20 25 30
 Gly Ser Phe Ile Gly Tyr Lys Glu Lys Pro Gln Asp Val Asp Leu Pro
 35 40 45
 Tyr Pro Leu Asn Asn Phe Ser Val Ala Lys Cys Gln Leu Met Lys Thr
 50 55 60
 Glu Arg Pro Lys Pro Asn Thr Phe Ile Ile Arg Cys Leu Gln Trp Thr
 65 70 75 80
 Thr Val Ile Glu Arg Thr Phe His Val Asp Thr Pro Glu Glu Arg Glu
 85 90 95
 Glu Trp Thr Glu Ala Ile Gln Ala Val Ala Asp Arg Leu Gln Arg Gln
 100 105 110
 Glu Glu Glu Arg Met Asn Cys Ser Pro Thr Ser Gln Ile Asp Asn Ile
 115 120 125
 Gly Glu Glu Glu Met Asp Ala Ser Thr Thr His His Lys Arg Lys Thr
 130 135 140
 Met Asn Asp Phe Asp Tyr Leu Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Phe Gly
 145 150 155 160
 Lys Val Ile Leu Val Arg Glu Lys Ala Ser Gly Lys Tyr Tyr Ala Met

30

165 170 175
 Lys Ile Leu Lys Lys Glu Val Ile Ile Ala Lys Asp Glu Val Ala His
 180 185 190
 Thr Leu Thr Glu Ser Arg Val Leu Lys Asn Thr Arg His Pro Phe Leu
 195 200 205
 Thr Ser Leu Lys Tyr Ser Phe Gln Thr Lys Asp Arg Leu Cys Phe Val
 210 215 220
 Met Glu Tyr Val Asn Gly Gly Glu Leu Phe Phe His Leu Ser Arg Glu
 225 230 235 240
 Arg Val Phe Ser Glu Asp Arg Thr Arg Phe Tyr Gly Ala Glu Ile Val
 245 250 255
 Ser Ala Leu Asp Tyr Leu His Ser Gly Lys Ile Val Tyr Arg Asp Leu
 260 265 270
 Lys Leu Glu Asn Leu Met Leu Asp Lys Asp Gly His Ile Lys Ile Thr
 275 280 285
 Asp Phe Gly Leu Cys Lys Glu Gly Ile Thr Asp Ala Thr Met Lys
 290 295 300
 Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Glu Asp
 305 310 315 320
 Asn Asp Tyr Gly Arg Ala Val Asp Trp Trp Gly Leu Gly Val Val Met
 325 330 335
 Tyr Glu Met Met Cys Gly Arg Leu Pro Phe Tyr Asn Gln Asp His Glu
 340 345 350
 Lys Leu Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu Asp Ile Lys Phe Pro Arg Thr
 355 360 365
 Leu Ser Ser Asp Ala Lys Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu Ile Lys Asp
 370 375 380
 Pro Asn Lys Arg Leu Gly Gly Gly Pro Asp Asp Ala Lys Glu Ile Met
 385 390 395 400
 Arg His Ser Phe Phe Ser Gly Val Asn Trp Gln Asp Val Tyr Asp Lys
 405 410 415
 Lys Leu Val Pro Pro Phe Lys Pro Gln Val Thr Ser Glu Thr Asp Thr
 420 425 430
 Arg Tyr Phe Asp Glu Glu Phe Thr Ala Gln Thr Ile Thr Ile Thr Pro
 435 440 445
 Pro Glu Lys Cys Gln Gln Ser Asp Cys Gly Met Leu Gly Asn Trp Lys
 450 455 460
 Lys
 465

10

20

<210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

30

<220>

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<400> 3
 tccaaaccct aaagctgata tcac

24

<210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<400> 4

cctggatagc ttctgtccat tc

22

<210> 5

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<400> 5

atgagcgatg ttaccattgt gaaagaaggt tgggttcaga agaggggaga atatataaaa 60
aactggaggc caag 74

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<400> 6

ttatTTTTTtc caggtaccca gcatgcc

27

<210> 7

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

30

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<400> 7

gcgcgcgaat tcccaccatg ggtagcaaca agagcaagcc caaggatgcc agccagcggc 60
gccgcagcag cgatgttacc attgtgaaag 90

<210> 8

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

40

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<400> 8

gcgcgcgggc ccttaggcgt agtcggggac gtcgtacggg tattttttcc agttaccag 60
catgcc 66

<210> 9

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

10

<400> 9

cggggtacca ccatgggtag caacaagagc aagccaagg atgccagcca g 51

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

20

<400> 10

ccggaattct taggcgtagt cggggacgtc 30

<210> 11

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<400> 11

aagggccgcc agtgtgctgg agagatgagc gatgccttc 39

30

<210> 12

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<400> 12

ccctctagat gtcattctg catttgatcc agctg 35

40

<210> 13
 <211> 480
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>

<400> 13

```

Met Asn Glu Val Ser Val Ile Lys Glu Gly Trp Leu His Lys Arg Gly
 1           5           10          15

Glu Tyr Ile Lys Thr Trp Arg Pro Arg Tyr Phe Leu Leu Lys Ser Asp
      20           25           30

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

Leu Pro Pro Leu Asn Asn Phe Ser Val Ala Glu Cys Gln Leu Met Lys
      50           55           60

Thr Glu Arg Pro Arg Pro Asn Thr Phe Val Ile Arg Cys Leu Gln Trp
      65           70           75           80

Thr Thr Val Ile Glu Arg Thr Phe His Val Asp Ser Pro Asp Glu Arg
      85           90           95

Glu Glu Trp Met Arg Ala Ile Gln Met Val Ala Asn Ser Leu Lys Gln
      100          105          110

Arg Ala Pro Gly Glu Asp Pro Met Asp Tyr Lys Cys Gly Ser Pro Ser
      115          120          125

Asp Ser Ser Thr Thr Glu Glu Met Glu Val Ala Val Ser Lys Ala Arg
      130          135          140

Ala Lys Val Thr Met Asn Asp Phe Asp Tyr Leu Lys Leu Leu Gly Lys
      145          150          155          160

Gly Thr Phe Gly Lys Val Ile Leu Val Arg Glu Lys Ala Thr Gly Arg
      165          170          175

Tyr Tyr Ala Met Lys Ile Leu Arg Lys Glu Val Ile Ile Ala Lys Asp
      180          185          190

Glu Val Ala His Thr Val Thr Glu Ser Arg Val Leu Gln Asn Thr Arg
      195          200          205

His Pro Phe Leu Thr Ala Leu Lys Tyr Ala Phe Gln Thr His Asp Arg
      210          215          220

Leu Cys Phe Val Met Glu Tyr Ala Asn Gly Gly Glu Leu Phe Phe His
      225          230          235          240

Leu Ser Arg Glu Arg Val Phe Thr Glu Glu Arg Ala Arg Phe Tyr Gly
      245          250          255

Ala Glu Ile Val Ser Ala Leu Glu Tyr Leu His Ser Arg Asp Val Val
      260          265          270

```

10

20

30

Tyr Arg Asp Ile Lys Leu Glu Asn Leu Met Leu Asp Lys Asp Gly His
 275 280 285
 Ile Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Cys Lys Glu Gly Ile Ser Asp Gly
 290 295 300
 Ala Thr Met Lys Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu
 305 310 315 320
 Val Leu Glu Asp Asn Asp Tyr Gly Arg Ala Val Asp Trp Trp Gly Leu
 325 330 335
 Gly Val Val Met Tyr Glu Met Met Cys Gly Arg Leu Pro Phe Tyr Asn
 340 345 350
 Gln Asp His Glu Arg Leu Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu Glu Ile Arg
 355 360 365
 Phe Pro Arg Thr Leu Ser Pro Glu Ala Lys Ser Leu Leu Ala Gly Leu
 370 375 380
 Leu Lys Lys Asp Pro Lys Gln Arg Leu Gly Gly Gly Pro Ser Asp Ala
 385 390 395 400
 Lys Glu Val Met Glu His Arg Phe Phe Leu Ser Ile Asn Trp Gln Asp
 405 410 415
 Val Val Gln Lys Lys Leu Leu Pro Pro Phe Lys Pro Gln Val Thr Ser
 420 425 430
 Glu Val Asp Thr Arg Tyr Phe Asp Asp Glu Phe Thr Ala Gln Ser Ile
 435 440 445
 Thr Ile Thr Pro Pro Asp Arg Tyr Asp Ser Leu Gly Leu Leu Glu Leu
 450 455 460
 Asp Gln Arg Thr His Phe Pro Gln Phe Ser Tyr Ser Ala Ser Ile Arg
 465 470 475 480

10

20

<210> 14
 <211> 480
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 14
 Met Ser Asp Val Ala Ile Val Lys Glu Gly Trp Leu His Lys Arg Gly
 1 5 10 15
 Glu Tyr Ile Lys Thr Trp Arg Pro Arg Tyr Phe Leu Leu Lys Asn Asp
 20 25 30
 Gly Thr Phe Ile Gly Tyr Lys Glu Arg Pro Gln Asp Val Asp Gln Arg
 35 40 45
 Glu Ala Pro Leu Asn Asn Phe Ser Val Ala Gln Cys Gln Leu Met Lys
 50 55 60

Thr Glu Arg Pro Arg Pro Asn Thr Phe Ile Ile Arg Cys Leu Gln Trp
 65 70 75 80
 Thr Thr Val Ile Glu Arg Thr Phe His Val Glu Thr Pro Glu Glu Arg
 85 90 95
 Glu Glu Trp Thr Thr Ala Ile Gln Thr Val Ala Asp Gly Leu Lys Lys
 100 105 110
 Gln Glu Glu Glu Glu Met Asp Phe Arg Ser Gly Ser Pro Ser Asp Asn
 115 120 125
 Ser Gly Ala Glu Glu Met Glu Val Ser Leu Ala Lys Pro Lys His Arg
 130 135 140
 Val Thr Met Asn Glu Phe Glu Tyr Leu Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr
 145 150 155 160
 Phe Gly Lys Val Ile Leu Val Lys Glu Lys Ala Thr Gly Arg Tyr Tyr
 165 170 175
 Ala Met Lys Ile Leu Lys Lys Glu Val Ile Val Ala Lys Asp Glu Val
 180 185 190
 Ala His Thr Leu Thr Glu Asn Arg Val Leu Gln Asn Ser Arg His Pro
 195 200 205
 Phe Leu Thr Ala Leu Lys Tyr Ser Phe Gln Thr His Asp Arg Leu Cys
 210 215 220
 Phe Val Met Glu Tyr Ala Asn Gly Gly Glu Leu Phe Phe His Leu Ser
 225 230 235 240
 Arg Glu Arg Val Phe Ser Glu Asp Arg Ala Arg Phe Tyr Gly Ala Glu
 245 250 255
 Ile Val Ser Ala Leu Asp Tyr Leu His Ser Glu Lys Asn Val Val Tyr
 260 265 270
 Arg Asp Leu Lys Leu Glu Asn Leu Met Leu Asp Lys Asp Gly His Ile
 275 280 285
 Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Cys Lys Glu Gly Ile Lys Asp Gly Ala
 290 295 300
 Thr Met Lys Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val
 305 310 315 320
 Leu Glu Asp Asn Asp Tyr Gly Arg Ala Val Asp Trp Trp Gly Leu Gly
 325 330 335
 Val Val Met Tyr Glu Met Met Cys Gly Arg Leu Pro Phe Tyr Asn Gln
 340 345 350
 Asp His Glu Lys Leu Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu Glu Ile Arg Phe
 355 360 365
 Pro Arg Thr Leu Gly Pro Glu Ala Lys Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu
 370 375 380
 Lys Lys Asp Pro Lys Gln Arg Leu Gly Gly Gly Ser Glu Asp Ala Lys

10

20

30

40

385 390 395 400

Glu Ile Met Gln His Arg Phe Phe Ala Gly Ile Val Trp Gln His Val
 405 410 415

Tyr Glu Lys Lys Leu Ser Pro Pro Phe Lys Pro Gln Val Thr Ser Glu
 420 425 430

Thr Asp Thr Arg Tyr Phe Asp Glu Glu Phe Thr Ala Gln Met Ile Thr
 435 440 445

Ile Thr Pro Pro Asp Gln Asp Asp Ser Met Glu Cys Val Asp Ser Glu
 450 455 460

Arg Arg Pro His Phe Pro Gln Phe Ser Tyr Ser Ala Ser Ser Thr Ala
 465 470 475 480

10

<210> 15
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

20

<400> 15
 tttcggaggc tctagtttgg tg

22

<210> 16
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<400> 16
 cccaacttgg agaaatggta c

21

30

<210> 17
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<400> 17
 Met Ser Asp Val Thr Ile Val Lys Glu Asp Trp Val Gln Lys Arg Gly
 1 5 10 15

Glu Tyr Ile Lys Asn Trp Arg Pro Arg Tyr Phe Leu Leu Lys Thr Asp
 20 25 30
 Gly Ser Phe Ile Gly Tyr Lys Glu Lys Pro Gln Asp Val Asp Leu Pro
 35 40 45
 Tyr Pro Leu Asn Asn Phe Ser Val Ala Lys Cys Gln Leu Met Lys Thr
 50 55 60
 Glu Arg Pro Lys Pro Asn Thr Phe Ile Ile Arg Cys Leu Gln Trp Thr
 65 70 75 80
 Thr Val Ile Glu Arg Thr Phe His Val Asp Thr Pro Glu Glu Arg Glu
 85 90 95
 Glu Trp Thr Glu Ala Ile Gln Ala Val Ala Asp Arg Leu Gln Arg Gln
 100 105 110
 Glu Glu Glu Arg Met Asn Cys Ser Pro Thr Ser Gln Ile Asp Asn Ile
 115 120 125
 Gly Glu Glu Glu Met Asp Ala Ser Thr Thr His His Lys Arg Lys Thr
 130 135 140
 Met Asn Asp Phe Asp Tyr Leu Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Phe Gly
 145 150 155 160
 Lys Val Ile Leu Val Arg Glu Lys Ala Ser Gly Lys Tyr Tyr Ala Met
 165 170 175
 Lys Ile Leu Lys Lys Glu Val Ile Ile Ala Lys Asp Glu Val Ala His
 180 185 190
 Thr Leu Thr Glu Ser Arg Val Leu Lys Asn Thr Arg His Pro Phe Leu
 195 200 205
 Thr Ser Leu Lys Tyr Ser Phe Gln Thr Lys Asp Arg Leu Cys Phe Val
 210 215 220
 Met Glu Tyr Val Asn Gly Gly Glu Leu Phe Phe His Leu Ser Arg Glu
 225 230 235 240
 Arg Val Phe Ser Glu Asp Arg Thr Arg Phe Tyr Gly Ala Glu Ile Val
 245 250 255
 Ser Ala Leu Asp Tyr Leu His Ser Gly Lys Ile Val Tyr Arg Asp Leu
 260 265 270
 Lys Leu Glu Asn Leu Met Leu Asp Lys Asp Gly His Ile Lys Ile Thr
 275 280 285
 Asp Phe Gly Leu Cys Lys Glu Gly Ile Thr Asp Ala Ala Thr Met Lys
 290 295 300
 Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Glu Asp
 305 310 315 320
 Asn Asp Tyr Gly Arg Ala Val Asp Trp Trp Gly Leu Gly Val Val Met
 325 330 335
 Tyr Glu Met Met Cys Gly Arg Leu Pro Phe Tyr Asn Gln Asp His Glu

10

20

30

40

340 345 350

Lys Leu Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu Asp Ile Lys Phe Pro Arg Thr
355 360 365

Leu Ser Ser Asp Ala Lys Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu Ile Lys Asp
370 375 380

Pro Asn Lys Arg Leu Gly Gly Gly Pro Asp Asp Pro Lys Glu Ile Met
385 390 395 400

Arg His Ser Phe Phe Ser Gly Val Asn Trp Gln Asp Val Tyr Asp Lys
405 410 415

Lys Leu Val Pro Pro Phe Lys Pro Gln Val Thr Ser Glu Thr Asp Thr
420 425 430

Arg Tyr Phe Asp Glu Glu Phe Thr Ala Gln Thr Ile Thr Ile Thr Pro
435 440 445

Pro Glu Lys Cys Pro Leu
450

10

【図 1 A】

1 50
h-akt3 MSDVIVKEG WVKRGEYIK NWRPRYFLK TDGSFIGYKE KPQDVDPYP
rat-akt3 MSDVTIVKED WVKRGEYIK NWRPRYFLK TDGSFIGYKE KPQDVDPYP

51 100
h-akt3 LNNFVSAQC QLMKTERPAP NTFIIRCLQW TVIERTFHV TPEEREWTE
rat-akt3 LNNFVSAQC QLMKTERPAP NTFIIRCLQW TVIERTFHV TPEEREWTE

101 150
h-akt3 AIQAVADRLQ RQEEERMNCS PTSQIDNIGE EENDASTTHH KRKTMNDFDY
rat-akt3 AIQAVADRLQ RQEEERMNCS PTSQIDNIGE EENDASTTHH KRKTMNDFDY

151 200
h-akt3 LKLLGKGTFG KVLVREKAS GKYAMKILK KEVIAKDEV AHTLTESRVL
rat-akt3 LKLLGKGTFG KVLVREKAS GKYAMKILK KEVIAKDEV AHTLTESRVL

201 250
h-akt3 KNTRHPFLTS LKYSFQTKDR LCFVMEYVNG GELFFHLSRE RVFSEDRTRF
rat-akt3 KNTRHPFLTS LKYSFQTKDR LCFVMEYVNG GELFFHLSRE RVFSEDRTRF

251 300
h-akt3 YGAEIVSALD YLHSGKIVYR DLKLENLMLD KDGHIKITDF GLCKEGITDA
rat-akt3 YGAEIVSALD YLHSGKIVYR DLKLENLMLD KDGHIKITDF GLCKEGITDA

301 350
h-akt3 ATKMTFCGTF EYLAPEVLED NDYGRAVDNW GLGVVMEYM CGRLPFYVQD
rat-akt3 ATKMTFCGTF EYLAPEVLED NDYGRAVDNW GLGVVMEYM CGRLPFYVQD

351 400
h-akt3 HEKLFELILM EDIKFPRTLS SDAKSLLSGL LIKDPNKRGL GGPDDAKEIM
rat-akt3 HEKLFELILM EDIKFPRTLS SDAKSLLSGL LIKDPNKRGL GGPDDAKEIM

401 450
h-akt3 RHSFTSGVNW QDVYDKLVP PFKQVTSSET DTRYFDEEFT AQTTITTPPE
rat-akt3 RHSFTSGVNW QDVYDKLVP PFKQVTSSET DTRYFDEEFT AQTTITTPPE

451 465
h-akt3 KCOQSDCGNL GNWKK
rat-akt3 KCPL

【図 1 B】

1 50
h-akt1 MSDVAIVKEG WVKRGEYIK TWRPRYFLK NDGTFIGYKE RPQDQDQREA
h-akt2 MNEVSVIKEG WVKRGEYIK TWRPRYFLK SDGSFIGYKE RPEAPDQTLF
h-akt3 MSDVIVKEG WVKRGEYIK NWRPRYFLK TDGSFIGYKE KPQDVDPYP

51 100
h-akt1 PLNNFVSAQC QLMKTERPAP NTFIIRCLQW TVIERTFHV TPEEREWTE
h-akt2 PLNNFVSAQC QLMKTERPAP NTFIIRCLQW TVIERTFHV DSPDEREWM
h-akt3 PLNNFVSAQC QLMKTERPAP NTFIIRCLQW TVIERTFHV TPEEREWTE

101 150
h-akt1 TAIQTVDGL KQOE--EEM DFRSGSPSDN SGAEMEVS LAKPKHRVTN
h-akt2 RAIQMVANS LKQAPGEDPM DYKCGSPSDS STTEMEVAV SKARAKVTN
h-akt3 EAIQAVADRL QROE--EEM NCSPTSQIDN IGEEEMDAST THHKK--TNN

151 200
h-akt1 EFYELKLLGK GTFGKVLVR EKATGRYAM KILKKEVIA KDEVAHTLVE
h-akt2 DFDYLLKLLGK GTFGKVLVR EKATGRYAM KILKKEVIA KDEVAHTLVE
h-akt3 DFDYLLKLLGK GTFGKVLVR EKATGRYAM KILKKEVIA KDEVAHTLVE

201 250
h-akt1 NRVLQNSRHP FLTALKYSFQ THDRLCFVME YANGGELFFH LSREVFSESD
h-akt2 SVRLQNTNRP FLTALKYAFQ THDRLCFVME YANGGELFFH LSREVFSEE
h-akt3 SVRLQNTNRP FLTALKYSFQ THDRLCFVME YVNGGELFFH LSREVFSESD

251 300
h-akt1 RARFYGAEIV SALDYHSEK NVVYRDLKLE NLMLDKDGH KIDTDFGLCKE
h-akt2 RARFYGAEIV SALEYLHS-R DVVYRDLKLE NLMLDKDGH KIDTDFGLCKE
h-akt3 RTRFYGAEIV SALDYHSEK -IVYRDLKLE NLMLDKDGH KIDTDFGLCKE

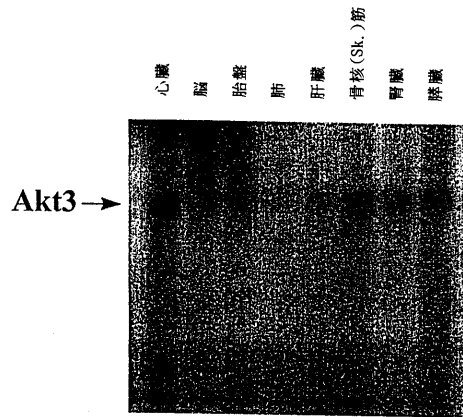
301 350
h-akt1 GIKDGATHKT FCGTPEYLAP EVLEDNDYGR AVDNWGLGVV MYEMMCGRLP
h-akt2 GISDGATHKT FCGTPEYLAP EVLEDNDYGR AVDNWGLGVV MYEMMCGRLP
h-akt3 GITDAATHKT FCGTPEYLAP EVLEDNDYGR AVDNWGLGVV MYEMMCGRLP

351 400
h-akt1 FYNQDHERLF ELILMEIRF PRTLSPKAS LLSGLLKKDP KQRLGGGSED
h-akt2 FYNQDHERLF ELILMEIRF PRTLSPKAS LLAGLLKKDP KQRLGGGSPD
h-akt3 FYNQDHERLF ELILMEIRF PRTLSSDAKS LLSGLLKKDP KQRLGGGSPD

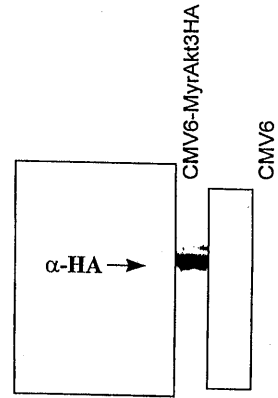
401 450
h-akt1 AKEIMRHFF AGIVWQHVY KKLSPFFKQ VTSSETDTRYF DEEFTAQMIT
h-akt2 AKEIMRHFF LSINWQDVVQ KKLSPFFKQ VTSSETDTRYF DDEFTAQMIT
h-akt3 AKEIMRHFF SGVNWQDVYD KKLSPFFKQ VTSSETDTRYF DEEFTAQMIT

451 482
h-akt1 ITPPDQDQSN ECVDSERRPH FPQFSYASS TA
h-akt2 ITPPDQDQSN GLLDQORTH FPQFSYASS R
h-akt3 ITPEKCOQS DCGNLGNWKK

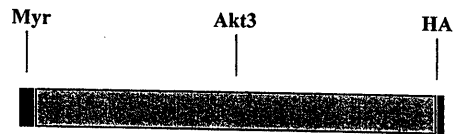
【図 2】



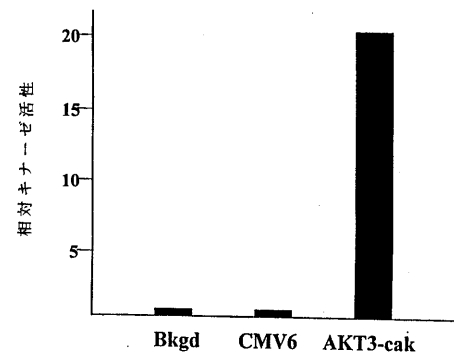
【図 3 B】



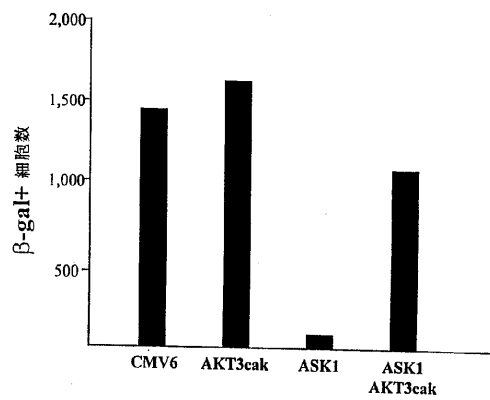
【図 3 A】



【図 3 C】



【図 4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	9/12	(2006.01)	C 1 2 N 9/12
C 0 7 K	16/40	(2006.01)	C 0 7 K 16/40
A 6 1 K	9/127	(2006.01)	A 6 1 K 9/127
A 6 1 K	47/36	(2006.01)	A 6 1 K 47/36
A 6 1 K	47/42	(2006.01)	A 6 1 K 47/42
A 6 1 K	47/46	(2006.01)	A 6 1 K 47/46
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00
C 1 2 N	7/00	(2006.01)	C 1 2 N 7/00
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02

- (72)発明者 マーコ・エフ・パニョーニ
アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 4 0 3 . ノリスタウン . ステリジェーアストリート 2 0 2 9
- (72)発明者 ケネス・エル・クラーク
アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 5 2 5 . ギルバーツビル . ロバーツロード 1 2 3 5
- (72)発明者 ユーリ・ディー・イヴァーシュチェンコ
アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 4 0 3 . ノリスタウン . ハムプトンコート 1 1

審査官 千葉 直紀

- (56)参考文献 Biochem.Biophys.Res.Commun , 1 9 9 5 年 , 216(2) , 526-534
Cell Regul. , 1 9 9 1 年 , 2(12) , 1001-1009
Proc.Natl.Acad.Sci.USA , 1 9 9 1 年 , 88(10) , 4171-4175
Cell , 1 9 9 7 年 , 88 , 435-437
Genes Dev. , 1 9 9 7 年 , 11 , 701-713

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C12N 15/00-15/90
PubMed
JSTPlus(JDreamII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq