(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2007-508036
(P2007-508036A)
(43)公表日　平成19年4月5日(2007.4.5)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
A61K 48/00	(2006.01)	A61K	48/00		4B065
A61P 31/14	(2006.01)	A61P	31/14		4C084
A61P 31/20	(2006.01)	A61P	31/20		4C087
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 32 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2006-535513 (P2006-535513)
(86)(22)出願日　平成16年9月24日 (2004.9.24)
(85)翻訳文提出日　平成18年4月5日 (2006.4.5)
(86)国際出願番号　PCT/US2004/031477
(87)国際公開番号　WO2005/040188
(87)国際公開日　平成17年5月6日 (2005.5.6)
(31)優先権主張番号　60/511,812
(32)優先日　平成15年10月15日 (2003.10.15)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　504260117
セル・ジェネシス・インコーポレイテッド
Ｃｅｌｌ　Ｇｅｎｅｓｙｓ，　Ｉｎｃ．
アメリカ合衆国９４０８０カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ、フォーブス・ブールバード５００番
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】肝細胞癌特異的プロモーターおよびその使用

(57)【要約】
肝癌（特に肝細胞癌）特異的プロモーター配列およびアデノウイルスビヒクルが提供される。特異的な制限された細胞型においてのみ活性である転写因子に依存する転写開始調節を提供することによって、ウイルス複製が標的細胞に制限される。改変されたアデノウイルスは、新形成を処置するために新たな遺伝能力を導入するための（特に細胞傷害性に関連した）ビヒクルとして用いられ得る。原発性肝癌転写調節エレメント（ＴＲＥ）配列であって、該ＴＲＥは、肝癌細胞に特異的である、ＴＲＥ配列が提供される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
原発性肝癌転写調節エレメント（ＴＲＥ）配列であって、該ＴＲＥは、肝癌細胞に特異的である、ＴＲＥ配列。
【請求項２】
前記配列がヒトＴＲＥ配列である、請求項１に記載のＴＲＥ配列。
【請求項３】
前記配列が、ＣＲＧ－Ｌ２遺伝子由来である、請求項２に記載のＴＲＥ配列。
【請求項４】
前記ＴＲＥが、配列番号１として本明細書中に提示される、ＣＲＧ－Ｌ２遺伝子についての翻訳開始コドンの上流の配列に由来する、請求項３に記載のＴＲＥ配列。
【請求項５】
前記ＴＲＥ配列が、配列番号１の残基１１９～８０９に示される配列またはその機能的フラグメントを有する、請求項３に記載のＴＲＥ配列。
【請求項６】
前記肝癌が、肝細胞癌である、請求項１に記載のＴＲＥ配列。
【請求項７】
複製能力のあるアデノウイルスベクターであって、肝癌細胞特異的ＴＲＥの転写制御下に、複製に必須のアデノウイルス遺伝子を含む、アデノウイルスベクター。
【請求項８】
前記肝細胞癌特異的ＴＲＥが、ＣＲＧ－Ｌ２遺伝子の翻訳開始コドンに対して５’側の配列に由来する配列を含む、請求項７に記載のアデノウイルスベクター。
【請求項９】
前記原発性肝癌特異的ＴＲＥが、配列番号１として本明細書中に提示される、ＣＲＧ－Ｌ２遺伝子についての翻訳開始コドンの上流の、０．７ｋｂ配列に由来する、請求項８に記載のアデノウイルスベクター。
【請求項１０】
前記肝癌が肝細胞癌である、請求項７に記載のアデノウイルスベクター。
【請求項１１】
前記肝細胞癌細胞特異的ＴＲＥが、ヒトプロモーターまたはヒトエンハンサーを含む、請求項１０に記載のアデノウイルスベクター。
【請求項１２】
前記肝細胞癌細胞特異的ＴＲＥが、第２のヒト転写調節因子応答性エレメントをさらに含む、請求項１０に記載のアデノウイルスベクター。
【請求項１３】
前記肝細胞癌細胞特異的ＴＲＥが、プロモーターおよびエンハンサーを含む、請求項１０に記載のアデノウイルスベクター。
【請求項１４】
前記肝細胞癌細胞特異的ＴＲＥが、２以上のエンハンサーを含む、請求項１０に記載のアデノウイルスベクター。
【請求項１５】
前記アデノウイルスベクターが、前記肝細胞癌特異的ＴＲＥの転写制御下で共転写される第１アデノウイルス遺伝子および第２アデノウイルス遺伝子を含む、請求項１０に記載のアデノウイルスベクター。
【請求項１６】
前記第２遺伝子が、ＩＲＥＳの翻訳制御下にある、請求項１５に記載のアデノウイルスベクター。
【請求項１７】
前記複製に必須のアデノウイルス遺伝子が、Ｅ１ＡまたはＥ１Ｂである、請求項７に記載のアデノウイルスベクター。

【請求項１８】
Ｅ１ＡまたはＥ１Ｂが、その内因性プロモーターにおいて変異を有するかまたは該内因性プロモーターを欠失している、請求項１７に記載のアデノウイルスベクター。
【請求項１９】
Ｅ１Ｂが、１９ｋＤａ領域の欠失を有する、請求項１６に記載のアデノウイルスベクター。
【請求項２０】
組成物であって、請求項７に記載の複製能力のあるアデノウイルスベクターおよび薬学的に受容可能な賦形剤を含む、組成物。
【請求項２１】
請求項７に記載のアデノウイルスベクターを含む、宿主細胞。
【発明の詳細な説明】
【背景技術】
【０００１】
（発明の背景）
肝臓の癌は、米国においては稀な悪性疾患であるが、アジアおよびアフリカの一部では、最も一般的な悪性疾患の１つである。発生数が最も多い地域は東アジアおよびサハラ以南のアフリカであり、ＨＣＣは、これらの地域における癌による死亡の優勢な原因であり得る。発生数は西洋諸国では非常に少ないが、これらの集団における民族部分集団は、慢性Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）感染の高い有病率に起因して、非常に危険性が高い可能性がある。ＨＣＣを有する患者の生存時間は短いので、発生数および死亡率の数字はほぼ等しい。米国では、過去２０年にわたる肝癌についての５年生存率は、約５％のままである。
【０００２】
慢性ＨＢＶ感染または慢性ＨＣＶ感染と肝細胞癌との疫学的関連が充分に確立されている。慢性ウイルス肝炎を有する患者については、早期段階の肝細胞癌についてのスクリーニングにより、治癒処置ストラテジーの設定が許容され得、そして抗ウイルス処置により、肝細胞癌のその後の進展の危険性が低減し得る。確立された肝細胞癌を有する患者については、同時の慢性ウイルス性肝炎または肝硬変の存在は、進行および生存に影響をもたらし得、そして損なわれた肝機能に起因して処置選択肢が変更され得る。
【０００３】
肝細胞癌の発生数は年齢とともに増加し、発生数がピークの年齢は集団によっていくらか変動する。ＨＣＣはＨＢＶが風土病である地域の小児においてみられ、感染は主に誕生時または小児期早期に生じる。世界中の全ての集団では、ＨＣＣ発生数における強い男性優位性が存在する。これに関してのいくつかの可能な説明が提唱されており、この説明としては、ＨＢＶ保有者（ｃａｒｒｉａｇｅ）の割合が男性においてより高いこと、遺伝的感受性、アンドロゲンステロイド、より高い身体鉄貯蔵、および他の肝癌発生補因子（ｈｅｐａｔｏｃａｒｃｉｎｏｇｅｎｉｃ　ｃｏｆａｃｔｏｒ）（例えば、アルコール、アフラトキシン）へのより高い曝露が挙げられる。
【０００４】
慢性ＨＢＶ感染もまた存在する家族において主に、ＨＣＣの家族集積性が報告されている。しかし、いくつかの研究により、ＨＢＶ状態と独立した家族歴の効果が見出された。家族集積性は、ＨＢＶと主な遺伝子との相互作用によって説明され得る。家族集積性はまた、胚芽細胞腫について報告されており、胚芽細胞腫は、ＡＰＣ（大腸腺腫性ポリポーシス）遺伝子の生殖系列変異を保有する家族において生じる。
【０００５】
中国の特定の地域におけるＨＢＶ感染の高い有病率に起因して、肝細胞癌に関するスクリーングプログラムが、慢性ＨＢＶ感染を有する、３５歳を超えた成人について設定された。用いたスクリーニング試験は、６ヶ月ごとに実施した血清α－フェトプロテイン（ＡＦＰ）および肝臓超音波検査であった。３０％までの肝細胞癌がＡＦＰを分泌しないので

、ＡＦＰは、７０％の感度を有する。肝臓超音波検査は、２ｃｍ未満であるＨＣＣの検出に関して７０％までの感度を有するが、特異性が低い。しかし、ＡＦＰと超音波検査との組合せは、感度および特異性の両方を上昇させる。

【０００６】

肝癌患者についての予後は乏しい。転移性ＨＣＣまたは局所的に進行したＨＣＣを有する患者は通常、抗癌処置にほとんど応答しない。未処置の患者は通常３～４ヶ月で死亡する；処置した患者は、治療に応答した場合は、６～１８ヶ月生存し得る。長期生存は、非侵襲性癌について好首尾の肝一部切除後にときどき見られる。肝臓の正常な代謝機能および貯蔵機能が損なわれているので、患者は、栄養面および出血の合併症の危険性がある。進行した肝硬変を有する患者は一般に、腫瘍の程度とは独立して、脳障害、静脈瘤出血および敗血症のような合併症に屈する。

【０００７】

処置決定はまた、活動性肝炎または肝硬変の存在に基づく。ＨＣＣについての最も活性な化学療法剤であるドキソルビシンは、肝臓によって代謝されて排出される。ドキソルビシンについての薬物動態は、肝機能不全を有する患者について変更されて、毒性の増強をもたらし得る。孤立性ＨＣＣについての選り抜きの処置である肝臓切除は、もし肝臓貯蔵が肝炎または肝硬変によって損なわれると、肝不全をもたらし得る。切除不可能なＨＣＣを有する患者については、同所肝移植により、長期の生存がもたらされている。第Ｉ期または第ＩＩ期のＨＣＣを有する患者は、移植後、ＨＣＣを有さない肝硬変について移植された患者についての５年生存と匹敵する５年生存を有する。しかし、肝臓異種移植片の重篤なウイルス再感染の高い発生数に起因して、この生存優位性は、活動性ＨＢＶウイルス複製（ＨＢｅＡｇまたは高いレベルのＨＢＶ　ＤＮＡ）を有する患者において弱められる。ＨＣＶ感染を有する患者もまた移植後に高い再感染発生数を有するが、この疾患は無痛であり、最終的な肝硬変は何十年かは生じないかもしれない。

【０００８】

いくつかのウイルスが、遺伝子治療についてのビヒクルおよび抗癌剤の候補の両方として最近公表されている。これらのうちで、アデノウイルスは、上皮細胞において大きく増殖する、病原性が軽いヒトウイルスであり、多くのヒト癌の原因である。アデノウイルスは、腫瘍親和性特性が操作され得るウイルスとして出現した。例えば、特許文献１（米国特許第５，８４６，９４５号（Ｏｎｙｘ））；特許文献２（米国特許第５，８０１，０２９号（Ｏｎｙｘ））；特許文献３（米国特許第５，７４７，４６９号（Ｕｎｉｖ　Ｔｅｘａｓ））；特許文献４（ＰＣＴＵＳ１９９９／０８５９２（ＷＯ　９９／５９６０４；Ｏｎｙｘ））または特許文献５（ＰＣＴ／ＵＳ１９９８／０３５１４（ＷＯ　９８／３５５５４；Ｃａｎｊｉ））；特許文献６（ＰＣＴ／ＵＳ１９９７／２２０３６（ＷＯ　９８／２９５５５；Ｏｎｙｘ））を参照のこと。複製能力のあるアデノウイルスベクターは、腫瘍細胞において選択的に複製するように設計されている。局所（ｌｏｃａｌ）－局部（ｒｅｇｉｏｎａｌ）疾患および散在性疾患の両方に対するこれらのアデノウイルスの送達を改善すること、ならびにこのウイルスを改善して腫瘍内拡散を促進することは特に興味深い。

【０００９】

いくつかの実験的癌治療は、種々の局面のアデノウイルスまたはアデノウイルスベクターを利用する。例えば、特許文献１（米国特許第５，８４６，９４５号）；特許文献２（米国特許第５，８０１，０２９号）；特許文献４（ＰＣＴ／ＵＳ９９／０８５９２）；特許文献３（米国特許第５，７４７，４６９号）；特許文献５（ＰＣＴ／ＵＳ９８／０３５１４）；および特許文献６（ＰＣＴ／ＵＳ９７／２２０３６）を参照のこと。

【特許文献１】米国特許第５，８４６，９４５号明細書
【特許文献２】米国特許第５，８０１，０２９号明細書
【特許文献３】米国特許第５，７４７，４６９号明細書
【特許文献４】国際公開第９９／５９６０４号パンフレット
【特許文献５】国際公開第９８／３５５５４号パンフレット

【特許文献６】国際公開第９８／２９５５５号パンフレット
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【００１０】
複製能力のあるアデノウイルスは、局所癌および散在性癌の処置について選択的標的化および増幅を達成し得るが、アデノウイルスベクター自体およびそれらの使用方法の両方において改善の必要性が残っている。予備的結果は、種々の型の癌についての有効な処置ストラテジーの特徴が、特に処置している癌の種類についての特異的アデノウイルスベクターおよび／または方法の開発を必要とし得ることを示唆する。化学療法および免疫療法は散在性腫瘍についての最も優勢な現行の治療ストラテジーであるが、毒性副作用および有効性の欠如の両方の問題が残っている。
【００１１】
それゆえ、インビボで特定の癌を標的化し得るウイルスベクターの開発にかなりの興味が存在する。
【課題を解決するための手段】
【００１２】
（発明の要旨）
本発明は、ウイルス複製に必要とされる遺伝子に作動可能に連結された肝臓癌特異的転写調節エレメント（ＴＲＥ）を含む、複製能力のあるアデノウイルスベクターを提供する。
【００１３】
本発明の１つの局面では、ＣＲＧ－Ｌ２遺伝子由来の肝臓癌特異的ＴＲＥを含む遺伝配列が提供される。この肝細胞癌特異的ＴＲＥは、配列番号１として本明細書中で提示される、ＣＲＧ－Ｌ２遺伝子についての翻訳開始コドンの上流の０．８ｋｂ配列、または配列番号１に含まれる０．７ｋｂ配列（残基１１９～８０３）；または例えば０．８ｋｂ配列由来のＥｃｏＲＩからＮｃｏＩまでのフラグメントに由来し得る。
【００１４】
本発明の１つの実施形態では、ＣＲＧ－Ｌ２プロモーターを含むベクターが提供される。このベクターは、ＣＲＧ－Ｌ２プロモーターに作動可能に連結されたコード配列を含み得る。目的のベクターとしては、プラスミド、ウイルスベクター、ゲノム組み込みベクターなどが挙げられる。目的のウイルスベクターとしては、アデノウイルスベクターが挙げられる。
【００１５】
本発明のアデノウイルスベクターは、１以上の肝癌特異的ＴＲＥを含み得、そして同じかまたは異なる遺伝子に由来し得る、１以上の調節配列（例えば、エンハンサー、プロモーター、転写因子結合部位など）をさらに含み得る。
【００１６】
このアデノウイルスベクターは、肝癌特異的ＴＲＥの制御下に、共転写される（ｃｏ－ｔｒａｎｓｃｒｉｂｅｄ）第１アデノウイルス遺伝子および第２アデノウイルス遺伝子を含み得、そしてこの第２遺伝子は、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）の翻訳制御下にあり得る。ウイルス複製に必要な遺伝子に作動可能に連結された肝癌特異的ＴＲＥを含むアデノウイルスベクターを細胞に導入するための方法、およびこのアデノウイルスベクターを含む宿主細胞が提供される。別の局面では、標的原発性肝癌細胞（特に、肝細胞癌細胞）に選択的細胞傷害性を付与するための方法が提供され、この方法は、この細胞に本発明のアデノウイルスベクターを接触させ、それによりこのベクターをこの細胞に侵入させてウイルスを増殖させる工程を包含する。
【発明を実施するための最良の形態】
【００１７】
（実施形態の詳細な説明）
本発明の、肝細胞癌特異的な、複製能力のあるアデノウイルスベクターは、肝癌特異的

転写調節エレメント（ＴＲＥ）（好ましくは、ＣＲＧ－Ｌ２調節配列）の転写制御下に、複製に必須なアデノウイルス遺伝子（好ましくは、早期遺伝子）を含む。１以上の肝癌特異的ＴＲＥを提供することにより、このアデノウイルスベクターは、原発性肝癌細胞における選択的複製および対応する細胞傷害性をもたらす。

【００１８】

肝癌特異的ＴＲＥを含むアデノウイルスベクターは、１以上の調節配列（例えば、エンハンサー、プロモーター、転写因子結合部位など）をさらに含み得、これらの調節配列は、同じかまたは異なる遺伝子に由来し得る。このアデノウイルスベクターは、肝癌特異的ＴＲＥの制御下に、共転写される第１遺伝子および第２遺伝子を含み得、ここで、この第２遺伝子は、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）の翻訳制御下にあり得る。いくつかの場合、このアデノウイルスベクターは、肝癌特異的ＴＲＥの制御下に、２つよりも多くの共転写される遺伝子を含み得、ここで、１以上の遺伝子は、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）の翻訳制御下にある。本発明のアデノウイルスベクターは、アデノウイルスＥ３遺伝子、Ｅ３配列、またはそれらの一部を含んでもよく、またはこれらを含まなくてもよい。

【００１９】

別の局面では、標的原発性肝癌細胞（特に、肝細胞癌細胞）に選択的細胞傷害性を付与するための方法が提供され、この方法は、この細胞に、本発明のアデノウイルスベクターを接触させ、それにより、このベクターをこの細胞に侵入させてウイルスが増殖する工程を包含する。原発性肝癌細胞におけるウイルスの複製は、非腫瘍細胞、または正常細胞、すなわち、非トランスフォーム細胞と比較して、通常約１０倍多く、そして約１００倍多いかもしれず、そしていくつかの例では、約１０００倍以上多いほどの多さである。ウイルスの投与は、特定の疾患に対して適切なさらなる処置（例えば、抗ウイルス治療、化学療法、外科手術、放射線治療または免疫療法）と組み合わされ得る。いくつかの実施形態では、この処置は、例えば腫瘍細胞を殺傷することにより、腫瘍増殖を抑制する。他の実施形態では、腫瘍のサイズおよび／もしくは程度が低減するかまたはその発達が遅延する。細胞傷害性は、当該分野でよく理解される用語であり、そして細胞死および／または細胞溶解を含め、細胞の通常の生化学的活性または生物学的活性が損なわれた（すなわち、阻害された）状態をいう。これらの活性としては、代謝；細胞複製；ＤＮＡ複製；転写；翻訳；分子の取り込みが挙げられるがこれらに限定されない。細胞傷害性の指標として当該分野で公知のアッセイとしては、色素排除、^{3}Ｈ－チミジン取り込みおよびプラークアッセイが挙げられる。

【００２０】

これらの方法による処置に適切な個体としては、肝癌（特に、肝細胞癌）を有するかまたは肝癌（特に、肝細胞癌）を有する疑いがある個体（この疾患の早期段階または後期段階の個体を含む）ならびに以前に処置された個体（例えば、アジュバント設定において）が挙げられる。本明細書中に記載される方法に適切な他の個体は、肝癌を発症する危険性が高いと考えられる個体（例えば、肝炎ウイルス（これは、Ｂ型肝炎ウイルスおよびＣ型肝炎ウイルスを包含し得る）での感染に陽性である個体）；肝硬変に罹患している個体；などである。処置レジメとしては、腫瘍または他の形態の疾患の根絶、抗ウイルス処置、肝機能についての支援処置、ならびにこの疾患の緩和の両方が挙げられる。原発性肝癌の存在および本明細書中に記載される方法を受ける個体の適切さは、診断方法（例えば、画像化技術、血清腫瘍マーカーの分析および生検）を含め、当該分野で公知の技術のいずれかによって決定され得る。

【００２１】

本発明は、配列番号１に示される、肝細胞癌細胞における増強された発現を提供する新規調節配列を提供する。この領域のＤＮＡは、連結されたＣＲＧ－Ｌ２遺伝子の発現を導くネイティブプロモーターエレメントを含む。

【００２２】

本発明の種々の方法は以下に記載される。腫瘍抑制の特定の方法は以下の考察に例示さ

れるが、上記の方法を含め、多数の代替方法のいずれもが等しく適用可能であり、本発明を実施する際に使用するために適切であることが理解される。本発明のベクターおよび方法の評価が、上記の診断方法および評価方法を含め、当該分野で標準的な手順を用いて実施され得ることもまた理解される。

【００２３】

本発明の実施は、他に示さない限り、分子生物学の従来技術（組換え技術を含む）、微生物学の従来技術、細胞生物学の従来技術、生化学の従来技術および免疫学の従来技術を用い、これらは、当該分野の技術範囲内にある。このような技術は文献（例えば、「Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ」，第２版（Ｓａｍｂｒｏｏｋら，１９８９）；「Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ」（Ｍ．Ｊ．Ｇａｉｔ編，１９８４）；「Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ」（Ｒ．Ｉ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ編，１９８７）；「Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ」（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）；「Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ」（Ｄ．Ｍ．ＷｅｉｒおよびＣ．Ｃ．Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ編）；「Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ Ｖｅｃｔｏｒｓ ｆｏｒ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌｓ」（Ｊ．Ｍ．ＭｉｌｌｅｒおよびＭ．Ｐ．Ｃａｌｏｓ編，１９８７）；「Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ」（Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌら編，１９８７）；「ＰＣＲ：Ｔｈｅ Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ Ｃｈａｉｎ Ｒｅａｃｔｉｏｎ」，（Ｍｕｌｌｉｓら編，１９９４）；および「Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ」（Ｊ．Ｅ．Ｃｏｌｉｇａｎら編，１９９１））に充分に例示される。

【００２４】

アデノウイルスに関連する技術については、とりわけ、ＦｅｌｇｎｅｒおよびＲｉｎｇｏｌｄ（１９８９）Ｎａｔｕｒｅ ３３７：３８７－３８８；ＢｅｒｋｎｅｒおよびＳｈａｒｐ（１９８３）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１１：６００３－６０２０；Ｇｒａｈａｍ（１９８４）ＥＭＢＯ Ｊ．３：２９１７－２９２２；Ｂｅｔｔら（１９９３）Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ６７：５９１１－５９２１；Ｂｅｔｔら（１９９４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：８８０２－８８０６を参照のこと。

【００２５】

（定義）

他に示さない限り、本明細書中で用いられる全ての用語は、当業者にとっての意味と同じ意味を有し、本発明の実施は、微生物学および組換えＤＮＡ技術の従来技術を用いる。これらは、当業者の知識範囲内にある。

【００２６】

本明細書中で用いられる場合、用語「新生物性細胞」、「新形成」、「腫瘍」、「腫瘍細胞」、「癌」および「癌細胞」（交換可能に用いられる）は、比較的自律増殖を示し、その結果、細胞増殖制御の顕著な喪失によって特徴付けられる異常な増殖表現型を示す、細胞をいう。新生物性細胞は、悪性または良性であり得る。

【００２７】

肝細胞癌は、米国においては比較的珍しい腫瘍であるが、その発生数は上昇しており、Ｃ型肝炎感染の広がりに主に関連している。肝細胞癌は、世界のいくつかの他の部分では最も一般的な癌であり、１００万を超える新たな症例が毎年診断されている。肝細胞癌は、外科手術的切除によって治癒可能な可能性があるが、局在した疾患を有する患者のごく一部についてのみである。予後は、局所腫瘍置換の程度および肝機能の損傷程度に依存する。外科手術的切除以外の治療はしばしば本質的には実験的である。これらとしては、全身化学療法もしくは注入化学療法、肝動脈結紮もしくは肝動脈塞栓形成、経皮エタノール注入、高周波剥離、寒冷療法、および（しばしば外科手術切除および／または放射線療法に伴う）放射標識抗体が挙げられる。何人かの患者は、肝臓移植についての候補であり得るが、移植への肝臓の利用可能性に限界があることから、このアプローチの使用は制限されている。肝細胞癌は、胆管の癌（胆管癌）と共存し得る。

【００２８】
肝細胞癌は、患者の５０％～８０％において肝硬変に関連している；肝硬変患者の５％は、肝細胞癌を最終的に発症し、肝細胞癌はしばしば多病巣性である。Ｂ型肝炎感染およびＣ型肝炎感染は、世界中で、肝細胞癌の最も顕著な原因であり、特に、抗原血症が継続している患者および慢性活動性肝炎を有する患者においてそうである。アフラトキシンもまた、摂取する食品中に高レベルでマイコトキシンが生じる、世界の一部では、原発性肝癌の病因の一要因と示唆されている。塩化ビニル粉塵についての制御前に塩化ビニルに曝露された労働者は、肝臓において発達した肉腫（最も通常は、血管肉腫）を形成し始めた。

【００２９】
肝細胞癌の主な症状は、肝臓のサイズの症状である。肝硬変疾患を受けた患者の中では、α－フェトプロテイン（ＡＦＰ）および／もしくはアルカリホスファターゼの進行性増加、または肝機能の迅速な悪化は、新生物の存在の唯一の手掛かりであり得る。稀に、この疾患を有する患者は、赤血球増加、低血糖、高カルシウム血症または異常フィブリノゲン血症を有し得る。

【００３０】
生物学的マーカーＡＦＰは、この新生物の診断に有用である。放射免疫アッセイ技術によって、米国における肝細胞癌を有する患者の５０％～７０％は、上昇したレベルのＡＦＰを有する。ＡＦＰレベルは、予後診断的に重要であり、ＡＦＰ陰性患者のメジアン生存は、ＡＦＰ陽性患者のメジアン生存よりも顕著に長い。他の予後診断変数としては、パフォーマンスステータス、肝機能、ならびに肝硬変の存在または不存在、ならびにＣｈｉｌｄ－Ｐｕｇｈ分類に関連したその重篤度が挙げられる。

【００３１】
本明細書中で用いられる場合、「腫瘍増殖を抑制する」とは、本発明の組成物、キットまたは方法を用いて処置すると、腫瘍の増殖速度を低減すること、腫瘍増殖を完全に停止させること、既存の腫瘍のサイズの後退を引き起こすこと、既存の腫瘍を根絶すること、および／またはさらなる腫瘍の発生を予防することをいう。腫瘍増殖を「抑制すること」は、本明細書中に記載のように、化学療法剤の投与および放射線と組み合わせたアデノウイルスベクターとの接触（すなわち、トランスフェクション）のない増殖と比較した場合に、増殖状態が低減されることを示す。腫瘍細胞増殖は、当該分野で公知の任意の手段によって評価され得、このような手段としては、腫瘍サイズを測定すること、^{3}Ｈ－チミジン取り込みアッセイを用いて、腫瘍細胞が増殖しているか否かを決定すること、または腫瘍細胞を数えることが挙げられるがこれらに限定されない。腫瘍細胞増殖を「抑制すること」とは、以下の状態のうちのいずれかまたは全てを意味する：腫瘍増殖がゆっくりになること、遅延することおよび停止すること、ならびに腫瘍が縮むこと。

【００３２】
腫瘍の「発達の遅延」とは、この疾患の発達が延期される（ｄｅｆｅｒ）、妨げられる（ｈｉｎｄｅｒ）、ゆっくりになる（ｓｌｏｗ）、遅らせられる（ｒｅｔａｒｄ）、安定化する（ｓｔａｂｉｌｉｚｅ）、および／または先送りにされる（ｐｏｓｔｐｏｎｅ）ことを意味する。この遅延は、病歴および／または処置される個体に依存して、種々の長さのものであり得る。

【００３３】
本明細書中で用いられる場合、「転写応答エレメント」または「転写調節エレメント」または「ＴＲＥ」は、ポリヌクレオチド配列（好ましくはＤＮＡ配列）であって、１以上のエンハンサーおよび／またはプロモーターおよび／またはプロモーターエレメント（例えば、転写調節タンパク質応答配列）を含み、ＴＲＥを機能させる宿主細胞において作動可能に連結されたポリヌクレオチド配列の転写を増加させる、ポリヌクレオチド配列（好ましくはＤＮＡ配列）である。「肝細胞癌特異的転写応答エレメント」は、肝細胞癌細胞における遺伝子発現を優先的に導く。「転写制御下」は、当該分野でよく理解される用語であり、転写の開始に寄与するエレメントに作動可能に連結されるかまたは転写を促進す

るエレメントに作動可能に（作動性に）連結されるかに依存して、ポリヌクレオチド配列（通常はＤＮＡ配列）の転写を示す。「作動可能に連結された」とは、エレメントが機能し得る配置にエレメントがある並置をいう。

【００３４】

肝細胞癌特異的ＴＲＥに加えて、本発明のベクターは、同じ遺伝子または異なる遺伝子に由来するプロモーターおよび／またはエンハンサーをさらに含み得る。このようなさらなる調節エレメントは、複製に必須のアデノウイルス遺伝子に作動可能に連結され得る。

【００３５】

用語「複合ＴＲＥ」とは、プロモーターおよびエンハンサーの、通常、非ネイティブの組合せ（例えば、プロモーターおよびエンハンサーの異種組合せおよび／または転写因子結合部位；ヒトおよびマウスのプロモーターおよびエンハンサーの組合せ；プロモーターと組み合わされた２以上のエンハンサー；上記のマルチマーなど）を提供する、天然では一緒に見出されない転写調節エレメントを含むＴＲＥをいう。プロモーター、エンハンサーおよび／または転写因子結合部位エレメントのうちの少なくとも１つは、肝細胞癌特異的である（例えば、エンハンサーと組み合わせたＣＲＧ－Ｌ２プロモーター）。他の実施形態では、２以上のエレメントは、肝細胞癌特異性を提供する。２以上の供給源由来の調節エレメントを含む複合ＴＲＥは、１以上のアデノウイルス遺伝子を調節するために用いられ得る。

【００３６】

あるいは、別個のＴＲＥは、異なるアデノウイルス遺伝子に作動可能に連結され得る。例えば、１つのＴＲＥは、アデノウイルスＥ１Ａ遺伝子の転写を調節し得、異なるＴＲＥは、アデノウイルスＥ１Ｂ遺伝子の発現を調節する。さらなるＴＲＥもまた、発現が標的とされた治療配列に作動可能に連結され得る。

【００３７】

限定されないが、本発明のベクターにおいて使用するための目的の調節エレメントとしては、Ｅ２Ｆプロモーター、テロメラーゼプロモーター、Ｈ１９プロモーター（Ｂｒａｎｎａｎら，Ｍｏｌ．ａｎｄ Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，１０（１）２８－３６，１９９０；米国特許第５，９５５，２７３号；米国特許第６，３０６，８３３号）およびＡＦＰプロモーターが挙げられ得る。また目的とするのは、ＨＣＣにおいて改変されることが報告されたプロモーターエレメントであり、このようなプロモーターエレメントとしては、サイクリン依存性キナーゼインヒビター４ａについてのプロモーター；アポトーシス関連システインプロテアーゼであるカスパーゼ８についてのプロモーター；ｒａｓ会合（ＲａＩＧＤＳ／ＡＦ－６）ドメインファミリー１タンパク質アイソフォーム１ａ；およびＨ－カドヘリンであるカドヘリン１３（Ｙｕら（２００２）ＢＭＣ Ｃａｎｃｅｒ ２：２９を参照のこと）が挙げられる。

【００３８】

「転写活性化」または「転写の増加」によって、正常細胞、すなわち、非トランスフォーム細胞における基底レベルを超えて、少なくとも約２倍、好ましくは少なくとも約５倍、好ましくは少なくとも約１０倍、より好ましくは少なくとも約２０倍、より好ましくは少なくとも約５０倍、より好ましくは少なくとも約１００倍、より好ましくは少なくとも約２００倍、さらにより好ましくは少なくとも約４００倍～約５００倍、なおさらに好ましくは少なくとも約１０００倍、転写が増加することが意図される。基底レベルは一般に、非標的細胞（すなわち、異なる細胞型）における活性（存在する場合）のレベル、または標的細胞株において試験した、肝細胞癌特異的ＴＲＥを欠くレポーター構築物の活性（存在する場合）のレベルである。ＴＲＥが、ウイルス複製に必須の遺伝子を制御する場合、ウイルスの複製は、コントロール細胞と比較して、標的細胞において有意に高く、通常少なくとも約２倍高く、好ましくは少なくとも約５倍高く、より好ましくは少なくとも約１０倍高く、なおより好ましくは少なくとも約５０倍高く、さらにより好ましくは少なくとも約１００倍高く、なおより好ましくは少なくとも約４００倍～約５００倍高く、さらにより好ましくは少なくとも約１０００倍高く、最も好ましくは少なくとも約1×10^{6}

高い。最も好ましくは、このアデノウイルスは、標的細胞においてのみ複製を行う（すなわち、非標的細胞においては、複製しないかまたは非常に低いレベルで複製する）。

【００３９】

ＴＲＥの活性は、例えば、以下の通りに決定され得る。ＴＲＥポリヌクレオチド配列またはこのような配列のセットは、当該分野で公知の方法（例えば、化学的合成、部位特異的変異誘発、ＰＣＲ、および／または組換え法）を用いて作製され得る。試験されるべき配列は、プロモーター（ＴＲＥ中にプロモーターエレメントが存在しない場合）およびレポータータンパク質（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）、β－ガラクトシダーゼ（ｌａｃＺ遺伝子によってコードされる）、ルシフェラーゼ（ｌｕｃ遺伝子によってコードされる）、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）、グリーン蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、および西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）が挙げられるがこれらに限定されない）をコードする適切なレポーター遺伝子を含むベクターへと挿入され得る。このようなベクターおよびアッセイは、とりわけ、商業的供給源から容易に利用可能である。このようにして構築されたプラスミドは、推定ＴＲＥによって制御されるレポーター遺伝子の発現について試験するために、当該分野で公知のトランスフェクション方法（例えば、リン酸カルシウム沈澱、エレクトロポレーション、リポソーム、ＤＥＡＥデキストラン媒介移入、パーティクルボンバードメントまたは直接的注入）を用いて、適切な宿主細胞へとトランスフェクトされる。ＴＲＥ活性は、レポーター遺伝子由来のｍＲＮＡおよび／またはタンパク質の検出および／または定量によって測定される。レポータータンパク質産物は、直接的に（例えば、免疫化学的に）またはその酵素活性を通して（存在する場合、適切な基質を用いて）検出され得る。一般的に、ＴＲＥの細胞特異的活性を決定するために、ＴＲＥ－レポーター遺伝子構築物が、種々の細胞型に導入される。ＴＲＥ活性の量は、各細胞型において決定され、そしてＴＲＥを欠くレポーター遺伝子構築物の量と比較される。ＴＲＥは、異なる型の細胞と比較して１つの細胞型において優先的に機能するならば、細胞特異的であると決定される。

【００４０】

肝細胞癌特異的ＴＲＥは、哺乳動物の肝細胞癌特異的エンハンサーおよび／またはプロモーターを含む。本発明を実施する際の使用に好ましい転移性癌特異的エンハンサーおよび／またはプロモーターは、ヒト起源、ラット起源またはマウス起源のものであり、これらとしては、プロモーターエレメントおよびエンハンサーエレメント、ならびに配列番号１に示される、５’ＣＲＧ－Ｌ２配列由来の転写因子結合配列が挙げられる。１つの実施形態では、ＴＲＥは、配列番号１の残基１１９～８０３を含む。特異性を付与することが公知の目的の転写調節配列としては、本明細書中に記載のＣＲＧ－Ｌ２由来のプロモーターエレメントおよびエンハンサーエレメントが挙げられる。この領域のＤＮＡは、連結した遺伝子の発現を導くネイティブプロモーターエレメントを含む。通常、プロモーター領域は、この遺伝子に対して５’側に位置する少なくとも約１００ｎｔの配列を有し、ＴＡＴＡボックスモチーフ配列およびＣＡＡＴボックスモチーフ配列をさらに含む。

【００４１】

この５’領域の配列、およびＣＲＧ－Ｌ２が発現される組織（例えば、肝細胞癌細胞）における発現を提供するさらなる５’上流配列（エンハンサー結合部位を含む）は、遺伝子発現を導くために利用され得る。組織特異的発現は、発現のパターンを決定するために有用であり、そして発現のネイティブパターンを模倣するプロモーターを提供するために有用である。配列の変更（置換、欠失および付加が挙げられる）は、実験的に規定される系における発現を変更する効果を決定するために、プロモーター領域に導入され得る。転写因子の結合に関与する特異的ＤＮＡモチーフの同定のための方法（例えば、既知の結合モチーフに対する配列類似性、ゲル遅延研究など）は、当該分野で公知である。

【００４２】

調節配列は、ＣＲＧ－Ｌ２発現（特に、異なる段階の転移）の転写調節または翻訳調節に必要なシス作用性配列を同定するために、そしてシス作用性配列および発現を調節または媒介するトランス作用性因子を同定するために、用いられ得る。このような転写制御領

域または翻訳制御領域は、培養細胞または胚性組織、胎児組織もしくは成体組織における目的のタンパク質の発現を促進するために、ならびに遺伝子治療のために、目的の遺伝子に作動可能に連結され得る。

【００４３】

肝細胞癌特異的ＴＲＥはまた、マルチマーを含み得る。例えば、肝細胞癌特異的ＴＲＥは、タンデムに並んだ一連の少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、または少なくとも５個のプロモーターフラグメントを含み得る。あるいは、肝細胞癌特異的ＴＲＥは、１以上のプロモーター領域を、１以上のエンハンサー領域とともに有し得る。これらのマルチマーはまた、異種のプロモーター配列および／もしくはエンハンサー配列ならびに／または転写因子結合部位を含み得る。

【００４４】

肝細胞癌特異的ＴＲＥのこのプロモーターエンハンサーおよび／または転写因子結合部位成分は、所望の標的細胞特異的転写活性が得られる限り、目的のコード配列に対して任意の配向および／または目的のコード配列から任意の距離にあり得る。転写活性化は、当該分野で公知の多数の方法で測定され得るが、一般に、肝細胞癌特異的ＴＲＥの制御下にある（すなわち、肝細胞癌特異的ＴＲＥに作動可能に連結されている）コード配列のｍＲＮＡまたはタンパク質産物の検出および／または定量によって測定される。本明細書中で考察する場合、肝細胞癌特異的ＴＲＥは、種々の長さのものであり得、そして種々の配列組成のものであり得る。

【００４５】

当該分野で公知のように、ＴＲＥの活性は、誘導性であり得る。誘導性ＴＲＥは、一般に、インデューサーの不存在下で低い活性を示し、そしてインデューサーの存在下ではアップレギュレートされる。インデューサーとしては、例えば、核酸、ポリペプチド、低分子、有機化合物および／または環境条件（例えば、温度、圧力または低酸素）が挙げられる。特定の時点または特定の場所でのみ発現が所望される場合、または誘導剤を用いた発現レベルを滴定することが所望される場合、誘導性ＴＲＥが好適であり得る。

【００４６】

本発明のベクターにおいて使用するためのＴＲＥは、サイレンサーを含んでも含まなくてもよい。サイレンサー（すなわち、当該分野で公知の負の調節エレメント）の存在は、非標的細胞における転写（従って複製）の中止を補助し得る。従って、サイレンサーの存在は、非標的細胞における複製をより効果的に防止することにより、増強された細胞特異的ベクター複製を付与し得る。あるいは、サイレンサーを欠くことにより、標的細胞における複製を刺激し得、従って、増強された標的細胞特異性を付与し得る。

【００４７】

肝細胞癌特異的ＴＲＥの「機能的に保存された改変体」は、通常配列が異なるが、生物学的活性（例えば、対応するネイティブのまたは親の肝細胞癌特異的ＴＲＥの標的細胞特異的転写活性）を依然として保持するが、活性化の程度は変更され得る。配列の相違は、例えば、塩基の１塩基の変異、付加、欠失、および／または改変から生じ得る。この相違はまた、肝細胞癌特異的ＴＲＥの塩基の間の糖および／または結合の変化から生じ得る。例えば、ＴＲＥの配列内の特定の点変異は、転写因子の結合および転写の刺激を減少させることが示されている（Ｂｌａｃｋｗｏｏｄら（１９９８）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８１：６０－６３，およびＳｍｉｔｈら（１９９７）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７２：２７４９３－２７４９６を参照のこと）。当業者は、転写因子結合部位内または転写因子結合部位付近の塩基の何らかの変更が、転写および細胞特異性の刺激に負に影響を与えるようであるが、転写因子結合に関与しない塩基における変更は、このような効果を有さないようであることを認識する。特定の変異もまた、ＴＲＥ活性を上昇させることが可能である。塩基を変更する効果の試験は、当該分野で公知の任意の方法（例えば、移動度シフトアッセイ、またはこれらの変更を含むベクターをＴＲＥが機能的な細胞およびＴＲＥが非機能的な細胞にトランスフェクトすること）によって、インビトロまたはインビボで実施され得る。さらに、当業者は、ＴＲＥ配列の転写調節能力を変更することなく、点変異および欠

失がＴＲＥ配列に行われ得ることを認識する。代表的に、肝細胞癌特異的ＴＲＥの「機能的に保存された改変体」が、ハイストリンジェンシーの条件下で親配列にハイブリダイズすることが認識される。例示的な高ストリンジェンシー条件としては、約５×ＳＳＰＥ中での約６５℃でのハイブリダイゼーションおよび約０．１×ＳＳＰＥ（ここで１×ＳＳＰＥ＝０．１５塩化ナトリウム、０．０１０Ｍリン酸ナトリウムおよび０．００１Ｍ　二ナトリウムＥＤＴＡ）中での約６５℃での洗浄が挙げられる。高ストリンジェンシー条件のさらなる例は、以下に提供される：Ｍａｎｉａｔｉｓら，ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ　ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ　ＭＡＮＵＡＬ，第２版（１９８９）；およびＡｕｓｕｂｅｌ，Ｆ．Ｍ．ら編，ＣＵＲＲＥＮＴ　ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ　ＩＮ　ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＢＩＯＬＯＧＹ，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，著作権（ｃ）１９８７，１９８８，１９８９，１９９０，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓによる（これらは両方とも、本明細書中に参考として援用される）。

【００４８】

いくつかの例では、肝細胞癌特異的ＴＲＥの「機能的に保存された改変体」は、ネイティブのまたは親の肝細胞癌特異的ＴＲＥのフラグメントである。肝細胞癌特異的ＴＲＥを言及する場合、用語「フラグメント」とは、ネイティブのまたは親の肝細胞癌特異的ＴＲＥの核酸配列の一部として同じであるが全体ではない配列をいう。このようなフラグメントは、ネイティブのまたは親の肝細胞癌特異的ＴＲＥと本質的に同じいずれかの生物学的機能または活性を示す；例えば、対応するネイティブのまたは親の肝細胞癌特異的ＴＲＥの標的細胞特異的転写活性を保持するが、活性化の程度は変更され得る、フラグメント。

【００４９】

本明細書中で用いられる場合、「内部リボソーム侵入部位」または「ＩＲＥＳ」とは、シストロン（タンパク質コード領域）の開始コドン（例えば、ＡＴＧ）への直接的内部リボソームの侵入を促進し、それにより、その遺伝子のキャップ依存性翻訳を導く、エレメントをいう（Ｊａｃｋｓｏｎら（１９９０）Ｔｒｅｎｄｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｓｃｉ　１５（１２）：４７７－８３）およびＪａｃｋｓｏｎら（１９９５）ＲＮＡ　１（１０）：９８５－１０００）。本発明は、シストロンの開始コドンへの内部リボソーム侵入を導き得る任意のＩＲＥＳエレメントの使用を包含する。「ＩＲＥＳの翻訳制御下」とは、本明細書中で用いられる場合、翻訳がＩＲＥＳと関連しており、キャップ依存性様式で進行することを意味する。当該分野で公知の「ＩＲＥＳ」の例としては、ピコルナウイルスから入手可能なＩＲＥＳ（Ｊａｃｋｓｏｎら，１９９０，Ｔｒｅｎｄｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｓｃｉ　１５（１２）：４７７－４８３）；およびウイルス性または細胞性のｍＲＮＡ供給源（例えば、免疫グロブリン重鎖結合タンパク質（ＢｉＰ）、脈管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）（Ｈｕｅｚら（１９９８）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１８（１１）：６１７８－６１９０）、線維芽細胞増殖因子２、およびインスリン様増殖因子、翻訳開始因子ｅＩＦ４Ｇ、酵母転写因子ＴＦＩＩＤおよびＨＡＰ４など）から入手可能なＩＲＥＳが挙げられるがこれらに限定されない。ＩＲＥＳはまた、種々のウイルス（例えば、カルジオウイルス、ライノウイルス、アフトウイルス、ＨＣＶ、フレンドマウス白血病ウイルス（ＦｒＭＬＶ）およびモロニーマウス白血病ウイルス（ＭｏＭＬＶ））において報告されている。本明細書中で用いられる場合、用語「ＩＲＥＳ」は、そのバリエーションが、シストロンの開始コドンへの直接的内部リボソーム侵入を促進し得る限り、ＩＲＥＳ配列の機能的バリエーションを包含する。好ましい実施形態では、ＩＲＥＳは、哺乳動物性である。他の実施形態では、ＩＲＥＳは、ウイルス性または原生生物性である。本明細書中に開示される１つの例示的実施形態では、ＩＲＥＳは、脳心筋炎（ｅｎｃｅｐｈｅｌｏｍｙｃａｒｄｉｔｉｓ）ウイルス（ＥＣＭＶ）（Ｎｏｖｏｇｅｎ，Ｄｕｋｅら（１９９２）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ　６６（３）：１６０２－１６０９から市販される）から入手され得る。本明細書中に開示される別の例示的実施形態では、ＩＲＥＳは、ＶＥＧＦ由来である。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳおよび標的細胞特異的ＴＲＥを含むアデノウイルスベクターは、標的細胞に対して、標的細胞特異的ＴＲＥを含みＩＲＥＳを欠くアデノウイルスベクターよりも大きな特異性を示す。

【００５０】
いくつかの実施形態では、特異性は、標的細胞特異的ＴＲＥの存在に起因した第１および第２の遺伝子の優先的な転写および／または翻訳によって付与される。他の実施形態では、特異性は、複製に必須な遺伝子の転写を駆動する標的細胞特異的ＴＲＥに起因した標的細胞におけるアデノウイルスベクターの優先的複製によって付与される。
【００５１】
「Ｅ３領域」（「Ｅ３」と交換可能に使用される）は、当該分野でよく理解される用語であり、アデノウイルスゲノムのうちの、Ｅ３遺伝子産物をコードする領域を意味する。一般に、Ｅ３領域は、アデノウイルスゲノムのヌクレオチド約２８５８３とヌクレオチド約３０４７０との間に位置する。Ｅ３領域は、例えば、Ｗｏｌｄら（１９９５）Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐｉｃｓ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９９：２３７－２７４を含め、種々の刊行物に記載されている。Ｅ３領域の「一部」とは、Ｅ３領域全体よりも小さいことを意味し、それゆえ、ポリヌクレオチド欠失ならびにＥ３領域の１以上のポリペプチド産物をコードするポリヌクレオチドを包含する。
【００５２】
「マルチシストロン性転写産物」とは、１より多くのタンパク質コード領域、すなわち、シストロンを含むｍＲＮＡ分子をいう。２つのコード領域を含むｍＲＮＡは、「二シストロン性転写産物」と示される。「５’近位」コード領域またはシストロンは、マルチシストロン性ｍＲＮＡ分子の翻訳開始コドン（通常ＡＵＧ）が５’末端に最も近いコード領域である。「５’遠位」コード領域またはシストロンは、翻訳開始コドン（通常ＡＵＧ）がこのｍＲＮＡの５’末端に最も近い開始コドンではないものである。用語「５’遠位」および「下流」は、同義語として用いられて、ｍＲＮＡ分子の５’末端に隣接していないコード領域を言及する。
【００５３】
本明細書中で用いられる場合、「共転写される（ｃｏ－ｔｒａｎｓｃｒｉｂｅｄ）」とは、ポリヌクレオチドの２個（以上）のコード領域が、１つの転写制御エレメントの転写制御下にあることを意味する。
【００５４】
本明細書中で用いられる場合、用語「ベクター」とは、１以上の細胞型の形質導入／トランスフェクションのために設計されたポリヌクレオチド構築物をいう。ベクターは、例えば、挿入されたヌクレオチドの単離、増殖および複製のために設計される「クローニングベクター」、宿主細胞におけるヌクレオチド配列の発現のために設計される「発現ベクター」、または組換えウイルスもしくはウイルス様粒子の産生をもたらすように設計される「ウイルスベクター」、または１つよりも多くの型のベクターの属性を含む組換え「シャトルベクター」であり得る。遺伝子導入において使用するための任意のベクターは基本的に、プロモーター活性を有するＤＮＡが導入される「ベクター」として用いられ得る。特に遺伝子治療では、ウイルス性ベクター（例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクター）および非ウイルス性ベクター（例えば、リポソーム）が用いられるべきである。プラスミドベクターもまた用途を見出し得る。任意の細胞が、本発明の「発現ベクターを保有する細胞」に含まれる。
【００５５】
用語「プラスミド」は、本明細書中で用いられる場合、染色体外でまたは宿主細胞染色体の一部としてのいずれかで、宿主細胞内で自律複製し得るＤＮＡ分子をいう。本明細書中では出発プラスミドは、市販されるか、無制限様式で公に入手可能であるか、または本明細書中に開示されるような入手可能なプラスミドからおよび／もしくは公開された手順に従って構築され得る。特定の例では、当業者に明らかなように、当該分野で公知の他のプラスミドは、本明細書中に記載されるプラスミドと交換可能に用いられ得る。
【００５６】
当業者に周知の方法は、コード配列、ならびに細胞に導入される外因性遺伝子の特異的発現のための適切な転写制御シグナルおよび翻訳制御シグナル（肝癌特異的制御シグナル

を含む）を含む発現ベクターを構築するために用いられ得る。これらの方法としては、例えば、インビトロでの組換えＤＮＡ技術、合成技術、およびインビボでの遺伝子組換えが挙げられる。あるいは、遺伝子産物配列をコードし得るＲＮＡは、例えば、合成機を用いて化学的に合成され得る。例えば、「Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ」，１９８４，Ｇａｉｔ，Ｍ．Ｊ．編，ＩＲＬ　Ｐｒｅｓｓ，Ｏｘｆｏｒｄに記載される技術を参照のこと。

【００５７】

哺乳動物宿主細胞では、多数のウイルスベースの発現系が利用され得、このような発現系としては、レトロウイルスベクター（例えば、ＭｏＭＬＶ、ＭＳＣＶ、ＳＦＦＶ、ＭＰＳＶ、ＳＮＶなどに由来する）、レンチウイルスベクター（例えば、ＨＩＶ－１、ＨＩＶ－２、ＳＩＶ、ＢＩＶ、ＦＩＶなどに由来する）、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクター、アデノウイルスベクター（例えば、Ａｄ５ウイルスに由来する）、ＳＶ４０ベースのベクター、単純疱疹ウイルス（ＨＳＶ）ベースのベクターなどが挙げられる。アデノウイルスが発現ベクターとして用いられる場合、目的のコード配列は、アデノウイルス転写／翻訳制御複合体（例えば、後期プロモーターおよび三部構成（ｔｒｉｐａｒｔｉｔｅ）リーダー配列に連結され得る。次いで、このキメラ遺伝子は、インビトロまたはインビボでの組換えによってアデノウイルスゲノムに挿入され得る。ウイルスゲノムの非必須領域（例えば、領域Ｅ１またはＥ３）での挿入により、感染した宿主において生存し得、遺伝子産物を発現し得る、組換えウイルスがもたらされる（ＬｏｇａｎおよびＳｈｅｎｋ，１９８４，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８１：３６５５－３６５９を参照のこと）。特異的開始シグナルもまた、挿入された遺伝子産物コード配列の効率的翻訳に必要とされ得る。これらのシグナルとしては、ＡＴＧ開始コドンおよび隣接配列が挙げられる。挿入された配列について発現用アデノウイルスベクターを作製するための標準的系は、商業的供給源から入手可能である（例えば、Ａｄｅｎｏ－Ｘ^{TM}発現系は、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ（２０００年１月）１０－１２頁）から）。

【００５８】

遺伝子全体（それ自体の開始コドンおよび隣接配列を含む）が適切な発現ベクターに挿入される場合、さらなる翻訳制御シグナルは必要とされないかもしれない。しかし、遺伝子コード配列の一部のみが挿入される場合、外因性翻訳制御シグナル（おそらく、ＡＴＧ開始コドンを含む）が提供されなければならない。さらに、開始コドンは、挿入物全体の翻訳を確実にするために、所望のコード配列のリーディングフレームと相が合わされなければならない。これらの外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然および合成の両方の、種々の起源のものであり得る。発現効率は、適切な転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーターなどを含むことにより向上され得る（Ｂｉｔｔｎｅｒら，１９８７，Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５３：５１６－５４４を参照のこと）。

【００５９】

本発明の「アデノウイルスベクター」または「アデノウイルス性ベクター」（交換可能に用いられる）は、複製能力があり、原発性肝癌細胞において優先的な複製を示し、そしてアデノウイルス遺伝子に連結された組織特異的転写調節配列を含む、ポリヌクレオチド構築物である。いくつかの実施形態では、本発明のアデノウイルスベクターとしては、治療遺伝子配列（例えば、サイトカイン遺伝子配列）が挙げられる。本発明の例示的なアデノウイルスベクターとしては、ＤＮＡ、アデノウイルスコートに封入されたＤＮＡ、別のウイルスもしくはウイルス様形態（例えば、単純疱疹ウイルスおよびＡＡＶ）にパッケージングされたアデノウイルスＤＮＡ、リポソームに封入されたアデノウイルスＤＮＡ、ポリリジンと複合体化したアデノウイルスＤＮＡ、合成ポリカチオン性分子と複合体化したアデノウイルスＤＮＡ、トランスフェリンと結合体化したアデノウイルスＤＮＡ、もしくは化合物（例えば、ＰＥＧ）と複合体化して抗原性が免疫学的に「マスク」されたかおよび／もしくは半減期が長くなったアデノウイルスＤＮＡ、または非ウイルス性タンパク質に結合体化したアデノウイルスＤＮＡが挙げられるがこれらに限定されない。

【００６０】

本明細書中で交換可能に用いられる、用語「ポリヌクレオチド」および「核酸」は、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのいずれかの、任意の長さのポリマー形態のヌクレオチドをいう。これらの用語は、一本鎖、二本鎖または三本鎖のＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ＲＮＡ、ＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッド、またはプリン塩基およびピリミジン塩基を含むポリマー、または他の天然の、化学的に、生化学的に改変された、非天然の、もしくは誘導体化された、ヌクレオチド塩基を包含する。好ましくは、アデノウイルスポリヌクレオチドはＤＮＡである。本明細書中で用いられる場合、「ＤＮＡ」は、塩基Ａ、Ｔ、Ｃ、およびＧを包含するだけでなく、それらのアナログもしくはそれらの塩基の改変形態（例えば、メチル化ヌクレオチド、ヌクレオチド間改変（例えば、非荷電の結合およびチオエート）、糖アナログの使用、ならびに改変されたおよび／または代替の骨格構造（例えば、ポリアミド））のいずれかをも包含する。本発明の目的のためには、アデノウイルスベクターは、標的細胞において複製能力がある。

【００６１】

以下は、ポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子または遺伝子フラグメント、エキソン、イントロン、ｍＲＮＡ、ｔＲＮＡ、ｒＲＮＡ、リボザイム、ｃＤＮＡ、組換えポリヌクレオチド、分枝ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたＤＮＡ、任意の配列の単離されたＲＮＡ、核酸プローブおよびプライマー。ポリヌクレオチドは、改変されたヌクレオチド（例えば、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログ）、ウラシル、他の糖および結合基（例えば、フルオロリボースおよびチオエート）ならびにヌクレオチド分枝を包含し得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断され得る。ポリヌクレオチドは、重合後、例えば、標識成分との結合体化によってさらに改変され得る。この定義に含まれる他の型の改変は、キャップ、アナログによる、天然に存在するヌクレオチドの１以上の置換、およびポリヌクレオチドをタンパク質、金属イオン、標識成分、他のポリヌクレオチドまたは固体支持体へと結合するための手段の導入である。好ましくは、ポリヌクレオチドは、ＤＮＡである。本明細書中で用いられる場合、「ＤＮＡ」は、塩基Ａ、Ｔ、Ｃ、およびＧを包含するだけでなく、それらのアナログもしくはそれらの塩基の改変形態（例えば、メチル化ヌクレオチド、ヌクレオチド間改変（例えば、非荷電の結合およびチオエート）、糖アナログの使用、ならびに改変されたおよび／または代替の骨格構造（例えば、ポリアミド））のいずれかをも包含する。

【００６２】

ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド領域が別の配列に対して特定の百分率（例えば、８０％、８５％、９０％、または９５％）の「配列同一性」を有するとは、整列したときに、これらの２つの配列を比較してこの百分率の塩基が同じであることを意味する。この整列および相同性パーセントまたは配列同一性パーセントは、当該分野で公知のソフトウェアプログラム（例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌら編，１９８７）Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ ３０，セクション７．７．１８に記載されるもの）を用いて決定され得る。好ましい整列プログラムは、ＡＬＩＧＮ Ｐｌｕｓ（Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ ａｎｄ Ｅｄｕｃａｔｉｏｎａｌ Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａ）であり、好ましくはデフォルトパラメーターを用い、デフォルトパラメーターは、以下の通りである：ミスマッチ（ｍｉｓｍａｔｃｈ）＝２；オープンギャップ（ｏｐｅｎ ｇａｐ）＝０；伸長ギャップ（ｅｘｔｅｎｄ ｇａｐ）＝２。

【００６３】

アデノウイルスの文脈では、「異種ポリヌクレオチド」または「異種遺伝子」または「導入遺伝子」は、野生型アデノウイルス中に存在しない、任意のポリヌクレオチドまたは遺伝子である。好ましくは、導入遺伝子はまた、アデノウイルスベクターによる導入の前には、標的細胞中で発現しないか、または標的細胞中に存在しない。本発明のアデノウイルスベクター中に含めるに好ましい導入遺伝子の例は、以下に提供される。

【００６４】

アデノウイルスの文脈では、「異種」プロモーターまたはエンハンサーは、アデノウイルス遺伝子に関連しておらず、アデノウイルス遺伝子に由来してもいないものである。

【００６５】

標的細胞特異的ＴＲＥの文脈では、「異種」プロモーターまたはエンハンサーは、特定の標的細胞特異的ＴＲＥが由来する遺伝子以外の遺伝子に由来するものである。

【００６６】

アデノウイルスの文脈では、「内因性」プロモーター、エンハンサーまたはＴＲＥは、アデノウイルスに対してネイティブであるかまたはアデノウイルスに由来する。

【００６７】

「複製」および「増殖」は、交換可能に用いられ、そして本発明のアデノウイルスベクターが複製または増殖する能力をいう。これらの用語は当該分野でよく理解される。本発明の目的のためには、複製は、アデノウイルスタンパク質の複製を包含し、一般に、アデノウイルスの複製を導く。複製は、当該分野で標準的なアッセイおよび本明細書中に記載されるアッセイ（例えば、ウイルス収率アッセイ、バーストアッセイまたはプラークアッセイ）を用いて測定され得る。「複製」および「増殖」は、ウイルス製造のプロセスに直接的または間接的に関与する、任意の活性を包含する。このようなプロセスとしては、ウイルス遺伝子発現；ウイルスタンパク質、核酸または他の成分の産生；完全なウイルスとなる、ウイルス成分のパッケージング；および細胞溶解が挙げられるがこれらに限定されない。

【００６８】

「優先的複製」および「選択的複製」は、交換可能に用いられ得、そしてアデノウイルスが、非標的細胞よりも多く標的細胞において複製することを意味する。好ましくは、このアデノウイルスは、非標的細胞よりも標的細胞において有意に高い速度で；好ましくは少なくとも約５倍高い速度で、より好ましくは少なくとも約１０倍高い速度で、なおより好ましくは少なくとも約５０倍高い速度で、さらにより好ましくは少なくとも約１００倍高い速度で、さらにより好ましくは少なくとも約４００倍～約５００倍高い速度で、さらにより好ましくは少なくとも約１０００倍高い速度で、最も好ましくは少なくとも約1×10^{6}高い速度で複製する。最も好ましくは、このアデノウイルスは、標的細胞においてのみ複製する（すなわち、非標的細胞においては全く複製しないかまたは非常に低いレベルで複製する）。

【００６９】

「個体」は、脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトである。哺乳動物としては、家畜動物、競技用動物、げっ歯類、霊長類およびペットが挙げられるがこれらに限定されない。「宿主細胞」は、本発明のアデノウイルスベクターのレシピエントであり得るかまたはレシピエントであった、個体細胞または細胞培養物を包含する。宿主細胞としては、単一の宿主細胞の子孫が挙げられ、そしてこの子孫は、天然の、偶然または意図的な変異および／または変化に起因して（形態またはＤＮＡ相補体全体が）元の親細胞と必ずしも完全に同一でなくてもよい。宿主細胞としては、インビボまたはインビトロで本発明のアデノウイルスベクターにトランスフェクトまたは感染させた細胞が挙げられる。

【００７０】

本明細書中で用いられる場合、「細胞傷害性」は、当該分野でよく理解される用語であり、そして細胞の通常の生化学的活性または生物学的活性が損なわれた（すなわち、阻害された）状態をいう。これらの活性としては、代謝；細胞複製；ＤＮＡ複製；転写；翻訳；分子の取り込みが挙げられるがこれらに限定されない。「細胞傷害性」としては、細胞死および／または細胞溶解が挙げられる。細胞傷害性を示すアッセイ（例えば、色素排除アッセイ、^{3}Ｈ－チミジン取り込みアッセイ、およびプラークアッセイ）が当該分野で公知である。

【００７１】

用語「選択的細胞傷害性」は、本明細書中で用いられる場合、本発明のアデノウイルスベクターによって標的細胞特異的ＴＲＥが機能することを許容しない細胞（「非標的細胞

」）に付与される細胞傷害性と比較した場合の、本発明のアデノウイルスベクターによって標的細胞特異的ＴＲＥが機能するのを許容するかまたは誘導する細胞（本明細書中では「標的細胞」という）に付与される細胞傷害性をいう。このような細胞傷害性は、例えば、プラークアッセイ、標的細胞を含む腫瘍サイズの低減もしくは安定化、または腫瘍細胞のマーカー特徴の血清レベルの低減もしくは安定化、または組織特異的マーカー（例えば、癌マーカー）によって測定され得る。

【００７２】

（アデノウイルスベクター）

本明細書中に記載される方法において用いられるアデノウイルスベクターは、肝細胞癌特異的ＴＲＥの転写制御下にアデノウイルス遺伝子（好ましくは、複製に必須の遺伝子）を含む、複製能力のある肝癌特異的アデノウイルスベクターである。このベクターは、Ｅ３領域を含んでも含まなくてもよい。他の実施形態では、アデノウイルスベクターは、Ｅ１Ｂを含む、複製能力のある肝癌特異的ベクターであり、ここで、Ｅ１Ｂは、１９ｋＤａ領域の一部または全部の欠失を有する。いくつかの実施形態では、複製に必須のアデノウイルス遺伝子は、初期遺伝子であり、好ましくはＥ１ＡもしくはＥ１Ｂまたは両方である。いくつかの実施形態では、このアデノウイルスベクターは、共転写される第１の遺伝子および第２の遺伝子を、異種の肝癌特異的転写調節エレメント（ＴＲＥ）の転写制御下に含み、ここで、この第２遺伝子は、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）の翻訳制御下にある。このアデノウイルスベクターは、Ｅ３をさらに含み得る。

【００７３】

Ｅ１Ｂ　１９ｋＤａ領域とは、アデノウイルスＥ１Ｂ遺伝子のうちの、Ｅ１Ｂ　１９ｋＤａ産物をコードするゲノム領域をいう。野生型Ａｄ５によれば、Ｅ１Ｂ　１９ｋＤａ領域は、ヌクレオチド１７１４とヌクレオチド２２４４との間に位置する２６１ｂｐの領域である。Ｅ１Ｂ　１９ｋＤａ領域は、例えば、Ｒａｏら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８９：７７４２－７７４６に記載されている。本発明は、Ｅ１Ｂ　１９ｋＤａに関連したアポトーシス阻害を欠失または変異が低下させないかまたは除去しない限り、Ｅ１Ｂ　１９ｋＤａ領域の一部または全ての欠失、ならびにＥ１Ｂ　１９ｋＤａ領域が変異した実施形態を包含する。

【００７４】

本発明において用いられるアデノウイルスベクターは、肝細胞癌細胞において優先的に複製し、この複製優先性は、肝細胞癌細胞における複製レベル（すなわち、力価）を非肝細胞癌細胞、正常細胞またはコントロール細胞における複製レベルと比較することにより示される。肝細胞癌細胞のアデノウイルス力価の、ＴＲＥ不活性細胞型の力価に対する比較は、標的細胞における複製ならびに非標的細胞における抑制された複製に起因して複製優先性全体が増強される重要な指標を提供する。標的とされる細胞の殺傷が望ましい転移性癌の状況において、これは特に有用である。暴走（ｒｕｎａｗａｙ）感染は、ウイルス複製の細胞特異的必要要件に起因して予防される。任意の特定の理論によって束縛されることを望まないが、アデノウイルスタンパク質の産生は、癌の条件での重要な考慮事項であり得る、全身的またはアデノウイルスタンパク質を産生する標的細胞に対して特異的のいずれかでの、免疫系の活性化および／または刺激を行うのに役立ち得、ここで、個体はしばしば、中程度から重篤に免疫無防備状態にある。

【００７５】

本発明の１つの局面では、このアデノウイルスベクターは、２以上の遺伝子の翻訳を連結させる遺伝子間ＩＲＥＳエレメントを含み、それにより、このベクター中の同一のＴＲＥの存在に基づく相同組換えのあらゆる可能性を排除する。ＩＲＥＳを含むアデノウイルスベクターは適切であり、いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳを含まないベクターよりも良好な特異性を提供する。遺伝子間ＩＲＥＳを含むアデノウイルスベクターの別の利点は、第２のＴＲＥではなくＩＲＥＳの使用が、さらなる遺伝子（例えば、治療遺伝子）のためのさらなる空間をベクター中に提供し得ることである。従って、本発明の１つの局面では、本明細書中に開示されるウイルスベクターは、代表的には、マルチシストロン性転写

産物中に少なくとも１つのＩＲＥＳを含み、ここで、このマルチシストロン性転写産物の産生は、異種の標的細胞特異的ＴＲＥによって調節される。ＩＲＥＳの制御下に第２の遺伝子を含むアデノウイルスベクターについては、内因性プロモーターが第２の遺伝子の転写を妨害しないように、ＩＲＥＳの翻訳制御下の遺伝子の内因性プロモーターが欠失されることが好ましい。ＩＲＥＳが開始コドンを含む場合、第２の遺伝子は、ＩＲＥＳとインフレームであることが好ましい。開始コドン（例えば、ＡＴＧ）がＩＲＥＳ中に存在する場合、第２遺伝子の開始コドンが除去されることおよびＩＲＥＳおよび第２の遺伝子がインフレームであることが好ましい。あるいは、ＩＲＥＳが開始コドンを含まないかまたは開始コドンがＩＲＥＳから除去される場合、第２の遺伝子の開始コドンが用いられる。１つの実施形態では、このアデノウイルスベクターは、異種の肝細胞癌特異性ＴＲＥの転写制御下の、アデノウイルス必須遺伝子であるＥ１Ａ遺伝子およびＥ１Ｂ遺伝子、ならびにＥ１ＡとＥ１Ｂとの間に導入されたＩＲＥＳを含む。従って、Ｅ１ＡおよびＥ１Ｂは両方とも、共通の転写制御下にあり、Ｅ１Ｂコード領域の翻訳は、ＩＲＥＳの存在によって得られる。１つの実施形態では、Ｅ１Ａは、その内因性プロモーターが欠失している。別の実施形態では、Ｅ１Ａは、内因性エンハンサーが欠失しており、なお別の実施形態では、Ｅ１Ａはそのプロモーターおよびエンハンサーが欠失している。別の実施形態では、Ｅ１Ｂは、その内因性プロモーターが欠失している。なおさらなる実施形態では、Ｅ１ＢはＥ１Ｂの１９ｋＤａ領域の一部または全てが欠失している。

【００７６】

アデノウイルスベクターは、さらなる異種ＴＲＥをさらに含み得、このＴＲＥは、標的細胞特異的ＴＲＥと同じ遺伝子に作動可能に連結されていても連結されていなくてもよい。例えば、ＴＲＥ（例えば、細胞型特異的ＴＲＥまたは細胞状態特異的ＴＲＥ）は、第２の型の標的細胞特異的ＴＲＥに並置され得る。「並置される」とは、標的細胞特異的ＴＲＥおよび第２のＴＲＥが、同じ遺伝子を転写制御することを意味する。これらの実施形態については、標的細胞特異的ＴＲＥおよび第２のＴＲＥは、以下を含むがこれらに限定されない多数の配置のうちのいずれであってもよい：（ａ）互いに隣接する（すなわち、隣接する）；（ｂ）両方とも、転写制御される遺伝子の５’側にある（すなわち、これらの間に介在配列を有し得る）；（ｃ）１つのＴＲＥはこの遺伝子の５’側にあり、他方のＴＲＥはこの遺伝子の３’側にある。

【００７７】

標的細胞に対する細胞傷害性を提供するために、細胞傷害性効果を有する１以上の導入遺伝子が、ベクター中に存在し得る。さらに、またはあるいは、細胞傷害性および／または細胞死に寄与するアデノウイルス遺伝子（例えば、アデノウイルス細胞死タンパク質（ＡＤＰ）遺伝子）が、（必要に応じて異種ＴＲＥの選択的転写制御下で、そして必要に応じてＩＲＥＳの翻訳制御下で）このベクター中に含まれ得る。

【００７８】

いくつかの実施形態では、本発明のアデノウイルスベクターは、導入遺伝子を含み、この導入遺伝子は、治療効果（例えば、細胞傷害性を増強し、その結果、望ましくない標的細胞を除去すること）を付与し得る。この導入遺伝子は、肝細胞癌ＴＲＥ（例えば、ＣＲＧ－Ｌ２プロモーターを含み得る、ＣＲＧ－Ｌ２　ＴＲＥ）の転写制御下にあり得る。この導入遺伝子は、アデノウイルス遺伝子調節とは独立して調節され得る（すなわち、同じであっても異なっていてもよい、別のプロモーターを有し得る）か、または協働して調節され得る（すなわち、ＩＲＥＳとともに単一のプロモーターを有する）。

【００７９】

このようにして、種々の遺伝能力が、標的細胞（特に、癌細胞）に導入され得る。例えば、特定の例では、例えば、癌性標的細胞の比較的難治性の性質または特定の攻撃性に起因して、細胞傷害性活性の程度および／または速度を向上させることが所望され得る。これは、標的細胞特異的細胞傷害性活性と、例えばＨＳＶ－ｔｋおよび／またはシトシンデアミナーゼ（ｃｄ）の細胞特異的発現とをカップリングさせることにより、達成され得る。癌細胞は、ＨＳＶ－ｔｋでの形質導入後、抗ウイルス薬ガンシクロビルに対して条件的

に感受性であるように誘導され得る。ガンシクロビルは、ＨＳＶ－ｔｋによって細胞性酵素によりそのトリホスフェート形態へと変換され、そして複製中の哺乳動物細胞のＤＮＡへと取り込まれて、ＤＮＡ複製の阻害および細胞死を導く。シトシンデアミナーゼによって、細胞は、５－フルオロシトシン（５－ＦＣ）を化学療法剤５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）へと代謝し得るようになる。

【００８０】

アデノウイルスベクターによって導入され得る他の望ましい導入遺伝子としては、以下が挙げられる：サイトカイン（例えば、インターフェロンおよびインターロイキン）をコードする遺伝子；リンホカインをコードする遺伝子；膜レセプター（例えば、病原性生物体（ウイルス、細菌または寄生生物）（好ましくはＨＩＶウイルス（ヒト免疫不全ウイルス））によって認識されるレセプター）をコードする遺伝子；凝固因子（例えば、第ＶＩＩ因子および第ＩＸ因子）をコードする遺伝子；ジストロフィンをコードする遺伝子；インスリンをコードする遺伝子；細胞イオンチャネルに直接的または間接的に関与するタンパク質（例えば、ＣＦＴＲ（嚢胞性線維症膜貫通調節タンパク質）タンパク質）をコードする遺伝子；アンチセンスＲＮＡをコードする遺伝子、または病原性生物体のゲノム中に存在する病原性遺伝子によって生成されるタンパク質の活性を阻害し得るタンパク質、または発現が制御解除された細胞性遺伝子（例えば、癌遺伝子）の活性を阻害し得るタンパク質（またはそれらをコードする遺伝子）；酵素活性を阻害するタンパク質をコードする遺伝子（例えば、α１－アンチトリプシンまたはウイルス性プロテアーゼインヒビター）；その生物学的機能を損なうように変異した病原性タンパク質の改変体をコードする遺伝子（例えば、標的配列に対する結合に関して天然タンパク質と競合し得、それによってＨＩＶの活性化を予防し得る、ＨＩＶウイルスのｔａｔタンパク質のトランスドミナント改変体）；宿主細胞の免疫を向上させるための抗原性エピトープをコードする遺伝子；主要組織適合遺伝子複合体クラスＩタンパク質およびクラスＩＩタンパク質をコードする遺伝子、ならびにこれらの遺伝子のインデューサーであるタンパク質をコードする遺伝子；抗体をコードする遺伝子；イムノトキシンをコードする遺伝子；毒素をコードする遺伝子；増殖因子または成長ホルモンをコードする遺伝子；細胞レセプターおよびそれらのリガンドをコードする遺伝子；腫瘍サプレッサーをコードする遺伝子；細胞性酵素または病原性生物体によって生成される酵素をコードする遺伝子；ならびに自殺遺伝子。

【００８１】

目的の細胞傷害性遺伝子としては、以下が挙げられる：ジフテリア毒素のＡ鎖、リシンまたはアブリン（Ｐａｌｍｉｔｅｒら（１９８７）Ｃｅｌｌ　５０：４３５；Ｍａｘｗｅｌｌら（１９８７）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．７：１５７６；Ｂｅｈｒｉｎｇｅｒら（１９８８）Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ．２：４５３；Ｍｅｓｓｉｎｇら（１９９２）Ｎｅｕｒｏｎ　８：５０７；Ｐｉａｔａｋら（１９８８）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６３：４９３７；Ｌａｍｂら（１９８５）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１４８：２６５；Ｆｒａｎｋｅｌら（１９８９）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．９：４１５）、アポトーシスを開始し得る因子をコードする遺伝子、アンチセンス転写産物またはリボザイムをコードする配列（他の能力の中でもとりわけ、増殖に必須のタンパク質（例えば、構造タンパク質または転写因子）をコードするｍＲＮＡを指向し得る）；ウイルス性タンパク質または他の病原性タンパク質、ここで、病原体は、細胞内増殖する；ヌクレアーゼ（例えば、ＲＮａｓｅ　Ａ）またはプロテアーゼ（例えば、ペプシン、パパイン、プロテイナーゼＫ、カルボキシペプチダーゼなど）の操作された細胞質改変体をコードする遺伝子、またはＦａｓ遺伝子をコードする遺伝子など。

【００８２】

ＨＳＶ－１　ＴＫ自殺遺伝子は、一例として言及され得る。このウイルス性ＴＫ酵素は、特定のヌクレオシドアナログ（例えば、アシクロビルまたはガンシクロビル）に対して、細胞性ＴＫ酵素と比較して顕著に高い親和性を提示する。このウイルス性ＴＫ酵素は、これらをモノリン酸化分子へと変換し、モノリン酸化分子自体が、細胞性酵素によって、毒性であるヌクレオチド前駆体へと変換され得る。これらのヌクレオチドアナログは、複

製中のＤＮＡ分子へと取り込まれ得、それ故、取り込みは主に分裂中の細胞のＤＮＡにおいて起こる。この取り込みは、癌細胞のような分裂細胞の特異的破壊をもたらし得る。

【００８３】

治療関連の任意の遺伝子またはコード配列が本発明の実施において用いられ得るが、特定の遺伝子またはそれらのフラグメントが特に適切である。例えば、免疫原性ポリペプチドをコードする遺伝子、毒素をコードする遺伝子、イムノトキシンをコードする遺伝子およびサイトカインをコードする遺伝子は、本発明の実施において有用である。本発明において使用するサイトカイン遺伝子としては、α、βもしくはγインターフェロン（ＩＦＮ）をコードする遺伝子、インターロイキン（ＩＬ）（例えば、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－１０もしくはＩＬ－１２）をコードする遺伝子、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）をコードする遺伝子、リバリー刺激因子（ｌｉｖｅｒｙ　ｓｔｉｍｕｌａｔｉｎｇ　ｆａｃｔｏｒ（例えば、ＧＭ－ＣＳＦ、Ｃ－ＣＳＦ、Ｍ－ＣＳＦ））および当業者に公知の他のサイトカインをコードする遺伝子が挙げられるがこれらに限定されない。さらなる遺伝子としては、細胞または核のレセプターおよびそれらのリガンド（例えば、ｆａｓリガンド）をコードする遺伝子、凝固遺伝子（例えば、ＦＶＩＩＩ、ＦＩＸ）をコードする遺伝子、成長ホルモンをコードする遺伝子、増殖因子（例えば、線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）、脈管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、神経成長因子（ＮＧＦ）、上皮増殖因子（ＥＧＦ）、血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ）および当業者に公知であるような他の増殖因子）をコードする遺伝子が挙げられる。本発明の実施において使用するために適した遺伝子は、酵素（例えば、ウレアーゼ、レニン、トロンビン、メタロプロテアーゼ、一酸化窒素シンターゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼおよび当業者に公知の他のもの）、酵素インヒビター（例えば、α１－アンチトリプシン、アンチトロンビンＩＩＩ、細胞性もしくはウイルス性のプロテアーゼインヒビター、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター－１、メタロプロテアーゼの組織インヒビターなど）、嚢胞性線維症膜貫通調節タンパク質（ＣＦＴＲ）タンパク質、インスリン、ジストロフィン、またはクラスＩもしくはクラスＩＩの主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）抗原をコードし得る。また有用であるのは、対応する遺伝子の発現を調節／制御し得るポリペプチドをコードする遺伝子、細菌性、寄生生物性もしくはウイルス性の感染もしくはその発症を阻害し得るポリペプチド（例えば、抗原性ポリペプチド、抗原性エピトープおよび競合によりネイティブタンパク質の作用を阻害するトランスドミナントタンパク質改変体）をコードする遺伝子、アポトーシスインデューサーもしくはインヒビター（例えば、Ｂａｘ、Ｂｃ１２、Ｂｃ１Ｘおよび当業者に公知の他のもの）をコードする遺伝子、細胞増殖抑制性因子（例えば、ｐ２１、ｐ１６、Ｒｂなど）、アポリポタンパク質（例えば、ＡｐｏＡｌ、ＡｐｏＡＩＶ、ＡｐｏＥなど）、新脈管形成インヒビター（例えば、アンジオスタチン、エンドスタチンなど）、酸素ラジカルスカベンジャー、抗腫瘍効果を有するポリペプチド、抗体、毒素、イムノトキシン、マーカー（例えば、β－ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼなど）または臨床状態の処置もしくは予防のために有用であると当該分野で認識される目的の任意の他の遺伝子である。

【００８４】

腫瘍もしくは癌の進行を遅延もしくは阻害するための目的の適切な遺伝子は、以下が挙げられるがこれらに限定されない：アンチセンスＲＮＡをコードする遺伝子、リボザイムをコードする遺伝子、細胞傷害性産物（例えば、単純疱疹ウイルス１型のチミジンキナーゼ（ＨＳＶ－１　ＴＫ）、リシン、細菌性毒素、ＣＤａｓｅ（シトシンデアミナーゼ）活性およびＵＰＲＴａｓｅ（ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ）活性をそれぞれ有する酵母遺伝子ＦＣＹ１および／またはＦＵＲ１の産物）をコードする遺伝子、抗体をコードする遺伝子、細胞分裂もしくはシグナル伝達を阻害するポリペプチドをコードする遺伝子、腫瘍抑制遺伝子（例えば、ｐ５３、Ｒｂ、ｐ７３）、宿主の免疫系を活性化するポリペプチドをコードする遺伝子、腫瘍関連抗原（例えば、ＭＵＣ－１、ＢＲＣＡ－１、ＨＰＶの初期抗原もしくは後期抗原（例えば、Ｅ６、Ｅ７、Ｌ１、Ｌ２など））をコードする遺伝子（サイトカイン遺伝子と必要に応じて組み合わせられる）。

【００８５】

ＴＲＥの機能的に保存された改変体は、本明細書中に開示されるベクターにおいて用いられ得る。改変体ＴＲＥは、標的細胞において機能を保持するが、最大機能を示す必要はない。実際、ＴＲＥの最大の転写活性化活性は、所望の結果を達成するために必ずしも必要なわけではないかもしれず、ＴＲＥのフラグメントによって与えられる誘導レベルは、特定の適用には充分であり得る。例えば、疾患状態の処置または緩和のために用いられる場合、例えば、標的細胞が特に毒性というわけではなく、そして／または疾患の程度が比較的制限されるならば、最大未満の応答性は充分であり得る。

【００８６】

本明細書中で考察される場合、ＴＲＥは、種々の長さのものであり得、そして種々の配列組成のものであり得る。異種ＴＲＥのサイズは、ウイルス性ベクターの能力によって部分的に決定され、この能力は、ベクターの意図される形態に依存する（以下を参照のこと）。一般に、最少サイズがＴＲＥには好ましい。なぜなら、これにより、所望され得る他の配列（例えば、導入遺伝子および／またはさらなる調節配列）の挿入のための潜在的余地が提供されるからである。好ましい実施形態では、このようなさらなる調節配列は、ＩＲＥＳである。しかし、さらなる配列が意図されない場合、または例えば、アデノウイルスベクターがウイルスのパッケージングについて何の制限もなく維持して送達する場合、得られるアデノウイルスベクターが複製能力を保持する限り、より大きなＴＲＥ配列が用いられ得る。

【００８７】

非特異的複製を最少にするために、内因性アデノウイルスＴＲＥは、好ましくはこのベクターから除去される。標的細胞特異的複製を促進することに加えて、内因性ＴＲＥの除去によりまた、ベクターに、より大きな挿入能力が提供され、これは、アデノウイルスベクターがウイルス粒子内にパッケージングされるべき場合、特に関心のあることであり得る。さらにより重要なことには、内因性ＴＲＥの欠失により、組換え事象の可能性が防止され、それにより、異種ＴＲＥが欠失され、内因性ＴＲＥは、そのそれぞれのアデノウイルスコード配列の転写制御をする。しかし、内因性ＴＲＥは、アデノウイルスベクター中に維持され得、ただし、充分な細胞特異的複製優先性が保存される。これらの実施形態は、異種ＴＲＥを内因性ＴＲＥと複製遺伝子コードセグメントとの間に挿入することによって構築される。必要な肝癌特異的複製優先性は、異種ＴＲＥの機能を可能にする細胞におけるアデノウイルスベクターの複製を、そうでない細胞における複製と比較するアッセイを行うことによって決定される。

【００８８】

本発明のアデノウイルスベクターは、当該分野で標準的である組換え技術を用いて調製され得る。一般に、肝癌特異的ＴＲＥは、目的のアデノウイルス遺伝子（好ましくはアデノウイルス複製遺伝子、より好ましくは１以上の初期複製遺伝子（しかし、後期遺伝子が用いられ得る））の５’側に挿入される。肝細胞癌特異的ＴＲＥは、オリゴヌクレオチド合成（この配列が公知の場合）または組換え方法（例えば、ＰＣＲおよび／または制限酵素）を用いて調製され得る。天然のアデノ－ＤＮＡ配列中の、またはＰＣＲもしくは部位特異的変異誘発のような方法によって導入されたかのいずれかの便利な制限部位により、肝細胞癌特異的ＴＲＥについての挿入部位が提供される。従って、肝細胞癌特異的ＴＲＥをアニール（すなわち、挿入）するための便利な制限部位は、標準的な組換え方法（例えば、ＰＣＲ）を用いて、ＵＰ－ＴＲＥの５’末端および３’末端に操作され得る。

【００８９】

所望のエレメント（例えば、Ｅ１Ａ）が肝癌特異的ＴＲＥの制御下にある、全ての複製必須エレメントを含むアデノウイルスベクターは、一方がアデノウイルスの左側部分を提供して他方のプラスミドが右側領域を提供する２つのプラスミドの相同組換えまたはインビトロ連結によって便利に調製され、これらのうちの１以上は、少なくとも１つのアデノウイルス遺伝子を肝細胞癌特異的ＴＲＥの制御下に含む。相同組換えが用いられる場合、これらの２つのプラスミドは、少なくとも約５００ｂｐの配列重複を共有するべきである。各プラスミドは、所望により、独立して操作され得、続いてコンピテントな宿主におい

て共トランスフェクション（ｃｏｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ）され、適切に相補遺伝子を提供するか、またはアデノウイルスの増殖のための肝細胞癌特異的ＴＲＥからの転写の開始のための適切な転写因子を提供する。プラスミドは一般に、適切な形質導入手段（例えば、カチオン性リポソーム）を用いて、適切な宿主細胞（例えば、２９３細胞）に導入される。あるいは、アデノウイルスゲノムの右側部分と左側部分とのインビトロでの連結はまた、アデノウイルスゲノムの全ての複製に必須な部分を含む、組換えアデノウイルス誘導体を構築するために用いられ得る。Ｂｅｒｋｎｅｒら（１９８３）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １１：６００３－６０２０；Ｂｒｉｄｇｅら（１９８９）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６３：６３１－６３８。

【００９０】

便宜のために、アデノウイルスの必要な部分を提供するプラスミドが入手可能である。プラスミドｐＸＣ．１（ＭｃＫｉｎｎｏｎ（１９８２）Ｇｅｎｅ １９：３３－４２）は、Ａｄ５の野生型の左側末端を含む。ｐＢＨＧ１０（Ｂｅｔｔら（１９９４）；Ｍｉｃｒｏｂｉｘ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ Ｉｎｃ．，Ｔｏｒｏｎｔｏ）は、Ｅ３が欠失した、Ａｄ５の右側末端を提供する。Ｅ３における欠失により、このウイルスに、内因性エンハンサー／プロモーターを欠失することなく、３ｋｂ ＴＲＥを挿入する余地が提供される。Ｅ３についての遺伝子は、Ｅ４（ｒ鎖）の対向鎖に位置する。ｐＢＨＧ１１は、さらにより大きなＥ３欠失を提供する（さらに０．３ｋｂが欠失している）。Ｂｅｔｔら（１９９４）。あるいは、ｐＢＨＧＥ３（Ｍｉｃｒｏｂｉｘ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．）の使用により、Ｅ３の全長を有するＡｄ５の右側末端が提供される。

【００９１】

初期遺伝子の操作のために、Ａｄ５ Ｅ１Ａの転写開始部位は、このウイルスゲノムの４９８にあり、そしてＥ１Ａコードセグメントの ＡＴＧ開始部位はこのウイルスゲノムの５６０にある。この領域は、肝癌特異的ＴＲＥの挿入のために用いられ得る。制限部位は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を用いることによって導入され得、ここで、用いられるプライマーは、Ａｄ５ゲノムに制限されてもよく、またはＡｄ５ゲノムＤＮＡを保有するプラスミドの一部を含んでもよい。例えば、ｐＢＲ３２２が用いられる場合、プライマーは、ｐＢＲ３２２骨格におけるＥｃｏＲＩ部位およびＡｄ５のｎｔ１３３９におけるＸｂａＩ部位を用い得る。重複するプライマーがこの領域の中央にヌクレオチド配列変化を導入して独特の制限部位を生じるＰＣＲを２段階で行うことにより、その部位での肝細胞癌特異的ＴＲＥの挿入を提供し得る。

【００９２】

類似のストラテジーをまた、肝癌特異的ＴＲＥエレメントの挿入に用いて、Ｅ１Ｂを調節し得る。Ａｄ５のＥ１Ｂプロモーターは、ＳｐＩについての単一の高親和性認識部位およびＴＡＴＡボックスからなる。この領域は、Ａｄ５のｎｔ１６３６～ｎｔ１７０１に延びる。この領域におけるＴＲＥの挿入により、Ｅ１Ｂ遺伝子の細胞特異的転写を提供し得る。Ｅ１Ａを調節する細胞特異的応答エレメントを用いて改変された左側領域を、Ｅ１Ｂを調節するために肝癌特異的ＴＲＥを導入するためのテンプレートとして用いることにより、得られるアデノウイルスベクターは、Ｅ１ＡおよびＥ１Ｂの両方の発現について、細胞特異的転写因子に依存する。いくつかの実施形態では、Ｅ１Ｂの１９ｋＤａ領域の一部または全てが欠失している。

【００９３】

同様に、肝癌特異的ＴＲＥは、Ｅ２遺伝子の上流に挿入されて、その発現を細胞特異的にし得る。Ａｄ５において２７０５０～２７１５０にマッピングされる、Ｅ２初期プロモーターは、主要転写開始部位および副転写開始部位（後者は、Ｅ２転写産物の約５％を占める）、２つの非標準ＴＡＴＡボックス、２つのＥ２Ｆ転写因子結合部位およびＡＴＦ転写因子結合部位からなる（Ｅ２プロモーターの構造の詳細な概説については、Ｓｗａｍｉｎａｔｈａｎら，Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐｉｃｓ ｉｎ Ｍｉｃｒｏ．ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｌ．（１９９５）１９９（第３部）：１７７－１９４を参照のこと）。

【００９４】

Ｅ２後期プロモーターは、対向鎖によってコードされる遺伝子のコード配列と重複し、それゆえ、遺伝操作に容易に従うわけではない。しかし、Ｅ２初期プロモーターは、対向鎖の３３ｋＤタンパク質をコードする配列と数塩基対のみ重複する。明らかに、ＳｐｅＩ制限部位（Ａｄ５の２７０８２位）は、上記の３３ｋＤのタンパク質の停止コドンの一部であり、主要Ｅ２初期転写開始部位とＴＡＴＡ結合タンパク質部位とを、上流の転写因子結合部位Ｅ２ＦおよびＡＴＦから、便利に隔てる。それゆえ、ＳｐｅＩ末端を有する肝細胞癌特異的ＴＲＥの、第１鎖におけるＳｐｅＩ部位への挿入は、Ａｄ５の内因性Ｅ２初期プロモーターを破壊し、そしてＥ２転写産物の細胞限定発現を可能にするにちがいない。

【００９５】

Ｅ４については、アデノウイルスゲノムの右側部分を使用しなければならない。Ｅ４転写開始部位は主に約ｎｔ３５６０５に存在し、ＴＡＴＡボックスは約ｎｔ３５６３１に存在し、そしてＯＲＦＩの第１のＡＵＧ／ＣＵＧは、約ｎｔ３５５３２に存在する。Ｖｉｒｔａｎｅｎら（１９８４）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．５１：８２２－８３１。他の遺伝子についての上記のストラテジーのいずれかを用いて、ＵＰ－ＴＲＥは、転写開始部位から上流に導入され得る。肝細胞癌特異的ＴＲＥがＥ４領域に挿入された全長アデノウイルスの構築のためには、共トランスフェクションおよび相同組換えは、Ｅ４タンパク質をトランスで提供してこれらのタンパク質の合成の欠損を補完するＷ１６２細胞において実施される（Ｗｅｉｎｂｅｒｇら（１９８３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８０：５３８３－５３８６）。

【００９６】

Ｅ３領域を含むアデノウイルス構築物が作製され得、ここで、Ｅ３含有アデノウイルスプラスミド（例えば、ＢＨＧＥ３（Ｍｉｃｒｏｂｉｘ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ Ｉｎｃ．，Ｔｏｒｏｎｔｏ）と非Ｅ３含有アデノウイルスプラスミドとの間での相同組換えが実施される。

【００９７】

あるいは、Ｅ３領域を含むアデノウイルスベクターは、アデノウイルス構築物またはアデノウイルスプラスミド構築物とともに、細胞（例えば、２９３細胞）に導入され得、ここで、これらは、相同組換えを受けて、Ｅ３領域を含むアデノウイルスを生じ得る。この場合、Ｅ３含有アデノウイルスベクターおよびアデノウイルス構築物またはプラスミド構築物は、アデノウイルスの相補領域を含み、例えば、一方は左側領域を含み、他方は右側領域を含み、相同組換えを可能にするに充分な配列が重複する。

【００９８】

あるいは、本発明のＥ３含有アデノウイルスベクターは、標準的な組換え方法（例えば、制限ヌクレアーゼおよび／またはＰＣＲを用いる）、化学合成、またはこれらのいずれかの組合せを含め、他の従来方法を用いて構築され得る。さらに、Ｅ３領域の一部分の欠失は、分子生物学の標準的な技術を用いて作製され得る。

【００９９】

ベクターへのＩＲＥＳの挿入は、当該分野で公知であって本明細書中上記に記載される方法および技術（制限酵素消化、連結およびＰＣＲが挙げられるがこれらに限定されない）によって達成される。ＩＲＥＳのＤＮＡコピーは、例えば、ピコルナウイルスＩＲＥＳの化学合成によってまたはｃＤＮＡコピーを作製することによって入手され得る。例えば、ＥＭＣＶ ＩＲＥＳの説明についてはＤｕｋｅら（１９９５）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６６（３）：１６０２－９を、そしてＶＥＧＦ ＩＲＥＳの説明についてはＨｕｅｚら（１９９８），Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１８（１１）：６１７８－９０を参照のこと。内部翻訳開始配列は、マルチシストロン性ｍＲＮＡ中の５’遠位コード領域の上流にある部位において、ベクターゲノム中に挿入される。例えば、二シストロン性Ｅ１Ａ－Ｅ１Ｂ ｍＲＮＡの産生が肝癌特異的ＴＲＥの制御下にあるアデノウイルスベクターの好ましい実施形態では、Ｅ１Ｂプロモーターが欠失されるかまたは不活化され、そしてＩＲＥＳ配列がＥ１ＡとＥ１Ｂとの間に配置される。他の実施形態では、Ｅ１Ｂの１９ｋＤａの領域の一部または全てが欠失される。カルジオウイルスおよび特定のアフトウイルスのＩＲＥＳ配

列は、ＡＵＧコドンをＩＲＥＳの３’末端に含み、これは、リボソーム侵入部位および翻訳開始部位の両方として役立つ。従って、この型のＩＲＥＳは、その翻訳を調節するタンパク質の翻訳開始コドンを置換するためにベクター中に導入される。しかし、エンテロウイルス／ライノウイルスのクラスのＩＲＥＳにおいては、ＩＲＥＳの３’末端のＡＵＧは、リボソーム侵入のみに用いられ、そして翻訳は、次の下流のＡＵＧコドンにおいて開始される。従って、エンテロウイルス／ライノウイルスＩＲＥＳが、下流のコード領域の翻訳調節のためのベクターにおいて用いられる場合、下流の遺伝子のＡＵＧ（または他の翻訳開始コドン）は、ベクター構築物において保持される。

【０１００】

アデノウイルス粒子中にポリヌクレオチドをパッケージングする方法は当該分野で公知であり、そしてまた、共有に係るＰＣＴ　ＰＣＴ／ＵＳ９８／０４０８０に記載される。

【０１０１】

（治療方法）

有効量のアデノウイルスベクターは、生理食塩水溶液、適切な緩衝液、保存剤、安定剤を含むがこれらに限定されない、薬学的に受容可能な賦形剤中の組成物として（同じ組成物中であってもそうでなくてもよい）患者に投与され、そして制吐剤のような適切な薬剤とともに投与され得る。有効量は、臨床結果を含め、有利な結果または所望の結果をもたらすに充分な量である。有効量は、１以上の投与において投与され得る。本発明の目的のためには、有効量のアデノウイルスベクターは、疾患状態の進行を緩和、改善、安定化、逆転、緩徐化、または遅延させるために充分な量である。何人かの患者は、これらの処置に対して難治性であり、これらの方法がこれらの個体に対する投与を包含することが理解される。与えられるべき量は、個体の状態、疾患の程度、投与経路、どれくらいの用量が投与されるか、および所望の目的によって決定される。

【０１０２】

アデノウイルスベクターの送達は、一般に、部位特異的注射または静脈内注射のいずれかによって達成される。ベクターの部位特異的注射としては、例えば、肝臓の損傷への注射、ならびに腹腔内注射、胸膜腔内注射、クモ膜腔内注射、動脈内注射、腫瘍内注射または局所適用が挙げられ得る。これらの方法は、アデノウイルスベクターおよび化学療法剤の組合せを用いた処置に容易に適応され得る。

【０１０３】

アデノウイルスベクターは、リポソーム、当該分野で周知である一般的なトランスフェクション方法（例えば、リン酸カルシウム沈澱またはエレクトロポレーション）、直接注射、および静脈内注入を含むがこれらに限定されない種々の方法で、標的細胞へと送達され得る。送達手段は、特定のアデノウイルスベクター（その形態を含む）ならびに標的細胞の型および位置（すなわち、細胞がインビトロにあるかまたはインビボにあるか）に大部分が依存する。

【０１０４】

パッケージングされたアデノウイルスとして用いられる場合、アデノウイルスベクターは、適切な生理学的に受容可能なキャリア中で、約10^4～約10^{14}の用量で投与され得る。感染多重度は一般に、約０．００１～１００の範囲にある。ポリヌクレオチド構築物として投与される場合（すなわち、ウイルスとしてパッケージングされない場合）、約０．０１μｇ～約１０００μｇのアデノウイルスベクターが投与され得る。このアデノウイルスベクターは、意図される用途および宿主の免疫応答の潜在能力に依存して１回以上投与され得、そしてまた複数の同時の注射としても投与され得る。免疫応答が望ましくない場合、免疫応答は、種々の免疫抑制剤を用いることによって、または強い免疫応答を伴わずに反復投与を可能にするためにアデノウイルス抗体を血液から除去する免疫吸着手順（例えば、免疫アフェレーシス）のような技術を用いることによって低減され得る。別のウイルス形態（例えば、ＨＳＶ）としてパッケージングされる場合、投与されるべき量は、特定のウイルスについての標準的な知識（これは、例えば、公開された文献から容易に入手され得る）に基づき、そして経験的に決定され得る。

【０１０５】
本発明の実施形態としては、共有に係る米国出願第０９／８１４，３５７号に詳述される通りの、新形成を有する個体への肝癌特異的アデノウイルスベクターと第２の抗新生物治療との組合せの投与のための方法が挙げられ、第２の抗新生物治療は、放射線、抗新生物剤などを含み得る。米国出願第０９／８１４，３５７号は、本明細書中に明白に、参考として援用される。化学療法剤およびアデノウイルスは、同時または順次で、順次の投与については種々の時間間隔を伴って投与され得る。いくつかの実施形態では、有効量のアデノウイルスベクターおよび有効量の少なくとも１つの抗新生物剤は、適切な賦形剤および／または緩衝溶液と組み合わされ、そして本明細書中に列挙される方法または当該分野で公知の方法のうちのいずれかによって同じ溶液から同時に投与される。これは、アデノウイルスベクター自体の生存率および／または活性を抗新生物剤が損なわない場合に適用可能である。

【０１０６】
１つより多くの抗新生物剤が投与される場合、この薬剤は、同じ組成物中で一緒に投与され得るか；任意の順序で順次投与され得るか；あるいは、異なる組成物中で同時に投与され得る。この薬剤が順次投与される場合、投与は、さらに時間の遅れを含み得る。順次の投与は、任意の順序であってもよく、従って、最初の有効量のアデノウイルスベクターの投与、続いて有効量の化学療法剤の投与を包含する。アデノウイルスの投与と化学療法剤の投与との間の間隔は、少なくとも、数分間、数時間または数日間（あるいは、未満）の期間であり得る。順次の投与はまた、選択された抗新生物剤の投与、続いてアデノウイルスベクターの投与を包含する。投与の間の間隔は、少なくとも数分間、数時間または数日間（あるいは、未満）の期間であり得る。

【０１０７】
上記の方法の投与はまた、とりわけ、個体の応答および個体の疾患の特徴に依存して、標的細胞特異的アデノウイルスおよび化学療法剤の反復投薬またはクールを包含し得る。反復投薬は、最初の処置クールの直後（すなわち、１日以内）に、または数日間、数週間もしくは数ヶ月の間隔の後に行われて、腫瘍増殖の抑制を達成および／もしくは維持し得る。上記の方法による特定の処置クール（例えば、組み合わされたアデノウイルス治療および化学療法）の後には、続いて、組み合わされた放射線療法およびアデノウイルス治療のクールが行われ得る。

【０１０８】
抗新生物剤としては、以下を含むがそれらに限定されない主なクラスの化学療法剤の各々からのものが挙げられる：アルキル化剤、アルカロイド、代謝拮抗物質、抗腫瘍性抗生物質、ニトロソウレア、ホルモンアゴニスト／アンタゴニストおよびアナログ、免疫調節因子、光感作剤（ｐｈｏｔｏｓｅｎｓｉｔｉｚｅｒ）、酵素など。いくつかの実施形態では、抗新生物剤は、アルカロイド、代謝拮抗物質、抗生物質またはアルキル化剤である。特定の実施形態では、抗新生物剤としては、例えば、チオテパ、インターフェロンα－２ａ、およびＭ－ＶＡＣ組合せ（メトトレキサート－ビンブラスチン、ドキソルビシン、シクロホスファミド）が挙げられる。好ましい抗新生物剤としては、例えば、５－フルオロウラシル、シスプラチン、５－アザシチジンおよびゲムシタビンが挙げられる。特に好ましい実施形態としては、５－フルオロウラシル、ゲムシタビン、ドキソルビシン、ミトザントロン（ｍｉｒｏｘａｎｔｒｏｎｅ）、マイトマイシン、ダカルバジン、カルムスチン、ビンブラスチン、ロムスチン、タモキシフェン、ドセタキセル（ｄｏｃｅｔａｘｅｌ）、パクリタキセルまたはシスプラチンが挙げられるがこれらに限定されない。両方の化学療法剤の具体的な選択は、とりわけ、処置されるべき疾患の特徴に依存する。これらの特徴としては、腫瘍の位置、疾患の病期および（存在する場合）以前の処置に対する個体の応答が挙げられるがこれらに限定されない。

【０１０９】
特定のアデノウイルスベクターと組み合わせた単一の抗新生物剤の使用に加えて、本発明はまた、アデノウイルスベクターと組み合わせた、１より多くの薬剤の使用を包含する

。新形成を処置するために用いられる場合の抗新生物剤のこれらの組合せは、しばしば、多剤併用化学療法と呼ばれ、しばしば、個体の癌の特徴に依存して、外科手術および／または放射線をも含み得る、組み合わされた治療法の処置の一部である。本発明の組み合わされたアデノウイルス／化学療法もまた、組み合わされた治療法の処置プログラムの一部として用いられ得ることが意図される。

【０１１０】

経口方法および非経口方法を含め、当該分野で周知である、抗新生物剤の投与のための種々の送達方法が存在する。低いバイオアベイラビリティ、消化管の刺激および複雑な薬物組合せを投与することを思い出すことの必要性を含め、多数の抗新生物剤について経口投与することについての多くの欠点が存在する。抗新生物剤の非経口投与の大部分は静脈内である。なぜなら、筋肉内注射および皮下注射はしばしば、組織への刺激または損傷を導くからである。非経口注射の局所的バリエーションとしては、動脈内注射、膀胱内注射、腫瘍内注射、クモ膜腔内注射、胸膜腔内注射、腹腔内注射および腔内注射が挙げられる。

【０１１１】

化学療法剤についての送達方法としては、静脈内方法、非経口（ｉｎｔｒａｐａｒｅｎｔｅｒａｌ）方法および腹腔内方法（ｉｎｔｒｏｐｅｒｉｔｏｎｅａｌ）、ならびに経口投与が挙げられる。静脈内方法また、四肢の静脈を通した送達を包含し、そして、より部位特異的な送達（例えば、肝臓門脈への静脈内点滴）を包含する。他の非経口送達方法としては、例えば、皮下、腔内または腫瘍内での、抗新生物剤溶液の直接注射が挙げられる。

【０１１２】

特定の処置レジメンの効力の評価は、画像化技術、血清腫瘍マーカーの分析、生検、腫瘍関連症状の存在、不存在または改善などの診断方法を含め、当該分野で公知の技術のいずれかによって決定され得る。所定の処置レジメンが、効力を最大にするために適切に改変され得ることが理解される。

【０１１３】

以下の実施例は、当業者に、本発明をどのように作製して使用するかの完全な開示および説明を提供するために示され、本発明者らが発明と考える範囲を限定する意図はなく、以下の実験が行った実験の全てまたは唯一の実験であることを示すことを意図もしない。用いる数字（例えば、量、温度など）に関する精度を確実にする努力を行ったが、何らかの実験誤差および偏差があるはずである。他に示されない限り、部は、重量部であり、分子量は、重量平均分子量であり、温度は℃であり、そして圧力は大気圧またはその付近である。

【０１１４】

本明細書中に引用される全ての刊行物および特許出願は、あたかも各個々の刊行物または特許出願が、参考として援用されると具体的にかつ個別に示されたかのように、本明細書中に参考として援用される。

【０１１５】

本発明は、本発明の実施についての好ましい形態を含むことが本発明者らによって見出されたかまたは提唱される特定の実施形態に関して記載されている。本開示に照らせば、例示された特定の実施形態に多数の改変および変更が、本発明の意図された範囲から逸脱することなく行われ得ることが当業者によって認識される。例えば、コドンの重複性に起因して、タンパク質配列に影響を与えることなく、基礎となるＤＮＡ配列に変更が行われ得る。さらに、生物学的機能の等価性の考慮事項に起因して、種類または量における生物学的作用に影響を与えることなく、タンパク質構造において変更が行われ得る。このような全ての改変が、添付の特許請求の範囲内に含まれるべきであることが意図される。

【実施例】

【０１１６】

以下の実施例は、例示として提供されるのであって、限定のために提供されるのではな

い。

【０１１７】

（実験）

肝細胞癌（ＨＣＣ）マウスモデルを用いて、ＣＲＧ－Ｌ２遺伝子がＨＣＣ組織において特異的に発現されるが、正常肝組織においては発現されないことが示された。このモデルでは、インサイチュハイブリダイゼーションは、ＣＲＧ－Ｌ２ｍＲＮＡレベルがＨＣＣの初期発達の間に上昇することを示した（Ｇｒａｖｅｅｌら（２００３）Ｏｎｃｏｇｅｎｅ　２２：１７３０－１７３６を参照のこと）。ヒトでは、ＣＲＧ－Ｌ２　ｍＲＮＡは、ＨＣＣ組織においてアップレギュレートされるが、胎盤を除く正常組織においては制限された発現を提示する。この知見に基づき、ＣＧＩは、ＣＲＧ－Ｌ２　ＴＲＥをクローニングする協同研究を開始した。

【０１１８】

ＣＲＧ－Ｌ２の転写調節エレメントを特徴付けるために、ＣＲＧ－Ｌ２遺伝子の上流の一連のクローン化ＤＮＡフラグメントを分析した。ＣＲＧ－Ｌ２遺伝子の上流領域由来の０．７ｋｂのＤＮＡフラグメントは、ＨＣＣ細胞株においてプロモーター活性を有することが示された（図１）。構築物ＣＰ１５０５（ＣＲＧ－Ｌ２　０．７ｋｂ）、ｐＧＬ２（プロモーターのないルシフェラーゼ構築物）、およびＡＦＰルシフェラーゼ構築物を、Ｈｅｐ３Ｂ細胞およびＨｕＨ７細胞にトランスフェクトした。７２時間後、細胞を収集し、そしてルシフェラーゼ活性についてアッセイした。図３に示したデータは、ＣＰ１５０５でトランスフェクトしたＨｅｐ３Ｂ細胞およびＣＰ１５０５でトランスフェクトしたＨｕＨ７細胞が両方とも顕著なルシフェラーゼ活性を生じることを示した。対照的に、ＨＢＬ－１００細胞において検出されたルシフェラーゼ活性（図４）は、Ｈｅｐ３Ｂ細胞およびＨｕＨ７細胞において見られた活性よりも８～１０倍低かった。このことは、細胞特異性を示す。

【０１１９】

上記の結果から、アデノウイルスが特定の宿主細胞についての特異性を発展させ得ることが明らかであり、ここで、このウイルスは複製能力がある。これらのウイルスは、特定の標的細胞への広範囲の遺伝子の導入のためのビヒクルであり得る。

【０１２０】

本発明はいまや充分に記載されており、添付の特許請求の範囲の趣旨または範囲から逸脱することなく、多くの変更および改変が本発明に行われ得ることが当業者には明らかである。

【図面の簡単な説明】

【０１２１】

【図１】ＣＲＧ－Ｌ２の０．８ＫｂのＴＲＥ　ＤＮＡの配列。

【図２】ＣＲＧ－Ｌ２の０．７ＫｂのＴＲＥ　ＤＮＡ配列を含む、ＣＰ１５０５ルシフェラーゼレポーター構築物。

【図３】肝細胞癌細胞におけるプロモーター活性を評価するためのレポーター遺伝子アッセイ。Ｈｅｐ３Ｂ細胞株およびＨｕＨ７　ＨＣＣ細胞株におけるＣＲＧ－Ｌ２　プロモーター活性は、ｐＧＬ２ネガティブコントロールよりも１００倍以上高い。両方の細胞株はＡＦＰポジティブであるので、ＡＦＰプロモーターをポジティブコントロールとして用いた。

【図４】Ｈｅｐ３Ｂ細胞、ＨｕＨ７細胞およびＨＢＬ－１００細胞におけるＣＲＧ－Ｌ２プロモーター発現。ＨＢＬ－１００細胞におけるＣＲＧ－Ｌ２の発現は、Ｈｅｐ３Ｂ細胞およびＨｕＨ７細胞においてよりも８～１０倍低い。このことは、細胞特異性を示唆する。

【図１】

```
ACCTCCCATGGACAGTGGGCACGTGCCTTAGCATCTGGGCATGCTGATCTTTTTCTCCAA     60
GAGGGCAGTGTGGGGGTAGAAGGGGGTGGAATCCGGAGACTTCTCTCCATAAGAATTCCT    120
GCTCTCCCCCTCAGTCTGACCCTTGCTTTGCCTGTCTGGGCCACGGCAATGCCCTCAGGC    180
AGAGCAGTGGGAAGAGGAGGAGAGGGTTTGCTCAGCTGGCGGGACTCTGGGAGCACGAGC    240
CCTGCCAGCCCCTCCTCCGCAGGCTGCCTCCACTGGCTCCTCTCCTGCTTCTGCCCGCCT    300
GTCCCTCTGGGCTGCTCGGGCGCCACCACTACTGTCCCCATCCCGCCCCGCCAGCTGGGC    360
CAAAGGGTGACTTGACTCACGACGCTGCCACCAGCCCACGGCTTGCCCGAGGCGTATAAA    420
GGCTGCCAGGGCCGCAGGCTGCCAAGCCCTGCCCTGCCCAAGGCGCATAGAGCATGGCCC    480
GAGGCGCTGAGGGAGGCCGTGGGGACGCGGGTTGGGGCCTGCGTGGCGCCCTGGCGGCCG    540
TGGCGCTGCTCTCGGCGCTCAACGCTGCGGGCACGGTGTTCGCGCTGTGCCAGTGGCGCG    600
GGCTGAGCTCGGCGCTGCGGGCTTTGGAGGCGCAGCGGGGCCGGGAGCAGCGCGAGGACA    660
GTGCCCTGCGCTCCTTCCTGGCCGAGTTGAGCCGCGCGCCGCGCGGGGCGTCCGCACCAC    720
CCCAAGACCCGGCCAGCTCAGCTCGCAACAAGCGCAGCCACAGCGGCGAGCCCGCGCCGC    780
ATATCCGCGCCGAGAGCCATGAC                                          803
```

Figure 1

【図２】

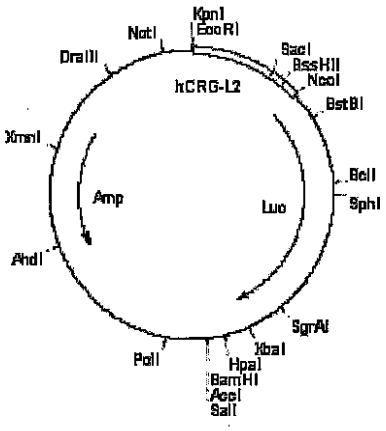


FIGURE 2

【図３】

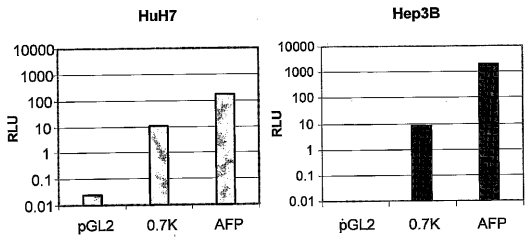


FIGURE 3

【図４】

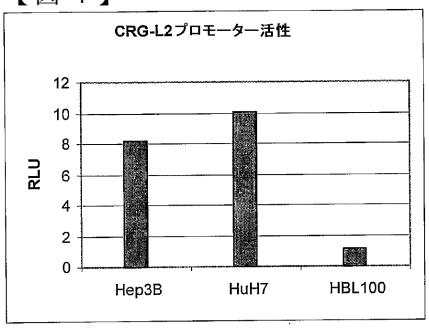


FIGURE 4

【配列表】
2007508036000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/31477

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : C07H 21/04; C12N 15/861
US CL : 536/24.1; 435/320.1
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 536/24.1; 435/320.1

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2002/0115094 A1 (FARNHAM et al) 22 August 2002 (22.08.2002), see entire document	1-21
X	US 2003/0148520 A1 (YU et al) 07 August 2003 (07.08.2003) pages 27, 31, 35, 36.	1, 2, 6, 7, 10, 11, 13-21

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

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 February 2005 (22.02.2005)

Date of mailing of the international search report
17 MAR 2005

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer
Nancy T. Vogel
Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/31477

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
RAST, STN file Medline, SEQ ID NO:1 search
search terms: adenovir?, vector, CRG-L2, TRE, promoter, liver, hepato?

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	***35/76***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	35/76		
Ｃ１２Ｎ	***1/15***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	1/15		
Ｃ１２Ｎ	***1/19***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	1/19		
Ｃ１２Ｎ	***1/21***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	1/21		
Ｃ１２Ｎ	***5/10***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	5/00	Ａ	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 アローヨー, トリーニ
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９５１２５, サン ホゼ, クラーク ストリート １１８８
(72)発明者 リー, ユアンハオ
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４３０６, パロ アルト, アーヴェン コート ５６８

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA02 DA02 EA02 EA04 FA20 HA17
4B065 AA01X AA57X AA90X AA93X AA93Y AA95X AB01 BA02 CA28 CA44
4C084 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18 CA33 DA27 MA01 NA14
ZB261 ZB332
4C087 BC83 CA12 NA14 ZB26 ZB33