(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2005-524389
(P2005-524389A)
(43)公表日　平成17年8月18日(2005.8.18)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
C12N 5/10	C12N 5/00	ZNAB	4B024
A61K 31/7088	A61K 31/7088		4B065
A61K 31/711	A61K 31/711		4C076
A61K 45/00	A61K 45/00		4C084
A61K 47/42	A61K 47/42		4C086

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 29 頁）　最終頁に続く

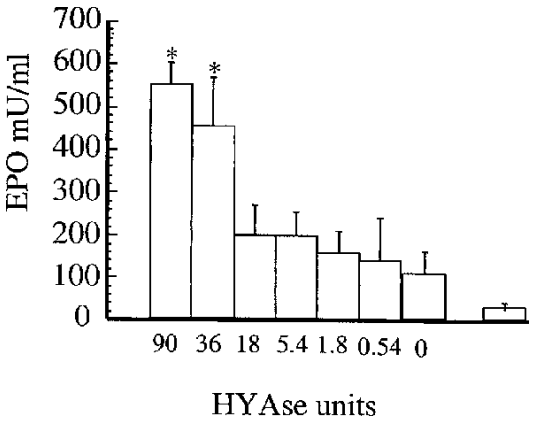
(21)出願番号　特願2003-546939 (P2003-546939)
(86)(22)出願日　平成14年11月21日 (2002.11.21)
(85)翻訳文提出日　平成16年7月23日 (2004.7.23)
(86)国際出願番号　PCT/EP2002/013097
(87)国際公開番号　WO2003/045438
(87)国際公開日　平成15年6月5日 (2003.6.5)
(31)優先権主張番号　60/333,338
(32)優先日　平成13年11月26日 (2001.11.26)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　501209427
イステイチユート・デイ・リチエルケ・デイ・ビオロジア・モレコラーレ・ピ・アンジエレツテイ・エツセ・ピー・アー
イタリー国、イ－０００４０・ポメツイア、ビア・ポンテイーナ・キロメトロ・３０．６００
(74)代理人　100062007
弁理士　川口　義雄
(74)代理人　100113332
弁理士　一入　章夫
(74)代理人　100114188
弁理士　小野　誠
(74)代理人　100103920
弁理士　大崎　勝真

最終頁に続く

(54)【発明の名称】宿主組織内への核酸分子の電気的遺伝子導入の増強

(57)【要約】
電気刺激と生物学的に活性な量のヒアルロニダーゼの投与との相乗的工程を組合せることを含む、脊椎動物宿主への医薬物質（例えば核酸分子）の運搬方法を開示する。ヒアルロニダーゼと医薬物質（例えば核酸分子）とを含む製剤も開示する。ヒアルロニダーゼ調製物は、好ましくは、該医薬物質の前またはそれと同時に、および適用される電気刺激と共に適用されて、電気刺激のみの場合と比較して標的組織内への医薬物質集団の導入の増強をもたらす。ヒアルロニダーゼの投与と電気刺激との組合せは、標的脊椎動物宿主組織への医薬物質（例えば核酸分子）の導入における実質的な増強をもたらす。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
脊椎動物宿主の組織内に医薬物質を運搬する方法であって、
ａ）生物学的に有効な量のヒアルロニダーゼを該脊椎動物宿主の組織に投与し、
ｂ）工程ａ）のヒアルロニダーゼ投与の運搬部位付近に該医薬物質を投与し、
ｃ）工程ａ）および工程ｂ）の運搬箇所付近に電気刺激を適用することを含んでなり、
その結果、該脊椎動物宿主の組織に運搬される生物学的に有効な医薬物質の量が、電気刺激および医薬物質のみの適用の場合より多くなることを特徴とする方法。
【請求項２】
該脊椎動物宿主が哺乳動物宿主である、請求項１記載の方法。
【請求項３】
該哺乳動物宿主が非ヒト霊長類である、請求項２記載の方法。
【請求項４】
該哺乳動物宿主がヒトである、請求項２記載の方法。
【請求項５】
該ヒトのヒト筋組織が該医薬物質の運搬の標的となる、請求項４記載の方法。
【請求項６】
該ヒト筋組織が骨格筋組織である、請求項５記載の方法。
【請求項７】
該医薬物質が核酸分子である、請求項１、２、３、４、５または６記載の方法。
【請求項８】
該核酸分子がＤＮＡプラスミド分子である、請求項７記載の方法。
【請求項９】
脊椎動物宿主の組織内に医薬物質を運搬する方法であって、
ａ）電気刺激の適用より約４時間前までに、生物学的に有効な量のヒアルロニダーゼを該脊椎動物宿主の組織に投与し、
ｂ）工程ａ）のヒアルロニダーゼ投与の運搬部位付近に該医薬物質を投与し、
ｃ）工程ａ）および工程ｂ）の運搬箇所付近に電気刺激を適用することを含んでなり、
その結果、該脊椎動物宿主の組織に運搬される生物学的に有効な医薬物質の量が、電気刺激および医薬物質のみの適用の場合より多くなることを特徴とする方法。
【請求項１０】
該脊椎動物宿主が哺乳動物宿主である、請求項９記載の方法。
【請求項１１】
該哺乳動物宿主が非ヒト霊長類である、請求項１０記載の方法。
【請求項１２】
該哺乳動物宿主がヒトである、請求項１０記載の方法。
【請求項１３】
該ヒトのヒト筋組織が該医薬物質の運搬の標的となる、請求項１２記載の方法。
【請求項１４】
該ヒト筋組織が骨格筋組織である、請求項１３記載の方法。
【請求項１５】
該医薬物質が核酸分子である、請求項９、１０、１１、１２、１３、１４または１５記載の方法。
【請求項１６】
該核酸分子がＤＮＡプラスミド分子である、請求項１５記載の方法。
【請求項１７】
脊椎動物宿主の組織内に医薬物質を運搬する方法であって、
ａ）電気刺激の適用より約４時間前までに、生物学的に有効な量のヒアルロニダーゼを該脊椎動物宿主の組織に投与し、
ｂ）工程ａ）のヒアルロニダーゼ投与の運搬部位付近に該医薬物質を投与し、

ｃ）工程ａ）および工程ｂ）の運搬箇所付近に電気刺激を適用することを含んでなり、
その結果、該脊椎動物宿主の組織に運搬される生物学的に有効な医薬物質の量が、電気刺激および医薬物質のみの適用の場合より多くなり、
工程ａ）のヒアルロニダーゼおよび工程ｂ）の医薬物質が単一の製剤を構成し、該製剤が工程ｃ）の電気刺激の適用の前または該適用と共に投与されることを特徴とする方法。
【請求項１８】
該脊椎動物宿主が哺乳動物宿主である、請求項１７記載の方法。
【請求項１９】
該哺乳動物宿主が非ヒト霊長類である、請求項１８記載の方法。
【請求項２０】
該哺乳動物宿主がヒトである、請求項１８記載の方法。
【請求項２１】
該ヒトのヒト筋組織が該医薬物質の運搬の標的となる、請求項２０記載の方法。
【請求項２２】
該ヒト筋組織が骨格筋組織である、請求項２１記載の方法。
【請求項２３】
該医薬物質が核酸分子である、請求項１７、１８、１９、２０、２１または２２記載の方法。
【請求項２４】
該核酸分子がＤＮＡプラスミド分子である、請求項２３記載の方法。
【請求項２５】
直接的な針注射によりヒアルロニダーゼを投与する、請求項１、９または１７記載の方法。
【請求項２６】
工程ｃ）の電気刺激の適用の約３０分～２時間前に、工程ａ）のヒアルロニダーゼを投与する、請求項１記載の方法。
【請求項２７】
工程ｃ）の電気刺激の適用の約１５分～４５分前に、工程ａ）のヒアルロニダーゼを投与する、請求項１記載の方法。
【請求項２８】
ヒアルロニダーゼと医薬物質とを含んでなる製剤。
【請求項２９】
該医薬物質が核酸分子である、請求項２８記載の製剤。
【請求項３０】
該核酸分子がＤＮＡプラスミド分子である、請求項２９記載の製剤。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、脊椎動物宿主（例えば、ヒトまたは動物宿主）内への医薬物質（例えば、核酸分子）の電気的導入の効率の増強（促進）に関する。本発明の方法は更に、それぞれの医薬物質の投与および電気刺激の前またはそれらと同時に生物学的に有効な量のヒアルロニダーゼを投与して、電気的刺激のみの場合と比較して標的組織内への医薬物質集団の導入の増強をもたらすことに関する。そのような方法は、それぞれの宿主の標的組織における核酸分子の導入および発現の効率を改善するものである。また、本発明は、タンパク質およびペプチドのような他の化合物と共に使用することが可能である。
【０００２】
ヒアルロニダーゼと医薬物質とを含む製剤も開示する。そのような製剤は、適当な電気刺激と組合される、これらの２つの成分の単一の投与を可能にする。
【背景技術】
【０００３】

電気エネルギーの十分な適用は膜の透過性を増加させて、膜または組織に溶液がより容易に拡散するのを可能にして所望の効果を達成させる点で、適用された電気エネルギーは生体膜に影響を及ぼしうることが、種々の研究から示されている。一般に、電気的または電磁的刺激の効果はイオントホレシス、電気泳動またはエレクトロポレーション（これらは「電気的刺激」または「電気刺激」、あるいは核酸分子の導入の場合には「電気的遺伝子導入」または「ＥＧＴ」と総称され、異なる形態の電気刺激であるか、または電磁場の効果を解釈するための異なる方法である）の１以上に基づいて説明されている。イオントホレシスは、一般には、直流電流の適用による、皮膚のような無傷膜を介したイオン化物質の導入に関連したものである。おそらく、電流がイオンを運び、および／または組織内のイオンの移動度を増加させるのであろう。電気泳動は、電場の影響下での流体またはゲル内のイオンの移動に関連したものである。エレクトロポレーションにおいては、電場（しばしば、パルス化されたもの）およびそれに伴う誘導電流が、膜（典型的には細胞膜）内の微小孔の形成を誘発する。これらの孔は一般には「電気穿孔」と称され、それを形成させる方法がエレクトロポレーション（電気穿孔法）である。エレクトロポレーションの潜在的応用においては、医薬物質、分子、イオンおよび／水のような溶液が、電気的に形成された孔を介して、膜の一方の側から他方の側へ、より容易に通過することが可能である。該孔は、好ましくは、電場の適用中に一時的に維持される。電場の適用後、短時間のうちに該孔は閉じるか又は元に戻るべきである。しかし、元に戻るまでの時間は電気刺激の振幅および持続時間に左右され、適用する瞬時出力レベルが高すぎたり及び／又は刺激持続時間が長すぎると組織を永久的に損傷する可能性がある。その損傷は、過度に大きな若しくは多数の孔の形成または組織の抵抗熱発生またはそれらの両方によるものであろう。

【０００４】

電気的に誘発された孔はインビトロでは或る程度は観察され研究されており、この場合、溶液中の細胞はお互いから実質的に独立しており、見えるように露出している。インビボでは、そのような状況は容易には観察されない。最も妥当と考えられる顕微鏡規模で特定の部位において観察を行うことができても、組織内の電場および電流密度のばらつきの影響のため、あるいは観察を行うのに使用した装置による誘発のため、それは例外的なものであろう。

【０００５】

遺伝子治療および免疫療法は組織のエレクトロポレーションの候補適用対象である。組織の電気刺激においては、接触装置および非接触装置の使用が可能である。接触装置においては、標的部位の反対側に付着した導電性電極を使用して、標的組織部位に物理的に接触させることにより、信号を与える。非接触装置においては、同様に該部位の反対側に配置された電極またはコイルを使用して、電場または磁場を発生させることが可能である。接触装置の例では、組織はリアクタンス性成分（キャパシタンスまたはインダクタンス）を有していることがあり、組織の導電率は、エネルギーの適用の影響のため（例えば、加熱のため）、時間と共に変化しうるが、一般には、組織の電気的応答はオームの法則に従う。

【０００６】

直接的なプラスミドＤＮＡ遺伝子導入には、ウイルス遺伝子および脂質粒子に伴う潜在的な問題がないため、該遺伝子導入は、現在、多数の新興的治療方法の基礎となっている（例えば、Ｖａｎ　Ｄｅｕｔｅｋｏｍら，１９９８；Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．Ｔｏｄａｙ　４：２１４－２２０；ＴｒｅｃｏおよびＳｅｌｄｅｎ，１９９５，Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．Ｔｏｄａｙ　１：３１４－３２１を参照されたい）。骨格筋媒介性プラスミドは、免疫適格宿主において、何ヶ月または何年にもわたり効率的に発現されており（例えば、Ｗｏｌｆｆら，１９９２，Ｈｕｍ．Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．１：３６３－３６９；Ｄａｖｉｓら，１９９３；Ｍａｎｔｈｏｒｐｅら，１９９３，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．４：４１９－４３１を参照されたい）、トランスジーンの発現および生理的または治療的応答、例えばワクチンおよび抗炎症性応答またはヘマトクリット（Ｈｃｔ）の増加をもたらしている（例えば

、Ｄａｖｉｓら，１９９６；Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９３：７２１３－７２１８；Ｋｅｓｓｌｅｒら，１９９６；Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．９３：１４０８２－１４０８７；Ｋｒｅｉｓｓら，１９９９，Ｊ．ｏｆ Ｇｅｎｅ Ｍｅｄ．１：２４５－２５０；Ｌｅｖｙら，１９９６，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ３：２０１－２１１；Ｍｉｌｌｅｒら，１９９５，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ２：７３６－７４２；Ｓｏｎｇら，１９９８；Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１０１：２６１５－２６２１；Ｔｒｙｐａｔｈｙら，１９９６，ＰＮＡＳ ９３：１０８７６－１０８８０を参照されたい）。しかし、外来遺伝子発現の個体間のばらつきが大きいこと、および治療用タンパク質の発現レベルが低いこと（特に、大動物において）（Ｊｉａｏら，１９９２，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ３：２１－３３を参照されたい）は、裸ＤＮＡの注入を臨床用途に用いることに対する限定要因である。それにもかかわらず、プラスミドＤＮＡの効率的な導入方法の開発は種々の疾患における適用において理想的であろう。

【０００７】

２０００年８月２９日付けでＭａｔｈｉｅｓｅｎらに発行された米国特許第６，１１０，１６１号（ＷＯ ９８／４３７０２およびＭａｔｈｉｅｓｅｎ，１９９９，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ６：５０８－５１４も参照されたい）は、約２５Ｖ／ｃｍ～約２５０Ｖ／ｃｍの範囲の算出電場強度での骨格筋のインビボ電気刺激を開示している。

【０００８】

ＷＯ ９９／０１１５８、ＷＯ ９９／０１１５７およびＷＯ ９９／０１１７５は、裸ＤＮＡのインビボ電気刺激を促進するための長い持続時間にわたる低電圧の使用を開示している。標的組織に応じて、約１Ｖ／ｃｍ～約６００Ｖ／ｃｍの電場強度または電圧傾度が開示されている。これは、最小効果から潜在的損傷レベルまでの比較的広い範囲を含んでいる。しかし、より一層高い電圧傾度が提示されている。

【０００９】

米国特許第５，８１０，７６２号、米国特許第５，７０４，９０８号、米国特許第５，７０２，３５９号、米国特許第５，６７６，６４６号、米国特許第５，５４５，１３０号、米国特許第５，５０７，７２４号、米国特許第５，５０１，６６２号、米国特許第５，４３９，４４０号および米国特許第５，２７３，５２５号は、エレクトロポレーション／電気刺激法および関連装置を開示しており、これらにおいては、それぞれの組織における有用な電場強度範囲が約２００Ｖ／ｃｍ～約２０ＫＶ／ｃｍであると示唆されている。米国特許第５，９６８，００６号および第５，８６９，３２６号は更に、あるインビボ電気刺激法には僅か１００Ｖ／ｃｍの電場強度が有用であると示唆している。

【００１０】

Ｊａｒｏｓｚｅｓｋｉら（１９９９，Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ ３５：１３１－１３７）は、電気的に媒介されるインビボ遺伝子運搬技術の現在の状況を概説している。その著者は、腫瘍細胞への化学療法剤の運搬でのこれまでの成功を強調しており、この分野における初期の結果のいくつかを考察している。

【００１１】

Ｔｉｔｏｍｉｒｏｖら（１９９１，Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ａｃｔａ １０８８：１３１－１３４）は、２つのプラスミドＤＮＡ構築物を皮下に運搬し、ついで、４００Ｖ／ｃｍ～６００Ｖ／ｃｍの電場強度を与える皮膚ヒダの電気刺激を行った。

【００１２】

Ｈｅｌｌｅｒら（１９９６，ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔｅｒｓ ３８９：２２５－２２８）は、環状配置の電極間で次々と循環する高電圧パルス（１１．５ＫＶ／ｃｍ）を発生させることにより、２つのレポーター遺伝子を発現するプラスミドＤＮＡをラット肝臓組織に運搬した。

【００１３】

Ｎｉｓｈｉら（１９９６，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５６：１０５０－１０５５）は、レポーター遺伝子を発現するプラスミドＤＮＡをラット脳組織へ運搬した。その著者は約６

００Ｖ／ｃｍの電場強度を用いた。
【００１４】
Ｚｈａｎｇら（１９９６，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．２２０：６３３－６３６）は、１２０Ｖのパルスを皮膚ヒダにかけて、プラスミドＤＮＡをマウス皮膚に経皮的に運搬した。この場合、電極間の距離は僅か約１ｍｍであった。
【００１５】
Ｍｕｒａｍａｔｓｕら（１９９７，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．２２３：４５－４９）は、１０ｍＳのパルス持続時間での１００Ｖのパルスによる、マウス精巣細胞へのプラスミドＤＮＡのトランスフェクションを報告している。
【００１６】
Ｒｏｌｓら（１９９８，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １６（２）：１６８－１７１）は、４．２ｍｍ間隔の電極間に約３００～４００Ｖの電圧をかけることによる、マウス腫瘍細胞へのプラスミドＤＮＡのトランスフェクションを報告している。
【００１７】
ＡｉｈａｒａおよびＭｉｙａｚａｋｉ（１９９８，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １６：８６７－８７０）は、電極間距離３～５ｍｍで一定電圧（６０Ｖ）の方形波形パルス（５０ｍＳの持続時間）を送ることによる、マウス筋組織内でのβ－ｇａｌのインビボ発現を報告している。
【００１８】
Ｖｉｃａｔら（２０００，Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ １１：９０９－９１６）は、高電圧（９００Ｖ）で短いパルス（１００＿Ｓ）の電気刺激法が標的細胞（この場合はマウス筋細胞）内での発現の延長を引き起こすことを示している。
【００１９】
Ｗｉｄｅｒａら（２０００，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ １６４：４６３５－４６４０）は、５ｍｍ間隔の導電性電極で１００ボルトをかけて、Ｂ型肝炎表面抗原、ＨＩＶ ｇａｇおよびｅｎｖをコードするＤＮＡワクチンをインビボでマウスおよびモルモットに運搬している。
【００２０】
Ｓｕｚｕｚｋｉら（１９９８，ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．４２５：４３６－４４０）は、２５、５０および１００Ｖの電圧をラットの肝葉にかけている。その著者は、５０Ｖでの８パルス（それぞれ５０ｍｓ）がＧＦＰの発現に最適であることを見出した。
【００２１】
Ｇｏｔｏら（２０００，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．９７：３５４－３５９）は、環状配置の６個の針状電極による電圧パルス（約６６Ｖ／ｃｍの電場強度）によるマウスの腫瘍へのジフテリア毒素の「Ａ」断片およびＨＳＶ ＴＫ遺伝子の運搬がマウスにおける腫瘍増殖を減少させることを示している。
【００２２】
Ｏｓｈｉｍａら（１９９８，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ５：１３４７－１３５４）は角膜上皮へのＥＧＴを示している。
【００２３】
Ｆａｖｒｅ（２０００，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ７：１４１７－１４２０）は、ＨＹＡｓｅが、注入組織内でのウイルス拡散を増加させることによりラット骨格筋内へのアデノ随伴ウイルス媒介性遺伝子導入を増強することを示している。
【００２４】
Ｆｒｏｍｅｓら（２０００，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ６：６８３－６８８）は、ＨＹＡｓｅとコラゲナーゼとの混合物がラット心筋内でのアデノウイルス拡散を増加させることを示している。
【００２５】
Ｂａｔｒａら（１９９７，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７２：１１７３６－１１７４３）は、悪性胸水の細胞外成分による、癌細胞へのレトロウイルスの遺伝子導入の抑制、お

よびＨＹＡｓｅおよびコンドロイチナーゼでの胸水の処理によるこの抑制の中和を示している。

【００２６】

Ｄｕｂｅｎｓｋｙら（１９８４，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．８１：７５２９－７５３３）は、ポリオーマプラスミド組換えＤＮＡをＨＹＡｓｅおよびコラゲナーゼと共に注入すると、マウス肝臓および脾臓への、より均質なトランスフェクションが達成されることを示している。

【００２７】

有意な組織改変を伴うことなく、増強された且つ長期にわたり持続する遺伝子発現をもたらす、宿主組織内への医薬物質の電気的導入の改良方法を特定することができれば好都合であろう。本発明は、宿主組織内への遺伝子の導入および発現を増強するための、電気刺激と組合せた生物学的に有効な量のヒアルロニダーゼの投与を含む方法を開示することにより、これらの要求について検討しそれを満足させるものである。

【発明の開示】

【００２８】

本発明は、脊椎動物宿主の組織内に医薬物質を運搬する方法であって、生物学的に有効な量のヒアルロニダーゼを該脊椎動物宿主の組織に投与し、ＨＹＡｓｅ投与の運搬箇所付近に該医薬物質を投与し、ヒアルロニダーゼおよび該医薬物質の投与部位付近に電気刺激を適用する工程を含んでなる方法に関する。この目的において、本発明の方法は、脊椎動物宿主の組織内への核酸分子（本明細書中にはＤＮＡプラスミド分子として例示されている）の集団のような医薬物質の運搬であって、ａ）生物学的に有効な量のヒアルロニダーゼを該脊椎動物宿主の組織に投与し、ｂ）工程ａ）におけるヒアルロニダーゼ投与の運搬部位付近に該医薬物質を投与し、ｃ）工程ａ）および工程ｂ）の運搬箇所付近に電気刺激を適用することを含んでなる運搬に関する。この方法は、電気的運搬技術の運搬における実質的な増強およびそれによるインビボ効力の実質的な増強をもたらす。

【００２９】

本発明の１つの態様は、前段落に記載の生理的に許容される電気的遺伝子導入（ＥＧＴ）法と組合せてヒアルロニダーゼ（ＨＹＡｓｅ）を投与することを含んでなる、宿主脊椎動物組織内への核酸分子の電気的遺伝子導入を増強する方法に関する。特定のＥＧＴ法とＨＹＡｓｅの注入（注射）との組合せは、それぞれのＥＧＴ法のみの適用と比較した場合の核酸分子の導入の増強をもたらす。

【００３０】

本発明はまた、有効量のヒアルロニダーゼとそれぞれの医薬物質とを含んでなる医薬製剤に関する。好ましい医薬物質は有効濃度の核酸分子、最も好ましくは、生物学的に有効な濃度のＤＮＡプラスミド分子である。

【００３１】

この目的において、本発明は、電気的遺伝子導入（ＥＧＴ）処理と組合せて生物学的に有効な量のヒアルロニダーゼ（ＨＹＡｓｅ）を投与することを含んでなる、脊椎動物組織内への核酸の電気的遺伝子導入を増強する方法に関する。

【００３２】

この目的において、本発明は、ＥＧＴ処理と組合せて生物学的に有効な量のヒアルロニダーゼ（ＨＹＡｓｅ）を投与することを含んでなる、哺乳動物組織内への核酸のＥＧＴを増強する方法に関する。

【００３３】

本発明は更に、ＥＧＴ処理と組合せてそれぞれの医薬物質と共に生物学的に有効な量のヒアルロニダーゼ（ＨＹＡｓｅ）を投与することを含んでなる、哺乳動物筋組織内への核酸のＥＧＴを増強する方法に関する。

【００３４】

したがって、好ましい脊椎動物標的宿主は哺乳動物であり、特に好ましい標的宿主には、ヒトおよび非ヒト霊長類が含まれ、商業的または家畜獣医学的に重要な任意の非ヒト哺

乳動物が含まれうるが、これらに限定されるものではない。

【００３５】

また、該脊椎動物宿主由来の１以上の組織型が本発明の相乗的ＥＧＴ／ＨＹＡｓｅ法の標的となりうるが、好ましい組織型は筋組織であり、これは、遺伝子治療および／または遺伝子ワクチン接種適用を含む種々の電気刺激法の、生存可能な標的組織であることが示されている。該遺伝子構築物およびＨＹＡｓｅの好ましい投与方法は直接的な針による注入である。

【００３６】

本発明の特定の実施形態は、それぞれのＥＧＴ処理の適用と比較したＨＹＡｓｅ投与の時機に関する。図２に示すとおり、１０分～４時間のいずれの時点におけるＨＹＡｓｅの投与も、遺伝子導入の効率の増加をもたらす。したがって、ＨＹＡｓｅの投与はＥＧＴ処理の適用の前またはそれと同時であることが好ましい。ＨＹＡｓｅの前注入（ｐｒｅｉｎｊｅｃｔｉｏｎ）がそれぞれの遺伝子導入法の効率を増加させるはずだということが分かれば、特定の標的宿主に対するＨＹＡｓｅ投与の特定の時点における特定のＥＧＴ処理を最適化することは当業者の認識範囲内であろう。ＥＧＴの直前または更にはＥＧＴと共にＨＹＡｓｅを投与しうることは、ＨＹＡｓｅとそれぞれの医薬物質（例えば、核酸分子）との両方を含む製剤に有用である。この目的において、本発明は、ＨＹＡｓｅとそれぞれの医薬物質（例えば、核酸分子、またはより好ましくは、インビボ投与後に、関心のあるトランスジーン／抗原を発現する生物学的に有効な量のＤＮＡプラスミド構築物）との両方を含んでなる製剤に関する。

【００３７】

したがって、本発明の特定の実施形態は、筋ＥＧＴの遺伝子導入効率を有意に増加させる、ヒアルロニダーゼ（ＨＹＡｓｅ）を前注入することによる骨格筋内へのプラスミドＤＮＡの電気的遺伝子導入（ＥＧＴ）の効率の増加に関する。マウスエリスロポエチンをコードする（ｐＣＭＶ／ｍＥＰＯ）および分泌アルカリホスファターゼをコードする（ｐＣＭＶ／ＳｅＡＰ）２つの構築物を、ＨＹＡｓｅ前処理を伴って及び伴わずに、Ｂａｌｂ／Ｃマウスおよびウサギの筋肉内に電気注入した。ＥＧＴの１または４時間前の前注入はマウスにおいてＥＰＯ遺伝子発現を約５倍増強し、プラスミドＥＧＴ単独の場合より高い遺伝子発現を維持した。ウサギ脛骨筋におけるＨＹＡｓｅおよびｐＣＭＶ／ｍＥＰＯの電気注入による前処理の後に、遺伝子発現における同様の増強が観察された。プラスミドｐＣＭＶ／ＳｅＡＰの注入後には、ウサギにおける遺伝子発現の増強は１７倍に達した。

【００３８】

脊椎動物宿主内へのインビボ遺伝子導入のための、ＥＧＴに基づく方法の増強を提供することが、本発明の１つの目的である。この場合、ヒアルロニダーゼ（ＨＹＡｓｅ）を、それぞれの医薬物質および有効なＥＧＴ法と組合せて投与する。したがって、特定のＥＧＴ法とＨＹＡｓｅ注入（好ましくは、核酸運搬の領域を取り囲む組織の電気刺激の前、そして可能ならば該電気刺激と同時またはほぼ同時）との組合せは、それぞれのＥＧＴ法の単独適用と比較した場合のそれぞれの遺伝子構築物の遺伝子導入、発現および／または免疫原性の効率の増加をもたらす。

【００３９】

ＨＹＡｓｅとそれぞれの医薬物質（例えば、インビボ投与後にそれぞれのトランスジーン／抗原の発現をもたらす核酸分子の集団）との両方を含んでなる製剤を提供することも、本発明の目的である。

【００４０】

本明細書中に用いる「ｐ．ｉ．」は「注入後」の略語である。

【００４１】

本明細書中に用いる「ＥＧＴ」は「電気的遺伝子導入」の略語であり、これは「電気刺激」および「電気的刺激」なる語と互換的に用いられる。

【００４２】

本明細書中に用いる「ＨＹＡｓｅ」は「ヒアルロニダーゼ」の略語である。

【発明を実施するための最良の形態】
【００４３】
本発明は、電気的遺伝子導入処理と組合せて生物学的に有効な量のヒアルロニダーゼ（ＨＹＡｓｅ）を投与することを含んでなる、脊椎動物組織内への医薬物質（核酸に基づく製剤が含まれるが、これに限定されるものではない）の電気刺激を増強する方法に関する。すなわち、本発明は、注入部位付近の箇所に電気刺激（例えば、電気的遺伝子導入、すなわち「ＥＧＴ」）を適用することによる医薬物質の運搬を増強する従来の技術を改善するものである。本発明においては、（ａ）該医薬物質の投与部位付近の領域および電気刺激の領域へのヒアルロニダーゼの適用、または（ｂ）電気刺激の適用と組合せたヒアルロニダーゼおよび医薬物質の同時運搬（好ましくは、単一の製剤または組成物によるもの）が、それぞれの電気刺激法の単独適用と比較して該医薬物質（本明細書中にはＤＮＡプラスミド構築物として例示されている）の導入の増強をもたらす。
【００４４】
本明細書に記載のとおり、本発明は、脊椎動物宿主の組織内に医薬物質を運搬する方法であって、生物学的に有効な量のヒアルロニダーゼを脊椎動物宿主の組織に投与し、ＨＹＡｓｅ投与の運搬箇所付近に該医薬物質を投与し、ヒアルロニダーゼおよび該医薬物質の投与箇所付近に電気刺激を適用する工程を含んでなる方法に関する。この目的において、本発明の方法は、脊椎動物宿主の組織内への核酸分子（本明細書中にはＤＮＡプラスミド分子として例示されている）の集団のような医薬物質の運搬であって、ａ）生物学的に有効な量のヒアルロニダーゼを該脊椎動物宿主の組織に投与し、ｂ）工程ａ）におけるヒアルロニダーゼ投与の運搬部位付近に該医薬物質を投与し、ｃ）工程ａ）および工程ｂ）の運搬箇所付近に電気刺激を適用することを含んでなる運搬に関する。この方法は、電気的運搬技術の運搬における実質的な増強およびそれによるインビボ効力の実質的な増強をもたらす。ＨＹＡｓｅの投与は電気的刺激の数時間前または数分前に行うことが可能であることが本明細書中に示されている。したがって、本発明の方法は、理論的には、ＨＹＡｓｅの投与に関して、４時間以上から数分までの時間範囲を含み、さらには、該投与は標的組織の電気刺激と共に行うことが可能である。この目的において、本発明の１つの態様は更に、標的部位における１回の注入による投与が可能となるようＨＹＡｓｅと該医薬物質（例えば、ＤＮＡプラスミド構築物）とが一緒に製剤化されている、本明細書に開示されている方法に関する。
【００４５】
この目的においては、ＨＹＡｓｅの投与が電気刺激の数時間前または数分前に行いうるという例示が与えられているとすると、本発明の好ましい態様は、有効量のヒアルロニダーゼとそれぞれの医薬物質との両方を含んでなる医薬製剤または組成物である。好ましい医薬物質は有効濃度の核酸分子、最も好ましくは、生物学的に有効な濃度のＤＮＡプラスミド分子である。ＥＧＴと組合された１回の注入のみで、核酸に基づくビヒクルの導入および発現に十分なものとしたい場合の、ＨＹＡｓｅと医薬物質との二重投与に、そのような製剤は特に有用であろう。
【００４６】
したがって、本発明は、ＥＧＴ処理、医薬物質の投与と組合せて生物学的に有効な量のヒアルロニダーゼ（ＨＹＡｓｅ）を投与することを含んでなる、哺乳動物組織内への核酸のＥＧＴを増強する製剤および方法に関する。前記のとおり、好ましい製剤は、ＨＹＡｓｅと医薬物質（例えば、関心のあるトランスジーンを発現するＤＮＡプラスミド分子の有効量）との両方を含む製剤でありうる。
【００４７】
本発明は更に、ＥＧＴ処理と組合せて生物学的に有効な量のヒアルロニダーゼ（ＨＹＡｓｅ）を投与することを含んでなる、哺乳動物筋組織内への核酸のＥＧＴを増強する方法に関する。
【００４８】
したがって、好ましい脊椎動物標的宿主は哺乳動物であり、特に好ましい標的宿主には

、ヒトおよび非ヒト霊長類が含まれ、商業的または家畜獣医学的に重要な任意の非ヒト哺乳動物が含まれうるが、これらに限定されるものではない。

【００４９】

また、該脊椎動物宿主由来の１以上の組織型が本発明の相乗的ＥＧＴ／ＨＹＡｓｅ法の標的となりうるが、好ましい組織型は筋組織であり、これは、遺伝子治療および／または遺伝子ワクチン接種適用を含む種々の電気刺激法の、生存可能な標的組織であることが示されている。

【００５０】

ヒアルロニダーゼは臨床用途に使用される。したがって、ＨＹＡｓｅの投与と筋ＥＧＴとの組合せは、標的組織内の遺伝子発現の、より高い治療および／または予防レベルを達成するための、遺伝子治療および／または遺伝子ワクチン接種用構築物の運搬および発現を増強する効率的な方法となる。ＤＮＡワクチン技術の分野における特に好ましい応用は、ＨＩＶ Ｇａｇ、ＨＩＶ Ｐｏｌおよび／またはＨＩＶ Ｎｅｆを含む（これらに限定されるものではない）１以上のＨＩＶ抗原をコードするＤＮＡワクチンの運搬である。ＨＹＡｓｅと本明細書に記載のＤＮＡワクチンの１つとを含む製剤は、本発明の好ましい態様の１つを含む。ＥＧＴ処理の適用と生物学的に有効な量のＨＹＡｓｅの投与とを組合せることにより、筋組織への運搬および筋組織からの発現が増強されて、宿主投与後の細胞性免疫応答の増強の改善がもたらされうる。そのようなＤＮＡワクチンの改善された運搬、発現および／または免疫原性の効果は、未だ感染していない個体に対する、より低い伝染率（すなわち、予防的適用）、および／またはＨＩＶ－１感染の無症候期を延長させる、感染個体におけるウイルス負荷レベルの減少（すなわち、治療的適用）でありうる。したがって、本発明の本質は、遺伝子治療または遺伝子ワクチン接種用のそれぞれの構築物が脊椎動物宿主の筋組織に運搬された後の遺伝子発現および／または免疫応答のレベルの増加をもたらす方法に関する。一連の好ましい宿主には、ヒトおよび非ヒト霊長類を含む（これらに限定されるものではない）哺乳動物宿主が含まれ、商業的または家畜獣医学的に重要な任意の非ヒト哺乳動物も含まれる。該方法、およびそれに伴う、ＨＹＡｓｅとそれぞれの医薬物質とを含む製剤は、全身的にそれ自身の生物学的効果を奏しうる分泌タンパク質の発現に左右される任意の遺伝子治療標的に適用可能である。具体例には、遺伝子治療標的、例えばＥＰＯ、因子ＶＩＩＩ、因子ＩＸ、成長ホルモン、種々のサイトカインおよびインターフェロンが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【００５１】

標的組織におけるその特定の遺伝子導入法の効率の増加を促すために、ＨＹＡｓｅと組合せて、ＥＧＴに関連した任意の公知方法を用いることが可能であると理解されるであろう。簡潔に説明すると、適用された電気的刺激は生体組織に影響を及ぼしうることが公知である。適用された電場は、移流により組織内を拡散する速度に影響を及ぼしたり、流体が組織の或る部分に拡散する度合を変化させうる。例えば、膜を介して物質を組織に注入することが望ましい場合および拡散速度が少なくとも部分的に透過性の関数である場合には、電気的刺激は膜の透過性を増加させうる。ある電気的または電磁的刺激の効果はイオントホレシス、電気泳動およびエレクトロポレーションに基づいて説明されている。これらの用語は、異なる形態の電気的効果に関係している。それらは、与えられた電気的ポテンシャル、電流または電磁場により引き起こされる結果を解釈するための異なる方法とみなされうる。振幅、極性、周波数、空間的幾何配置および他のパラメーターに応じて、与えられた場はそのような作用の組合せをもたらしうる。

【００５２】

イオントホレシスおよび電気泳動は、一般には、陽極および陰極に向かう及びそれらから離れる静電引力および析力による正および負イオンの移動を駆動するための直流電流電場の適用に関連したものである。また、電場は、一般に、イオンの移動を増加させる傾向にある。イオントホレシスは、典型的には、溶液中の極性イオンを皮膚のような無傷膜を介して移動させることを含む。電気泳動は、極性電場（すなわち、少なくとも直流電流成分を伴う場）の影響下での流体またはゲル内のイオンの移動に関連したものである。

【００５３】
エレクトロポレーションは、しばしば短時間適用される又はパルス化される、比較的高い電力の電場を含む。十分な振幅で及び／又は十分な持続時間にわたり適用された電場は、膜内の微小孔の形成を誘発する。これらの孔は一般には「電気穿孔」と称され、それを形成させる方法がエレクトロポレーション（電気穿孔法）である。膜に適用されたエネルギーの力および持続時間に応じて、該孔はより大きく又はより小さくなることがあり、より長く又はより短い時間にわたり維持されうる。好ましくは、該孔は、一時的に（例えば、電場の適用中のみ）維持され、迅速に閉じるか又は元に戻る。本開示においては、「電気的遺伝子導入」（ＥＧＴ）、「電気的刺激」および／または「電気刺激」は本明細書中で互換的に用いられ、イオントホレシス、エレクトロポレーション、電気泳動または任意の他の電気的作用のいずれか１つ又はいずれかの特定の組合せに限定されるものではない。本明細書中に用いる用語は、そのような任意の作用を包含する意味である。与えられた電気的刺激は、２以上の種類に含まれる結果を有していたり、あるいは場合によっては、関与する振幅、極性、空間的幾何配置および／または時機により、一方または他方において、より強力でありうる。例えば、与えられた直流または低周波電場は、孔形成（エレクトロポレーション）を誘発するのに十分な振幅を有することが考えられうるが、静電的に駆動される膜を介するイオン移動（イオントホレシス）、および時間経過に伴う累積的移動（電気泳動）も引き起こしうる。しかし、典型的には、エレクトロポレーションは、その他の作用より高い電場振幅を伴い、典型的には、そのような振幅での適用は短い又は断続的であり、あるいは、許容し得ない組織損傷を妨げるのに十分な程度に低い衝撃周期でパルス化される。

【００５４】
組織は、電磁的な観点から見ると、均質ではなく、等方性ではなく、規則的ではないため、組織への電磁場の適用は複雑なものとなる。適用された場および誘導された電流は、微視的規模では、組織の透磁率および抵抗率を含む（これらに限定されるものではない）組織の物質特性におけるばらつきにより、そしてより微視的規模では、組織の解剖学的構造および機構によってより集中したものとなりうる。

【００５５】
電気的に誘発された孔はインビトロでは或る程度は観察され研究されており、この場合、溶液中の細胞はお互いから実質的に独立しており、見えるように露出している。インビボでは、特定の部位における効果を観察することは困難または不可能である。例えば、ある部位を露出させて見えるようにするための組織の切開のようなインビボでの組織へのアクセス獲得は、適用される電気エネルギーの局所的な振幅、配向または他の態様を変化させて組織を損なう傾向にある。したがって、電気的刺激のパラメーターおよび効果の有意義なインビボ観察を行うことは困難である。

【００５６】
遺伝子治療および免疫療法は組織の電気的刺激の候補適用対象である。電気的刺激はイオンの移動および組織内の孔の開口を伴う傾向にあるため、組織部位に医薬組成物または他の組成物を適用することが妥当であり、所望の効果が達成または増強される位置に（おそらくは組織膜内の孔を介して）該組成物のイオンまたは分子を移動させるために電気刺激を用いることが妥当である。熱効果（ブラウン運動）による拡散は、内容積内への電気穿孔組織膜を介した拡散を駆動しうるであろう。静電的または他の電磁的効果は生物構造体内のイオンの拡散を駆動し、あるいは少なくとも、影響を受けた分子（例えば、交番極性場を帯びたもの）の運動を増強して特定の反応に影響を及ぼして、治療効果を達成または誘導しうるであろう。

【００５７】
プラスミドＤＮＡ注入に特徴的な、制限された遺伝子導入効力は、少なくとも部分的には、注入ＤＮＡと筋繊維との適当な結合を妨げうる大量の結合組織の存在（特に大動物の場合）に原因があるとされている。この仮説は、外因性分子、細菌またはウイルスによる侵入に対する筋繊維の防御において細胞外マトリックスが重要な役割を果たしうるという

見解と一致している。筋組織の電気刺激は、筋繊維の膜透過性を上昇させることによりＤＮＡ導入を増強しうるが、細胞外マトリックスの構造的特徴が、処理筋肉を越える注入ＤＮＡの遺伝子導入効率に影響を及ぼしているのかもしれない。したがって、細胞外マトリックスの、酵素による透過性促進処理は、注入ＤＮＡと筋繊維との生産的相互作用を可能にするのに十分な程度に大きな孔を形成しうるであろう。筋肉への遺伝子の導入および発現の際の酵素処理（すなわち、ＨＹＡｓｅ処理）による細胞外マトリックス破壊の筋ＥＧＴに対する効果が、本明細書に開示されている。ＨＹＡｓｅは、細胞外マトリックスの遍在性構成成分であるヒアルロン酸を加水分解する。ＤＮＡ注入および電気的刺激の前にマウスおよびウサギの骨格筋をＨＹＡｓｅで処理すると、有意な組織変化を伴うことなく、増強された且つ長期にわたる遺伝子発現が得られる。この目的において、本発明は、生物学的に有効な量のヒアルロニダーゼ（ＨＹＡｓｅ）を投与することによる、電気刺激法の改良に関する。ＨＹＡｓｅの投与は、ＨＹＡｓｅの投与を伴わない場合のそれぞれの電気刺激パラメーターと比較して、遺伝子治療用および／または遺伝子ワクチン接種用構築物の導入を増強する。すなわち、ＨＹＡｓｅは、電気刺激法と組合せて使用した場合に、遺伝子導入の相乗的増強をもたらす。前記のとおり、遺伝子導入を改善すると当業者により予想される任意のそのような電気刺激に基づく方法を、標的宿主へのＨＹＡｓｅの投与と組合せて用いることが可能である。本発明の実施においては、ＥＧＴパラメーターの変更を行うことが可能であり、それらには、電圧、パルスの持続時間、電場の回転、パルス数、それらの周波数、パルス間隔ならびに医薬物質の投与および電気刺激の時機の変更が含まれるが、必ずしもこれらに限定されるものではない。そのような技術の具体例には、以下のものが含まれるが、それらに限定されるものではない：米国特許第６，１１０，１６１号（これは、約２５Ｖ／ｃｍ～約２５０Ｖ／ｃｍの算出電場強度での骨格筋のインビボ電気的刺激を開示している）（Ｍａｔｈｉｅｓｅｎ，１９９９，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ６：５０８－５１４も参照されたい）；ＰＣＴ国際公開ＷＯ ９９／０１１５８、ＷＯ ９９／０１１５７およびＷＯ ９９／０１１７５（これらは、裸ＤＮＡのインビボ電気的刺激を促進するための長い持続時間にわたる低電圧の使用を開示しており、約１Ｖ／ｃｍ～約６００Ｖ／ｃｍの電場強度または電圧傾度が開示されている）；米国特許第５，８１０，７６２号、米国特許第５，７０４，９０８号、米国特許第５，７０２，３５９号、米国特許第５，６７６，６４６号、米国特許第５，５４５，１３０号、米国特許第５，５０７，７２４号、米国特許第５，５０１，６６２号、米国特許第５，４３９，４４０号および米国特許第５，２７３，５２５号（これらは、エレクトロポレーション／電気刺激法および関連装置を開示しており、ここで、それぞれの組織における有用な電場強度範囲が約２００Ｖ／ｃｍ～約２０ＫＶ／ｃｍであると示唆されている）、米国特許第５，９６８，００６号および第５，８６９，３２６号（これらは更に、あるインビボ電気刺激法には僅か１００Ｖ／ｃｍの電場強度が有用であると示唆している）。更なる研究（「背景技術」に記載されているとおり、種々のパラメーターによるもの）が、例えば、Ｔｉｔｏｍｉｒｏｖら（１９９１，Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ａｃｔａ １０８８：１３１－１３４）、Ｈｅｌｌｅｒら（１９９６，ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔｅｒｓ ３８９：２２５－２２８）、Ｎｉｓｈｉら（１９９６，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５６：１０５０－１０５５）、Ｚｈａｎｇら（１９９６，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．２２０：６３３－６３６）、Ｍｕｒａｍａｔｓｕら（１９９７，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．２２３：４５－４９）、Ｒｏｌｓら（１９９８，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １６（２）：１６８－１７１）、ＡｉｈａｒａおよびＭｉｙａｚａｋｉ（１９９８，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １６：８６７－８７０）、Ｖｉｃａｔら（２０００，Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ １１：９０９－９１６）、Ｗｉｄｅｒａら（２０００，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ １６４：４６３５－４６４０）、Ｓｕｚｕｚｋｉら（１９９８，ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．４２５：４３６－４４０）、Ｇｏｔｏら（２０００，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９７：３５４－３５９）、Ｏｓｈｉｍａら（１９９８，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ５；１３４７－１３５４）、Ｒｉｚｚｕｔｏら（１９９９，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａ

ｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９６：６４１７－６４２２）、Ｍｉｒら（１９９８，Ｃ．Ｒ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｐａｒｉｓ（Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ）３２１：８９３－８９９）、Ｍｉｒら（１９９９；Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．９６：４２６２－４２６７）；Ｍａｒｕｙａｍａら（２０００，Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ １１：４２９－４３７）およびＤｒａｇｈｉａ－Ａｋｌｉら（１９９９，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １７：１１７９－１１８３）に記載されている。以下の特許および非特許刊行物は、それらが、それぞれの標的組織の電気刺激による遺伝子導入および発現を促進するための公知方法に関するものである限り、参照により本明細書に組み入れられるものとする。

【００５８】

ヒアルロニダーゼ（ＨＹＡｓｅ）の前注入は筋ＥＧＴの遺伝子導入効率を有意に増加させることが、本明細書に示されている。マウスエリスロポエチンをコードする（ｐＣＭＶ／ｍＥＰＯ）および分泌アルカリホスファターゼをコードする（ｐＣＭＶ／ＳｅＡＰ）２つの構築物を、ＨＹＡｓｅ前処理を伴って及び伴わずに、Ｂａｌｂ／Ｃマウスおよびウサギの筋肉内に電気注入した。ＥＧＴの１または４時間前の前注入はマウスにおいてＥＰＯ遺伝子発現を約５倍増強し、プラスミドＥＧＴ単独の場合より高い遺伝子発現を維持した。ウサギ脛骨筋におけるＨＹＡｓｅおよびｐＣＭＶ／ｍＥＰＯの電気注入による前処理の後に、遺伝子発現における同様の増強が観察された。プラスミドｐＣＭＶ／ＳｅＡＰの注入後には、ウサギにおける遺伝子発現の増強は１７倍に達した。β－ガラクトシダーゼをコードするプラスミド（ｐＣＭＶ／βｇａｌ／ＮＬＳ）の注入およびそれに続くＸ－ｇａｌ染色は、遺伝子発現に関与する組織面積をＨＹＡｓｅが増加させることを示した。処理マウス四頭筋の組織学的分析では、不可逆的な組織損傷は全く観察されなかった。

【００５９】

したがって、本発明は、本明細書中に例示されているとおり、ＨＹＡｓｅの注入による、ＥＧＴの形質導入効率の増強に関する。ＨＹＡｓｅでの前処理は長期にわたる効果を与え、遺伝子発現を３～１０倍増強することが、本明細書中に示されている。この観察は、治療用途に適した遺伝子導入法の開発に関する重要な示唆を与えている。ヒアルロニダーゼはヒアルロン酸のβ（１－４）結合の加水分解を触媒して、その脱重合を招き、結合組織の細胞外基質内の粘度の一時的な減少を引き起こす。ＨＹＡｓｅは用量依存的に形質導入効率を増加させ（図１Ａ～Ｂ）、該酵素の作用様式に合致することが（図２）、本明細書中に示されている。ｐＣＭＶ／ＮＬＳ／β－ｇａｌでの組織学的実験は、遺伝子発現に関与する組織面積をＨＹＡｓｅが有意に増加させることを示している（図６）。これは該組織全体のＤＮＡ分布の増加によるプラスミドＤＮＡのバイオアベイラビリティの増加によるものかもしれない。ＨＹＡｓｅ処理は、電気的刺激の際のＤＮＡの侵入を妨げうる細胞マトリックスの成分との相互作用からのプラスミドＤＮＡの解放に寄与しうる。筋ＥＳを伴わないＨＹＡｓｅ投与は、１００μｇのｐＣＭＶ／ｍＥＰＯの注入後であっても、遺伝子導入効率を増加させないようである。本明細書中に開示されているデータは、ＨＹＡｓｅがプラスミドＤＮＡの細胞取込みに直接的な影響を及ぼすのではなく、筋電気刺激に依存して遺伝子発現に対するその効果を奏することを示している。これらの観察は、ＤＮＡ分解を抑制することにより筋肉内の遺伝子発現を増強すると最近報告されたリン酸ナトリウム（Ｈａｒｔｉｋｋａら，２０００，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ７：１１７１－１１８２）、ならびに非イオン性担体、例えばポリビニルピロリドンおよびＳＰ１０１７（Ｌｅｍｉｅｕｘら，２０００，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ７：９８６－９９１；Ｍｕｍｐｅｒら，１９９６．Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．１３：１１４－１２１；Ａｌａｋｈｏｖら，１９９５；Ｂｉｏｃｏｎｊ．Ｃｈｅｍ．７：２０９－２１６；Ｂａｔｒａｋｏｖａら，１９９６；Ｂｒ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ ７４：１５４５－１５５２）から、ＨＹＡｓｅの使用を区別するものである。注入されたすべての動物で観察されるＥＰＯ発現の漸進的低下により示されるとおり（図３Ａ～Ｃ）、ＨＹＡｓｅ処理を伴う遺伝子発現の増強は注入ＤＮＡの全体的安定性には影響を及ぼさない。処理筋肉を越えるＤＮＡ導入の増強は遺伝子発現の延長を保証すると考えられるが、この観察は、ＤＮＡ安定性およびプロモーターアテ

ニュエーションのような要因がインビボ遺伝子導入の効力の重要な決定要因とみなされるべきであることを示唆している。ヒアルロニダーゼは、大量皮下注射、浮腫の再吸着のような用途のための臨床応用に、および局所麻酔剤の製剤化に現在使用されている。したがって、組織学的分析が注入組織の有意または永久的な変化を示さなかったこと（図４Ａ～Ｃ）、およびＨＹＡｓｅを注入された動物が不快徴候を示さなかったことは驚くべきことではない。これは、カルジオトキシンおよびブピバカインのような強力な筋再生剤の使用に伴う広範な筋損傷のリスクとは対照的である。ウサギにおいて、プラスミドｐＣＭＶ／ＳｅＡＰの注入後には発現における１７倍の増強が観察され、一方、ＥＰＯの発現は３倍増強された（図５Ａ～Ｂ）。ＥＰＯとＳｅＡＰとの間の遺伝子発現の増強の相違の原因は、検出アッセイの感度および発現タンパク質の安定性にあるのかもしれない。あるいは、この相違は、骨格筋からのＥＰＯおよびＳｅＡＰの分泌の効率の相違を反映しているのかもしれない（例えば、Ｋｒｅｉｓｓら，１９９９，Ｊ．ｏｆ　Ｇｅｎｅ　Ｍｅｄ．１：２４５－２５０を参照されたい）。それにもかかわらず、ウサギにおいてＨＹＡｓｅ注入後に観察された遺伝子発現における有意な増強は、この酵素の使用が大動物における遺伝子導入効率の増加を保証しうることを示している。この結論は、治療レベルでの持続的発現と共に少ない回数の注入および最少量の注入ＤＮＡがおそらく要求される、ヒトでの療法のための筋ＥＧＴの、より広範な適用に特に良く当てはまる。

【００６０】

本発明のＥＧＴ／ＨＹＡｓｅ法において使用する核酸分子は、宿主への投与のための薬学的に有効な任意の製剤中に製剤化することが可能である。本開示の全体にわたり記載されているとおり、好ましい製剤は、ＨＹＡｓｅとそれぞれの医薬物質との両方を生物学的に有効な濃度で含む製剤である。そのような任意の製剤は、例えば食塩水、例えばリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）中のものでありうる。ＤＮＡプラスミド構築物のような核酸分子の長期安定性をももたらす薬学的に許容される製剤を使用するのが有用である。医薬の単体としての保存中には、ＤＮＡプラスミド分子は生理化学的変化を受け、スーパーコイルプラスミドは開環および直鎖状形態に変換される。種々の保存条件（低ｐＨ、高温、低イオン強度）がこの過程を加速しうる。したがって、ＤＮＡプラスミド溶液からの又は製剤バッファーからの又はバイアルおよび容器からの微量金属イオンの除去および／またはキレート化（コハク酸もしくはリンゴ酸、または複数のホスファートリガンドを含有するキレート剤によるもの）は、保存中のこの分解経路に対してＤＮＡプラスミドを安定化する。また、エタノールまたはグリセロールのような非還元性フリーラジカル捕捉剤の添加は、見掛け上脱金属化された溶液中でさえも尚も生じうるフリーラジカルの生成によるＤＮＡプラスミドの損傷を妨げるのに有用である。さらに、ＤＮＡ分子の安定性を最適化するために、バッファーの種類、ｐＨ、塩濃度、露光およびバイアルの製造に用いられる滅菌法の種類を該製剤において制御することが可能である。したがって、ＤＮＡプラスミドベクターのような核酸分子の最高の安定性をもたらす製剤は、７～８の範囲内のｐＨを有するバッファー（リン酸または炭酸バッファー）、１００～２００ｍＭの範囲内の塩（ＮａＣｌ、ＫＣｌまたはＬｉＣｌ）、金属イオンキレート剤（例えば、ＥＤＴＡ、ジエチレントリアミン五酢酸（ＤＴＰＡ）、マラート、イノシトールヘキサホスファート、トリポリホスファートまたはポリリン酸）、非還元性フリーラジカル捕捉剤（例えば、エタノール、グリセロール、メチオニンまたはジメチルスルホキシド）および最高の適当な濃度のＤＮＡを、高度に精製されたヌクレアーゼ非含有ＤＮＡを光から防御するようにパッケージされた無菌ガラスバイアル内に含有する脱金属化溶液を含むものであろう。本発明のＤＮＡベクターワクチンの長期安定性を増強する特に好ましい製剤は、約８．０～約９．０のｐＨのＴｒｉｓ－ＨＣｌバッファー、約３％　ｗ／ｖのエタノールまたはグリセロール、約５ｍＭまでの濃度範囲のＥＤＴＡまたはＤＴＰＡ、および約５０ｍＭ～約５００ｍＭの濃度のＮａＣｌを含むであろう。そのような安定化ＤＮＡベクターワクチン、およびこの好ましい一連の製剤の種々の代替物の使用は、ＰＣＴ国際出願番号ＰＣＴ／ＵＳ９７／０６６５５およびＰＣＴ国際公開番号ＷＯ　９７／４０８３９（それらの両方を参照により本明細書に組み入れることとする）に詳細に記載されている。

【００６１】

本明細書に記載の核酸分子は、遺伝子治療または遺伝子ワクチン接種ビヒクルの免疫原性を増強しうるアジュバントと共に製剤化することも可能である。多数のこれらのアジュバントが当技術分野で公知であり、ＤＮＡワクチンにおける使用（ＤＮＡ被覆金ビーズを使用する粒子ボンバードメント、サイトカイン、ケモカインまたは共刺激分子を発現するプラスミドＤＮＡとＤＮＡワクチンととの共投与、陽イオン性脂質または実験的アジュバント、例えばサポニン、モノホスホリルリピドＡ、または遺伝子治療用または遺伝子ワクチン接種用の特定の構築物の効力を増強する他の化合物の存在下でのＤＮＡの製剤化が含まれるが、これらに限定されるものではない）に利用可能である。本明細書に開示する方法と共に使用するもう１つのアジュバントとしては、１以上の形態の、リン酸アルミニウムに基づくアジュバントが挙げられ、この場合、リン酸アルミニウムに基づくアジュバントは、約０．９のPO_4／Ａｌモル比を有する。無機物に基づくもう１つのアジュバントを１以上の形態のリン酸カルシウムから得ることが可能である。これらの無機物に基づくアジュバントは、ＤＮＡワクチン接種に対する細胞性および体液性応答を増強するのに特に有用である。ＤＮＡワクチンアジュバントとして使用するこれらの無機物に基づく化合物は、ＰＣＴ国際出願番号ＰＣＴ／ＵＳ９８／０２４１４、ＰＣＴ国際公開番号ＷＯ　９８／３５５６２（これを参照により本明細書に組み入れることとする）に開示されている。もう１つの好ましいアジュバントとしては、ＤＮＡワクチンでアジュバント活性を示す非イオン性ブロック共重合体が挙げられる。その基本構造はポリオキシエチレン（ＰＯＥ）とポリオキシプロピレン（ＰＯＰ）とのブロックを含む（例えば、ＰＯＥ－ＰＯＰ－ＰＯＥブロック共重合体）。Ｎｅｗｍａｎら（１９９８，Ｃｒｉｔｉｃａｌ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　ｉｎ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ　Ｄｒｕｇ　Ｃａｒｒｉｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　１５（２）：８９－１４２）は、アジュバント活性を示す非イオン性ブロック共重合体のクラスを概説している。その基本構造はポリオキシエチレン（ＰＯＥ）とポリオキシプロピレン（ＰＯＰ）とのブロックを含む（例えば、ＰＯＥ－ＰＯＰ－ＰＯＥブロック共重合体）。Ｎｅｗｍａｎら（同誌）は、あるＰＯＥ－ＰＯＰ－ＰＯＥブロック共重合体（すなわち、約９０００ダルトン～約２０，０００ダルトン以上の分子量を有する中央ＰＯＰブロックと、該共重合体の全分子量の約２０％までを含む隣接ＰＯＥブロックとを含有する高分子量ＰＯＥ－ＰＯＰ－ＰＯＥブロック共重合体）が、インフルエンザタンパク質に基づくワクチンに対するアジュバントとして有用でありうることを開示している（これらのＰＯＥ－ＰＯＰ－ＰＯＥブロック共重合体に関する、すべてＥｍａｎｕｅｌｅらに発行された米国再発行特許第３６，６６５号、米国特許第５，５６７，８５９号、米国特許第５，６９１，３８７号、米国特許第５，６９６，２９８号および米国特許第５，９９０，２４１号も参照されたい）。ＷＯ　９６／０４９３２は更に、界面活性剤特性を有しワクチンアジュバントとしての生物学的効力を示す高分子量ＰＯＥ／ＰＯＰブロック共重合体を開示している。この段落内の前記で引用した刊行物の全体を参照により本明細書に組み入れることとする。したがって、非アジュバント化ポリヌクレオチドワクチンの投与と比較した場合に本発明のポリヌクレオチドワクチンの免疫応答を増強しうる入手可能なアジュバントを利用することは、当業者の認識範囲内である。

【００６２】

本発明のＥＧＴ／ＨＹＡｓｅ法は、腸内経路および非経口経路のような当技術分野で公知の任意の手段による該核酸構築物およびＨＹＡｓｅの投与を要するかもしれない。好ましい投与経路は筋肉内経路である。さらなる経路には、皮下投与、腹腔内注射、静脈内注射、吸入または鼻腔内運搬、経口運搬、舌下投与、経皮（ｔｒａｎｓｄｅｒｍａｌ）投与、経皮（ｔｒａｎｓｃｕｔａｎｅｏｕｓ）投与、経皮（ｐｅｒｃｕｔａｎｅｏｕｓ）投与または任意の形態の粒子ボンバードメント、例えばバイオリスチック（ｂｉｏｌｉｓｔｉｃ）装置、例えば「遺伝子銃」または入手可能な任意の無針（ｎｅｅｄｌｅ－ｆｒｅｅ）注射装置によるものが含まれるが、これらに限定されるものではない。該核酸構築物およびＨＹＡｓｅの好ましい運搬方法は、それぞれのＥＧＴ法と組合された、針による筋肉内注射である。さらなる運搬方法には、皮下投与および無針注射が含まれるが、必ずしもこ

れらに限定されるものではない。特定の投与方法としては、前記のとおりの一種の軟膏剤の使用が挙げられる。

【００６３】

宿主レシピエントに導入される発現可能なＤＮＡの量は、該ＤＮＡ構築物中で使用する転写および翻訳プロモーターの強度、ならびに疾患または障害の治療に要する発現タンパク質のレベル、あるいは発現遺伝子産物の免疫原性に左右される。一般には、約１μｇ～約２０ｍｇ以上の有効量、好ましくは、約１ｍｇ～約５ｍｇの用量を、筋組織内に直接投与する。前記のとおり、皮下注射、皮内導入、皮膚を介した圧入（ｉｍｐｒｅｓｓｉｏｎ）および他の投与様式、例えば腹腔内、静脈内、吸入および経口運搬も意図される。また、遺伝子治療または遺伝子ワクチン接種の適用の有効性が最適化されるよう、この場合も構築物および疾患に特異的な追加抗原刺激の適用を行うことが可能である。

【００６４】

以下の実施例は、本発明を例示するために記載されており、本発明を限定するものではない。

【実施例１】

【００６５】

プラスミドの調製

構築物ｐＣＭＶ／ｍＥＰＯ、ｐＣＭＶ／β－ｇａｌ／ＮＬＳおよびｐＣＭＶ／ＳｅＡＰを以下のとおりに構築した。５’非翻訳領域（ＳｈｏｅｍａｋｅｒおよびＭｉｔｓｏｃｋ，１９８６，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．６：８４９－８５８）の４０ｂｐを含む完全マウスＥＰＯ（ｍＥＰＯ）コード領域を、文献記載（Ｓｔｅｍｍｅｒら，１９９５，Ｇｅｎｅ １６４：４９－５３）を若干修飾した方法を用いて、合成オリゴヌクレオチドからアッセンブリした。簡潔に説明すると、ゲル精製後、６０ｎｔ長の１５個のオリゴを使用した。８個のオリゴはプラス鎖の配列の一部を含むものであり、一方、７個のオリゴはマイナス鎖の配列の一部を含むものであった。それらのオリゴを、アッセンブリ後にそれらが２０ｎｔの相補性領域と重なるように配置した。ｍＥＰＯコード配列内に存在する２つのＳａｃＩ部位および２つのＰｓｔＩ部位を、コード化タンパク質配列を改変させることなく除去し、同時に、コドン使用頻度を最適化した。遺伝子アッセンブリは、記載されているとおり（Ｓｔｅｍｍｅｒら，１９９５，前掲）に行い、該全コード領域をジデオキシシークエンシングにより確認した。プラスミドｐＣＭＶ／ｍＥＰＯは、ＣＭＶ前／初期領域プロモーターおよびエンハンサーおよびイントロンＡおよびそれに続くＢＧＨポリアデニル化シグナルを含有するｐＶｉＪｎｓＢ（Ｍｏｎｔｇｏｍｅｒｙら，１９９３，ＤＮＡ Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１２：７７７－７８３）内に、該ｍＥＰＯコード配列をＥｃｏＲＩ－ＢａｍＨＩ ０．６Ｋｂ断片として挿入することにより構築した。ｐＶｉＪ／β－ｇａｌ／ｎｌｓを構築するために、３．５ＫｂのＢａｍＨＩ β－ｇａｌ／ｎｌｓコード化断片をｐＧＭ４８β－ｇａｌ（Ｗｉｚｎｅｒｏｗｉｃｚら，１９９７）から切り出し、ｐＶｉＪｎｓＢ（Ｍｏｎｔｇｏｍｅｒｙら，前掲）のＢｇｌＩＩ制限部位内にクローニングした。分泌アルカリホスファターゼのコード配列をｐＶｉＪｎｓＢ（Ｍｏｎｔｇｏｍｅｒｙら，前掲）のＢｇｌＩＩ制限部位内に挿入することにより、プラスミドｐＶｉＪ／ＳＥＡＰを構築した。

【００６６】

プラスミドｐＣＭＶ／ｍＥＰＯｏｐｔは、コドンが哺乳動物に最適化されたマウスＥＰＯ ｃＤＮＡを含有する。簡潔に説明すると、高発現ヒト遺伝子において頻繁に見出されるコドンにより天然コドンを置換することにより、ＥＰＯ ｃＤＮＡコード配列を修飾した。マウスＥＰＯの最適化配列は以下のとおりである。

【００６７】

【化１】

ATGGGCGTGC CCGAGCGCCC CACCCTGCTG CTGCTGCTGA GCCTGCTGCT GATCCCCCTG
GGCCTGCCCG TGCTGTGCGC CCCCCCCCGC CTGATCTGCG ACAGCCGCGT GCTGGAGCGC
TACATCCTGG AGGCCAAGGA GGCCGAGAAC GTGACCATGG GCTGCGCTGA GGGCCCCCGC
CTGAGCGAGA ACATCACCGT GCCCGACACC AAGGTGAACT TCTACGCCTG GAAGCGCATG
GAGGTGGAGG AGCAGGCCAT CGAGGTGTGG CAGGGCCTGT CCCTGCTGTC TGAGGCCATC
CTGCAGGCCC AGGCCCTGCT GGCCAACTCC TCCCAGCCCC CCGAGACCCT GCAGCTGCAC
ATCGACAAGG CCATCAGCGG CCTGCGCTCC CTGACCTCCC TGCTGCGCGT GCTGGGCGCC
CAGAAGGAGC TGATGAGCCC CCCCGACACC ACCCCCCCCG CCCCCCTGCG CACCCTGACC
GTGGACACCT TCTGCAAGCT GTTCCGCGTG TACGCCAACT TCCTGCGCGG CAAGCTGAAG
CTGTACACCG GCGAGGTGTG CCGCCGCGGC GACCGCTGA (SEQ ID NO:1).

プラスミドＤＮＡを標準的な二重ＣｓＣｌ勾配精製により調製し、無菌食塩水に再懸濁させた。

【００６８】

動物および処理

６週齢の雌Ｂａｌｂ／Ｃマウスおよび１０週齢の雌ウサギをＣｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｂｒｅｅｄｉｎｇ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙから購入し、すべての実験において使用した。動物を１２時間の明暗周期の標準的な条件中で維持し、照射食品および塩素殺菌された水をそれらに適宜与えた。すべての動物実験は国内の及び国際的な法律および指針に従い行った。

【００６９】

電気的遺伝子導入

マウス四頭筋およびウサギ前脛骨筋を外科的に露出し、所定量のプラスミドＤＮＡをそれらに注入した。注入容量は、マウスにおいては５０μｌおよびウサギにおいては２００μｌに一定に保った。示されている場合には、ヒアルロニダーゼを所望の濃度で５０μｌ（マウス）または５００μｌ（ウサギ）の食塩水に再懸濁させ、ＥＧＴ前の示されている時点で注入した。ＨＹＡｓｅは、Ｂｏｒｄｅｒｓら，１９６５，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２４３：３７５０－３７６２に開示されているとおりに精製することができる。これらの研究のために、ＨＹＡｓｅをＳｉｇｍａ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ．ＭＯ）から購入した（型：ウシ精巣由来ＶＩ－Ｓ；酵素注文番号：３．２．１．３５；別名：ヒアルロノグルコサミニダーゼ、ヒアルロナート　４－グリカノヒドロラーゼ；起源：ウシ精巣）。長さ約３ｃｍおよび間隔５ｍｍの平行状の０．２ｍｍ針金の形態の鋼鉄電極を注入部位周辺の筋肉内に挿入した。文献記載（Ｒｉｚｚｕｔｏら，１９９９，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９６：６４１７－６４２２）を若干修飾した方法により、パルス化形態で電場をかけた。簡潔に説明すると、マウス四頭筋を外科的に露出し、所定量のプラスミドＤＮＡをそれに注入した。長さ約３ｃｍおよび間隔５ｍｍの平行状の０．２ｍｍ針金の形態の鋼鉄電極を筋繊維に対して平行配向で該筋肉に接触させた。電場をＰｕｌｓａｒ　６ｂｐ－ａ／ｓ　双極刺激装置（ＦＨＣ，ＭＥ，ＵＳＡ）によりパルス化形態でかけた。各刺激周期は、１秒おきに送出される方形双極パルスの１秒パルス列を含むものであった。各列は、長さ２００μ秒および振幅４５ボルトの10^3パルスよりなるものであった。デジタルオシロスコープを使用して、パルスをモニターした。出力段にＡＰＥＸ　ＰＡ－８５電力作動増幅器（ＡＰＥＸ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｔｕｃｓｏｎ，ＡＺ）を使用して、特注増幅器を組み立てた。信号を内蔵特注信号発生器により発生させ、２チャンネル８ビットオシロスコープカード（Ｋ７１０３　Ｖｅｌｌｅｍａｎ，Ｇａｖｅｒｅ，Ｂｅｌｇｉｕｍ）を使用してモニターした。ＰＣ適合性ラップトップ（Ｅｘｔｅｎｓａ　５０１Ｔ，Ａｃｅｒ　Ａｍｅｒｉｃａ，Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＣＡ）上で実行されるジャバ（Ｊａｖａ）プログラム言語で書かれた特注ソフトウェアパッケージにより、全設定を制御した。

実験中に定期的にデジタルオシロスコープで電圧および電流を測定した。電圧は、分圧器（１０，０００オームの抵抗器越えの１００，０００オームの抵抗器）の低いほうの抵抗器の両端でモニターし、電流は、該電極に直列の精度（ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ）１オームの抵抗器の両端の電位降下を測定することによりモニターした。

【００７０】

組織学的分析

マウス四頭筋およびラット脛骨筋を、処理後の示されている時点で取り出し、０．０２％　Ｎｏｎｉｄｅｔ　Ｐ－４０を含有するリン酸ナトリウムバッファー（ｐＨ７．４）中の０．５０％グルタルアルデヒドおよび２％　パラホルムアルデヒドにより氷中で固定した。氷冷ＰＢＳで３回洗浄した後、２ｍＭ　５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－ガラクトシダーゼ（Ｘ－ｇａｌ，ＧＩＢＣＯ　ＢＲＬ）、２ｍＭ　$MgCl_2$、４ｍＭ　フェリシアン化カリウム、４ｍＭ　フェロシアン化カリウム、０．０２％　Ｎｏｎｉｄｅｔ　Ｐ－４０をリン酸ナトリウムバッファー中に含有する反応混合物中、筋肉を３０℃で一晩インキュベートした。インキュベーション後、四頭筋をＰＢＳで３回洗浄し、リン酸ナトリウムバッファー（ｐＨ７．４）中の２０％　スクロース中に４℃で５時間包埋した。低温維持筋肉切片を光学顕微鏡検査によりβ－ガラクトシダーゼ発現に関して最終的に調べた。組織損傷および形態学の評価のために、組織をパラフィン中に包埋し、ヘマトキシリン・エオシン（Ｈ／Ｅ）で染色し、光学顕微鏡下で検査した（Ａｕｓｕｂｅｌら，１９９２に記載のとおりに行った）。

【００７１】

ヘマトクリット、ＥＰＯおよびＳｅＡＰの測定

示されている時点で血液サンプルを集めた。既に記載されているとおりに（Ｒｉｚｚｕｔｏら，１９９９，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９６：６４１７－６４２２）、ヘパリン化毛細管内での全血の遠心分離によりヘマトクリットを測定した。ホスファ・ライト（Ｐｈｏｓｐｈａ－Ｌｉｇｈｔ）（分泌アルカリホスファターゼに関する化学発光レポーターアッセイ）トロピックス（Ｔｒｏｐｉｘ）により、血清ＳｅＡＰレベルをモニターした。分散分析（ＳＴＡＴ－ＶＩＥＷ，Ａｂａｃｕｓ　Ｃｏｎｃｅｐｔ　Ｂｅｒｋｅｌｅｙ　ＣＡ）により、結果を分析した。０．０５未満のＰ値を有意とみなした。

【００７２】

結果－マウス筋肉におけるＥＰＯ遺伝子発現に対するヒアルロニダーゼの効果

ＥＰＯ遺伝子発現に対するＨＹＡｓｅの効果を評価するために、１群４匹のＢａｌｂ／マウス群の四頭筋に、０．５～９０Ｕの範囲の種々の量のＨＹＡｓｅを注入（注射）した。４時間後、３μｇのプラスミドｐＣＭＶ／ｍＥＰＯを同じ筋肉に注入し、前記のとおりに該処理組織をＥＳに付した。処理マウスのＥＰＯレベルおよびＨｃｔ値を、注入の１週間後に測定し、ＨＹＡｓｅが投与されておらず同じ量のｐＣＭＶ／ｍＥＰＯが注入された対照群のものと比較した。図１Ａに示すとおり、ＤＮＡ注入および筋ＥＳマウスにおけるＥＰＯ値の増加は食塩水処理動物（１２１．８ｍＵ／ｍｌ）（１ｍＵ＝１０ｐｇ）の場合と比べて有意であった。９０ＵのＨＹＡｓｅの前注入はＥＰＯ発現における５倍の増加を引き起こした（５５０ｍＵ／ｍｌ）。同様に、３６ＵのＨＹＡｓｅの前注入も、９０Ｕで観察されたものより若干低かったものの、ＥＰＯレベルにおける相当な増加を引き起こした（４５５ｍＵ／ｍｌ）。これとは対照的に、１８、５．４、１．８または０．５ＵのＨＹＡｓｅの注入は、プラスミドＤＮＡのみの注入と比べてＥＰＯレベルにおける実質的な増加を引き起こさなかった。ＥＳにさらされていないマウスにおけるＨＹＡｓｅおよび１００μｇ以下のプラスミドｐＣＭＶ／ｍＥＰＯの注入後には、ＥＰＯレベルの増加は観察されなかった。

【００７３】

血清ＥＰＯレベルの増加は、食塩水処理対照と比べて処理動物のＨｃｔの顕著な増加を引き起こした（図１Ｂ）。しかし、この時点で、測定Ｈｃｔ値は、異なる処理群間では有意には相違しなかった。この時点における種々のマウス群のＨｃｔ値の定量的相違の欠如は、Ｈｃｔの増加の進行を抑制しうるＥＰＯを含む一連の因子により赤血球形成が調節さ

れるという見解を反映しているにすぎない。それにもかかわらず、これらの結果は、ＨＹＡｓｅの前注入がＤＮＡ注入および筋ＥＳの後のＥＰＯ遺伝子発現の増強を招くことを示している。

【００７４】

最高のＥＰＯ遺伝子発現に要求されるＨＹＡｓｅ投与の前注入時を決定するために、ＥＧＴの４時間前、１時間前および１０分前にＢａｌｂ／ｃマウス群にＨＹＡｓｅを注入した。マウス四頭筋に注入するＨＹＡｓｅの量は３６Ｕに固定した。なぜなら、それは７２０Ｕ／ｍｌに相当し、臨床用途に用いられるＨＹＡｓｅの範囲（１５０～１５００Ｕ；Ｂｅｒｇｅｒ，１９８４，Ｊ．Ａｍ．Ｇｅｒｉａｔｒ．Ｓｏｃ．３２：１９９－２０３）内だからである。図２に示すとおり、注入後（ｐ．ｉ．）１週間におけるＥＰＯレベルの測定は、ＤＮＡ注入および筋ＥＳの４または１時間前および１０分前のＨＹＡｓｅ注入が、ＤＮＡのみ注入されたマウスの場合と比べて血清ＥＰＯレベルにおける５倍の増加を引き起こすことを示した。したがって、これらのデータは、プラスミドの電気注入の１０分前のＨＹＡｓｅ投与が、マウスのＥＰＯ遺伝子発現における有意な増強を招くのに十分であることを示している。

【００７５】

ＥＰＯ遺伝子発現に対するＨＹＡｓｅ注入の長期的効果

ＨＹＡｓｅ投与後のＥＰＯ遺伝子発現の増加が時間経過と共に及びＤＮＡ投与と独立して観察されうるかどうかに関する確認を行った。この目的のために、種々の量のプラスミドｐＣＭＶ／ｍＥＰＯを動物群に注入し、ＨＹＡｓｅが前注入されたマウスの血清ＥＰＯレベルを時間経過と共に測定し、ＤＮＡのみで処理されたマウスの場合と比較した（図３Ａ～Ｃ）。第７、５６および１２０日ｐ．ｉ．に測定した血清ＥＰＯレベルは注入ＤＮＡの量と相関した。ＨＹＡｓｅで前処理されたマウスで観察されたＥＰＯ値は、ＤＮＡのみで処理された動物の場合（０．５μｇのＤＮＡでの６４ｍＵ／ｍｌから、５０μｇのＤＮＡが注入されたマウスにおける第７日の３２４ｍＵ／ｍｌまでの範囲であった）より一貫して高かった。ＨＹＡｓｅで前処理され３、１０、５０μｇのプラスミドＤＮＡが注入された群は、ＤＮＡのみが電気注入されたマウスで検出されたものとは有意に異なるＥＰＯレベルを示した。すべての処理群において、循環ＥＰＯは第７日ｐ．ｉ．にピークレベルに達し（図３Ａ）、５６日後には群によって様々に初期値の１／２～１／８に減少し（図３Ｂ）、その後は一定に維持された。また、高レベルのＥＰＯ発現のため、ＨＹＡｓｅの投与後に５０μｇのプラスミドＤＮＡが注入されたマウスは極めて高いＨｃｔ値（＞８５％）を示し、第１２０日ｐ．ｉ．までに死亡した（図３Ｃ）。これらの結果は、ＨＹＡｓｅの注入が、ＤＮＡ投与量とは無関係にＥＰＯ発現の増強をもたらすこと、およびそのような効果が長期間にわたり持続することを示している。

【００７６】

組織損傷の分析

ＥＰＯ遺伝子導入のためのＨＹＡｓｅの使用に伴いうる組織変化の度合を評価した。ＨＹＡｓｅが注入された四頭筋の組織学的分析を第１、３、７および３０日ｐ．ｉ．に行った。注入の２４時間後には、組織変化は検出されなかった。処理の３日後のサンプルのみにおいて、最も顕著で一貫した病理学的所見が観察された（図４Ａ）。これらのサンプルにおいては、全筋肉塊の約２０％で病変が検出された。Ｈ／Ｅで染色されたパラフィン包埋切片においては、筋繊維の広範液化壊死の領域が観察され、各壊死領域においては、単核細胞浸潤物（ほとんどは、マクロファージ由来のもの）が検出された。各領域は、典型的には、反応性線維症により包囲されていた。処理の７日後のサンプルにおいても、類似かつ一貫した壊死病変が観察されたが、この場合には、それらは全筋肉塊の約１％に相当するに過ぎなかった（図４Ｂ）。７日後、線維症反応は観察されず、単核細胞浸潤物はそれほど明らかではなかった。１ヵ月後の線維症病変は散発性であり、該筋塊の１％未満が冒されていた。また、単核細胞浸潤物は、もはや検出されなかった（図４Ｃ）。したがって、これらの知見は、ＨＹＡｓｅ処理により生じる組織損傷が限局性かつ一過性であることを示唆している。

【００７７】
大きな筋肉における遺伝子導入に対するＨＹＡｓｅの効果
大きな筋肉のＥＰＯ遺伝子発現に対するＨＹＡｓｅ投与の効果を評価するために、ウサギ前脛骨筋において一連のＤＮＡ注入実験を行った。これらの研究には、構築物ｐＣＭＶ／ｍＥＰＯｏｐｔを使用した。このプラスミドは、コドンが哺乳動物に最適化されたマウスＥＰＯ ｃＤＮＡを含有する。コドン最適化ＥＰＯ構築物は、より高レベルのＥＰＯを発現すると報告されている（Ｋｉｍら，１９９７，Ｇｅｎｅ １９９：２９３－３０１）。また、ＨＹＡｓｅの効果がＥＰＯ遺伝子発現に限定されたものでないことを確認するために、分泌アルカリホスファターゼをコードするプラスミド（ｐＣＭＶ／ＳｅＡＰ）（Ｂｅｔｔａｎら，１９９４，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２７１：１８７－１８９）をウサギに注入した。図５Ａ～Ｂに示すとおり、２００μｇのｐＣＭＶ／ｍＥＰＯｏｐｔの注入およびＥＳの４０分前に１８０ＵのＨＹＡａｓｅで処理すると、ＥＰＯ発現における３倍の増強が生じた（図５Ａ）。ＨＹＡｓｅの注入量および注入時は、より大きなレベルのＥＰＯ発現をもたらすものであった。ＨＹＡｓｅで処理されたウサギにおいて、２００μｇのｐＣＭＶ／ＳＥＡＰの注入および筋ＥＳの後、発現における１７倍の増強が検出された（図５Ｂ）。０．５および１ｍｇのプラスミドＤＮＡの注入後にも、ＳＥＡＰ発現の同じ増強量が認められた。これらの結果は、マウスで観察された遺伝子発現に対するＨＹＡｓｅの効果を証明するものであり、大動物におけるＤＮＡ注入および筋ＥＳの後に遺伝子発現の効率が増加することを示している。

【００７８】
筋内のβ－ガラクトシダーゼ遺伝子発現に対するＨＹＡｓｅの効果
プラスミドＤＮＡのＥＧＴの後の遺伝子発現の組織分布に対するＨＹＡｓｅの効果を分析するために、β－ガラクトシダーゼ遺伝子を使用した。核局在化シグナルに融合した大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ｌａｃＺをコードする２００μｇのプラスミドｐＣＭＶ／β－ｇａｌ／ＮＬＳを、ＨＹＡｓｅ投与の４０分後に脛骨筋に注入した。該処理筋肉をＥＧＴに付した。また、β－ｇａｌ発現の度合を、ＥＧＴのみで処理されたウサギの場合と比較した。組織学的分析は、陽性Ｘ－ｇａｌ染色の領域が、ＨＹＡｓｅで前処理されたウサギにおいては、ＤＮＡのみで処理された動物の場合より有意に大きいことを示した（図６）。これらの結果は、該組織にわたるプラスミドＤＮＡの分布をＨＹＡｓｅが促進することを示している。

【００７９】
本発明の範囲は、本明細書に記載の特定の実施形態により限定されるものではない。実際、本明細書に記載のものに加えて本発明の種々の修飾が、前記の説明から当業者に明らかとなろう。そのような修飾は添付の特許請求の範囲の範囲内に含まれると意図される。

【図面の簡単な説明】

【００８０】
【図１Ａ】図１Ａ～Ｂは、Ｂａｌｂ／ｃマウスにおいて前注入されたＨＹＡｓｅの濃度に対するプラスミドｐＣＭＶ／ｍＥＰＯの発現の依存性を示す。Ａ．血清ＥＰＯレベル。Ｂ．ヘマトクリットレベル。１群４匹のマウス群において、プラスミドＥＧＴの４時間前に種々の用量のＨＹＡｓｅを四頭筋に注入した。血液サンプルを第１０日ｐ．ｉ．に集め、ＥＧＴ単独および食塩水対照と比較した。データはヘマトクリットおよび血清ＥＰＯの平均±ＳＤである。＊　ＥＧＴ単独の場合と有意に相違する。
【図１Ｂ】図１Ａ～Ｂは、Ｂａｌｂ／ｃマウスにおいて前注入されたＨＹＡｓｅの濃度に対するプラスミドｐＣＭＶ／ｍＥＰＯの発現の依存性を示す。Ａ．血清ＥＰＯレベル。Ｂ．ヘマトクリットレベル。１群４匹のマウス群において、プラスミドＥＧＴの４時間前に種々の用量のＨＹＡｓｅを四頭筋に注入した。血液サンプルを第１０日ｐ．ｉ．に集め、ＥＧＴ単独および食塩水対照と比較した。データはヘマトクリットおよび血清ＥＰＯの平均±ＳＤである。＊　ＥＧＴ単独の場合と有意に相違する。
【図２】図２は、プラスミドＥＧＴの増強に対するＨＹＡｓｅの前注入の時点の効果を示す。１群４匹のＢａｌｂ／ｃマウス群に、プラスミドＥＧＴの前の種々の時点で３６Ｕの

ＨＹＡｓｅを前注入した。血液サンプルを第７日ｐ．ｉ．に集め、ＥＧＴ単独および食塩水対照と比較した。データは平均±ＳＤ血清ＥＰＯである。＊　ＥＧＴ単独の場合と有意に相違する。

【図３Ａ】図３Ａ～Ｃは、ＥＰＯ発現に対するＨＹＡｓｅ注入の長期的効果を示す。１群４匹のＢａｌｂ／ｃマウス群に、プラスミドＥＧＴの１時間前に３６ＵのＨＹＡｓｅを注入した。種々のＤＮＡ用量を注入した動物の血清ＥＰＯレベルを、（Ａ）第７日、（Ｂ）第５６日および（Ｃ）第１２０日ｐ．ｉ．において比較した。データは平均±ＳＤ血清ＥＰＯである。＊　ＥＧＴ単独の場合と有意に相違する。

【図３Ｂ】図３Ａ～Ｃは、ＥＰＯ発現に対するＨＹＡｓｅ注入の長期的効果を示す。１群４匹のＢａｌｂ／ｃマウス群に、プラスミドＥＧＴの１時間前に３６ＵのＨＹＡｓｅを注入した。種々のＤＮＡ用量を注入した動物の血清ＥＰＯレベルを、（Ａ）第７日、（Ｂ）第５６日および（Ｃ）第１２０日ｐ．ｉ．において比較した。データは平均±ＳＤ血清ＥＰＯである。＊　ＥＧＴ単独の場合と有意に相違する。

【図３Ｃ】図３Ａ～Ｃは、ＥＰＯ発現に対するＨＹＡｓｅ注入の長期的効果を示す。１群４匹のＢａｌｂ／ｃマウス群に、プラスミドＥＧＴの１時間前に３６ＵのＨＹＡｓｅを注入した。種々のＤＮＡ用量を注入した動物の血清ＥＰＯレベルを、（Ａ）第７日、（Ｂ）第５６日および（Ｃ）第１２０日ｐ．ｉ．において比較した。データは平均±ＳＤ血清ＥＰＯである。＊　ＥＧＴ単独の場合と有意に相違する。

【図４Ａ】図４Ａ～Ｃは、ＨＹＡｓｅを注入したマウス四頭筋の組織学的分析を示す。マウス四頭筋に３６ＵのＨＹＡｓｅを注入し、組織を（Ａ）第３日、（Ｂ）第７日および（Ｃ）第３０日ｐ．ｉ．において分析した。

【図４Ｂ】図４Ａ～Ｃは、ＨＹＡｓｅを注入したマウス四頭筋の組織学的分析を示す。マウス四頭筋に３６ＵのＨＹＡｓｅを注入し、組織を（Ａ）第３日、（Ｂ）第７日および（Ｃ）第３０日ｐ．ｉ．において分析した。

【図４Ｃ】図４Ａ～Ｃは、ＨＹＡｓｅを注入したマウス四頭筋の組織学的分析を示す。マウス四頭筋に３６ＵのＨＹＡｓｅを注入し、組織を（Ａ）第３日、（Ｂ）第７日および（Ｃ）第３０日ｐ．ｉ．において分析した。

【図５Ａ】図５Ａ～Ｂは、ウサギにおけるプラスミドＥＧＴに対するＨＹＡｓｅ注入の効果を示す。プラスミドＥＧＴの４０分前に１８０ＵのＨＹＡｓｅを脛骨筋に注入した。２００μｇのプラスミドｐＣＭＶ／ｍＥＰＯｏｐｔまたは２００μｇのプラスミドｐＣＭＶ／ＳｅＡＰをウサギに注入した。血液サンプルを第４日ｐ．ｉ．に集め、血清ＥＰＯ（Ａ）およびＳｅＡＰ（Ｂ）レベルを測定し、プラスミドＥＧＴ単独で処理された動物において検出されたものと比較した。データは、４匹のウサギにおいて測定した平均±ＳＤである。＊　ＥＧＴ単独の場合と有意に相違する。

【図５Ｂ】図５Ａ～Ｂは、ウサギにおけるプラスミドＥＧＴに対するＨＹＡｓｅ注入の効果を示す。プラスミドＥＧＴの４０分前に１８０ＵのＨＹＡｓｅを脛骨筋に注入した。２００μｇのプラスミドｐＣＭＶ／ｍＥＰＯｏｐｔまたは２００μｇのプラスミドｐＣＭＶ／ＳｅＡＰをウサギに注入した。血液サンプルを第４日ｐ．ｉ．に集め、血清ＥＰＯ（Ａ）およびＳｅＡＰ（Ｂ）レベルを測定し、プラスミドＥＧＴ単独で処理された動物において検出されたものと比較した。データは、４匹のウサギにおいて測定した平均±ＳＤである。＊　ＥＧＴ単独の場合と有意に相違する。

【図６】図６は、ＨＹＡｓｅの前注入を伴う又は伴わないプラスミドｐＣＭＶ／β－ｇａｌ／ＮＬＳ　ＥＧＴの後のβ－ガラクトシダーゼの発現を示す。３６０ＵのＨＹＡｓｅをプラスミドＥＧＴの４０分前にウサギ前脛骨筋に注入した。筋肉を第４日ｐ．ｉ．に集め、「材料および方法」の節に記載されているとおりに処理した。左側の筋肉は、ＨＹＡｓｅで前処理されたウサギからの前脛骨筋を表し、右側の筋肉は、プラスミドＤＮＡ単独で電気注入されたウサギのものを表す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Istituto Di Ricerche Di Biologia Molecolare P. Angeletti

<120> Methods of Increasing Electro-Gene
Transfer of Nucleic Acid Molecules into Host Tissue

<130> ITR0004 PCT

<150> 60/333,338
<151> 2001-11-26

<160> 1

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 579
<212> DNA
<213> House Mouse (mus musculus)

<400> 1
atgggcgtgc ccgagcgccc caccctgctg ctgctgctga gcctgctgct gatccccctg 60
ggcctgcccg tgctgtgcgc ccccccccgc ctgatctgcg acagccgcgt gctggagcgc 120
tacatcctgg aggccaagga ggccgagaac gtgaccatgg gctgcgctga gggccccccgc 180
ctgagcgaga acatcaccgt gcccgacacc aaggtgaact tctacgcctg gaagcgcatg 240
gaggtggagg agcaggccat cgaggtgtgg cagggcctgt ccctgctgtc tgaggccatc 300
ctgcaggccc aggccctgct ggccaactcc tcccagcccc ccgagaccct gcagctgcac 360
atcgacaagg ccatcagcgg cctgcgctcc ctgacctccc tgctgcgcgt gctgggcgcc 420
cagaaggagc tgatgagccc ccccgacacc acccccccccg ccccccctgcg caccctgacc 480
gtggacacct tctgcaagct gttccgcgtg tacgccaact tcctgcgcgg caagctgaag 540
ctgtacaccg gcgaggtgtg ccgccgcggc gaccgctga 579

【図１Ａ】

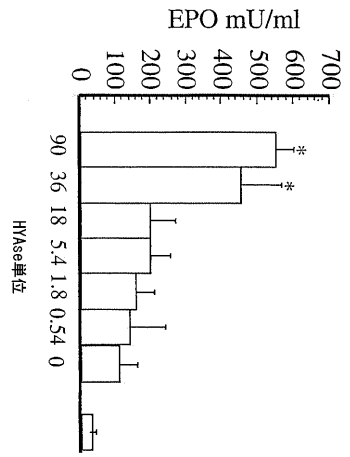


FIGURE 1A

【図１Ｂ】

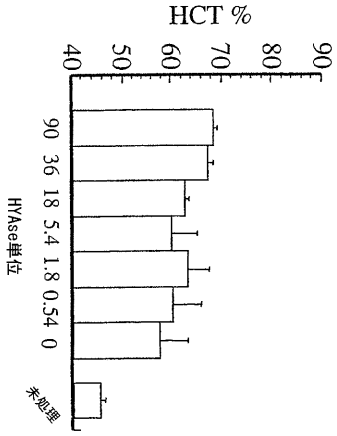


FIGURE 1B

【図２】

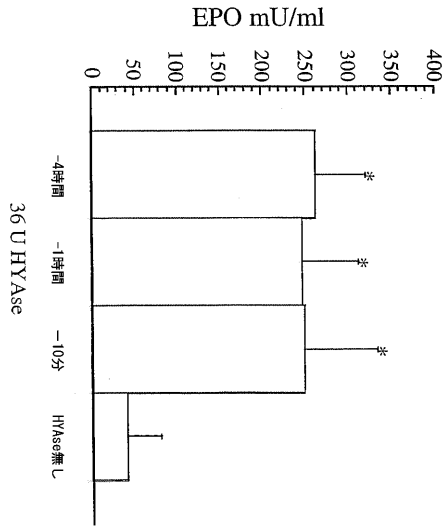


FIGURE 2

【図３Ａ】

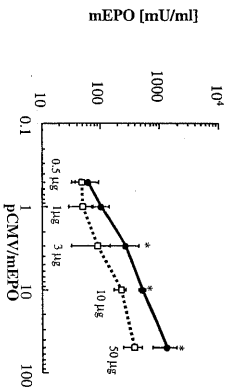


FIGURE 3A

【図３Ｂ】

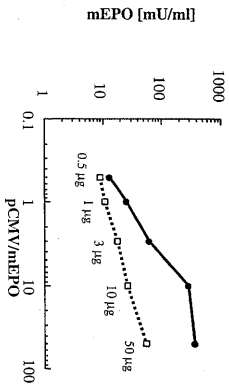


FIGURE 3B

【図３Ｃ】

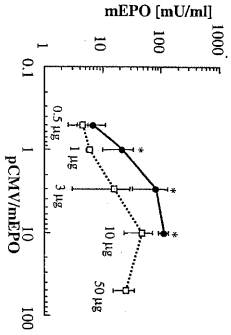


FIGURE 3C

【図４Ａ】



FIGURE 4A

【図４Ｂ】

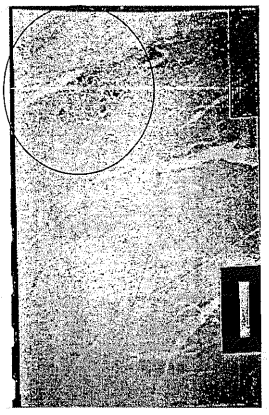


FIGURE 4B

【図４Ｃ】

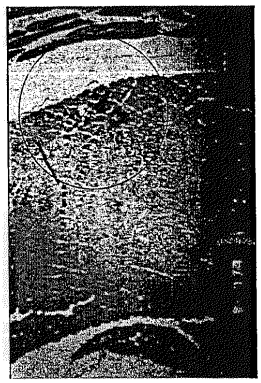


FIGURE 4C

【図５Ａ】

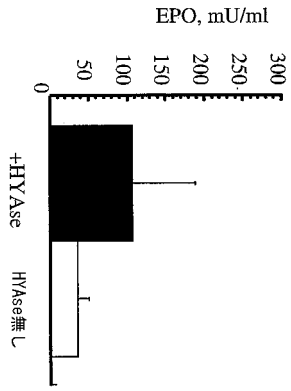


FIGURE 5A

【図５Ｂ】

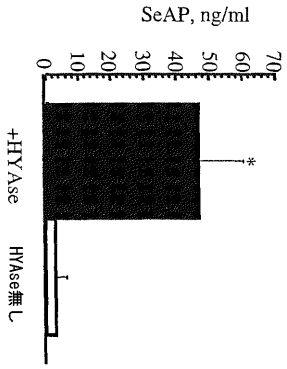


FIGURE 5B

【図６】



FIGURE 6

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/13097

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K47/42

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)
IPC 7 A61K

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 practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data, SCISEARCH, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MCMAHON J M ET AL: "Optimisation of electrotransfer of plasmid into skeletal muscle by pretreatment with hyaluronidase-increased expression with reduced muscle damage" GENE THERAPY, ENGLAND, vol. 8, no. 16, August 2001 (2001-08), pages 1264-1270, XP009005905 ISSN 0969-7128 abstract "Discussion" ---	1-30
X	US 6 258 791 B1 (BRAUN SERGE) 10 July 2001 (2001-07-10) column 1, line 5 - line 15 --- -/--	28-30

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in 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 document but published on or after the international filing date

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 February 2003	28/02/2003

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Pilling, S

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/13097

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	MENNUNI CARMELA ET AL: "Hyaluronidase increases electrogene transfer efficiency in skeletal muscle." HUMAN GENE THERAPY. UNITED STATES, vol. 13, no. 3, 10 February 2002 (2002-02-10), pages 355-365, XP009005904 ISSN: 1043-0342 abstract "Discussion" ----	1-30

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 02/13097

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6258791 B1	10-07-2001	FR 2763958 A1	04-12-1998
		AT 224736 T	15-10-2002
		AU 752146 B2	05-09-2002
		AU 8023898 A	30-12-1998
		DE 69808274 D1	31-10-2002
		EP 0980263 A1	23-02-2000
		WO 9853853 A1	03-12-1998
		JP 2002500662 T	08-01-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI	テーマコード（参考）
Ａ６１Ｍ 37/00	Ａ６１Ｍ 37/00	４Ｃ１６７
Ａ６１Ｐ 43/00	Ａ６１Ｐ 43/00 １１１	
Ｃ１２Ｎ 15/09	Ｃ１２Ｎ 15/00 Ａ	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）
ＪＡＶＡ

(74)代理人 100124855
弁理士 坪倉 道明
(72)発明者 フアツトーリ，エレナ
イタリー国、イ－０００４０・ポメツイア、ビア・ポンテイーナ・キロメトロ・３０．６００、イ・エレ・ビ・エメ
(72)発明者 ラ・モニカ，ニコラ
イタリー国、イ－０００４０・ポメツイア、ビア・ポンテイーナ・キロメトロ・３０．６００、イ・エレ・ビ・エメ
(72)発明者 メンニユイ，カルメーラ
イタリー国、イ－０００４０・ポメツイア、ビア・ポンテイーナ・キロメトロ・３０．６００、イ・エレ・ビ・エメ

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 CA01 CA11 DA02 EA04 GA11 GA14 HA17
4B065 AA90X AB01 AC14 BA02 BA03 BD44 CA24 CA44 CA45
4C076 AA95 BB31 CC29 EE41A FF34
4C084 AA17 MA05 MA66 NA13 ZC022
4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA05 MA66 NA13 ZC02
4C167 AA80 BB26 BB42 CC04 DD07 GG16