(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4285766号
(P4285766)

(45)発行日　平成21年6月24日(2009.6.24)　(24)登録日　平成21年4月3日(2009.4.3)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 48/00	(2006.01)	A61K	48/00	
A61P 3/06	(2006.01)	A61P	3/06	
A61P 7/04	(2006.01)	A61P	7/04	
A61P 43/00	(2006.01)	A61P	43/00	
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A

請求項の数 11　(全 67 頁)

(21)出願番号	特願平7-524826
(86)(22)出願日	平成7年3月23日(1995.3.23)
(65)公表番号	特表平10-503469
(43)公表日	平成10年3月31日(1998.3.31)
(86)国際出願番号	PCT/US1995/003677
(87)国際公開番号	WO1995/025809
(87)国際公開日	平成7年9月28日(1995.9.28)
審査請求日	平成13年12月10日(2001.12.10)
審判番号	不服2004-20786(P2004-20786/J1)
審判請求日	平成16年10月7日(2004.10.7)
(31)優先権主張番号	08/216,534
(32)優先日	平成6年3月23日(1994.3.23)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　504376588
オハイオ　ユニバーシティ
アメリカ合衆国　オハイオ州４５７０１－２９２９　アシンス，　アールティイーシー　１２０
(73)特許権者　500429332
ケース　ウェスタン　リザーブ　ユニバーシティ
ＣＡＳＥ　ＷＥＳＴＥＲＮ　ＲＥＳＥＲＶＥ　ＵＮＩＶＥＲＳＩＴＹ
アメリカ合衆国、４４１０６、オハイオ州、クリーブランド、ユークリッド　アベニュー　１０９００
(74)代理人　100083714
弁理士　舟橋　榮子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】緻密にした核酸および細胞へのデリバリ

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

非凝集核酸コンプレックスから成る非天然に生じる組成物であって、各コンプレックスが単一の一本鎖又は二本鎖核酸分子および１またはそれ以上のキャリヤ分子から成り、前記キャリヤ分子が核酸にコンプレックスするポリカチオンを有し、そして任意に標的細胞に結合しこれによって前記コンプレックスがさらに容易に標的細胞に入ることができる標的細胞結合部分を有し、前記コンプレックスが１２ｎｍ以下の直径に緻密化されている組成物。

【請求項２】

標的細胞結合部分がガラクトース、ラクトースおよびマンノースから選択される請求項１記載の組成物。

【請求項３】

非凝集核酸コンプレックスから成る非天然に生じる組成物であって、各コンプレックスが単一の二本鎖核酸分子および１またはそれ以上のキャリヤ分子から成る請求項１記載の組成物。

【請求項４】

非凝集核酸コンプレックスから成る非天然に生じる組成物を調製する方法であって、各コンプレックスが単一核酸分子および１またはそれ以上のポリカチオンから成り、前記方法が：

１２ｎｍ以下である直径にコンプレックスを緻密にするために十分なカオトロピック塩濃

度でポリカチオンと核酸分子を結合し、これによって非凝集核酸コンプレックスが形成され、各コンプレックスは単一核酸分子および１またはそれ以上のポリカチオンから成る方法。

【請求項５】

非凝集核酸コンプレックスから成る非天然に生じる組成物を調製する方法であって、各コンプレックスが単一の核酸分子および１またはそれ以上のポリカチオンから成り、前記方法が：

コンプレックスを形成するように溶媒中に核酸分子とポリカチオンをカオトロピック塩の存在で混合し、前記混合は追加のカオトロピック塩の不在で行われ、これによって核酸は凝集体を形成することなくポリカチオンと非凝集性コンプレックスを形成し、各コンプレックスは単一核酸分子および１またはそれ以上のポリカチオンから成り、コンプレックスは、１２ｎｍ以下の直径をもつ請求項４記載の方法。

【請求項６】

請求項５の方法によって作られた核酸と１またはそれ以上のポリカチオンの非凝集性の緻密化した核酸コンプレックスから成る非天然に生じる組成物。

【請求項７】

（１）治療上有用な各コンプレックスが単一の核酸分子および１またはそれ以上のキャリヤ分子から成り、前記キャリヤ分子が核酸にコンプレックスするポリカチオンを有し、そして、任意に、標的細胞に結合しこれによって前記コンプレックスがさらに容易に標的細胞に入ることができるガラクトース、ラクトースおよびマンノースから成る群から選択される標的細胞結合部分を有し、前記コンプレックスが１２ｎｍ以下の直径に緻密化されている、非凝集核酸コンプレックス、および（２）製薬学的に受容できるキャリヤからなる製薬組成物。

【請求項８】

（１）各コンプレックスが単一核酸分子および１またはそれ以上のキャリヤ分子から成り、前記キャリヤ分子が核酸にコンプレックスするポリカチオンを有し、前記コンプレックスが１２ｎｍ以下の直径に緻密化されている、非凝集核酸コンプレックス、および（２）製薬学的に受容できるキャリヤからなる製薬組成物。

【請求項９】

各コンプレックスが単一のクロリドチャンネルを符号化する核酸分子および１またはそれ以上のキャリヤ分子から成り、前記キャリヤ分子が核酸にコンプレックスするポリカチオンを有し、そして、任意に、標的細胞に結合しこれによって前記コンプレックスがさらに容易に標的細胞に入ることができるガラクトース、ラクトースおよびマンノースから成る群から選択される標的細胞結合部分を有し、前記コンプレックスが１２ｎｍ以下の直径に緻密化されている、非凝集核酸コンプレックスからなる、嚢胞性繊維症の予防または治療用製剤。

【請求項１０】

各コンプレックスが単一のヒトＬＤＬ受容体を符号化する核酸分子および１またはそれ以上のキャリヤ分子から成り、前記キャリヤ分子が核酸にコンプレックスするポリカチオンを有し、そして、任意に、標的細胞に結合しこれによって前記コンプレックスがさらに容易に標的細胞に入ることができるガラクトース、ラクトースおよびマンノースから成る群から選択される標的細胞結合部分を有し、前記コンプレックスが１２ｎｍ以下の直径に緻密化されている、非凝集核酸コンプレックスからなる、家族性過コレステリン血症の予防または治療用製剤。

【請求項１１】

各コンプレックスが単一のヒト因子ＩＸを符号化する核酸分子および１またはそれ以上のキャリヤ分子から成り、前記キャリヤ分子が核酸にコンプレックスするポリカチオンを有し、そして、任意に、標的細胞に結合しこれによって前記コンプレックスがさらに容易に標的細胞に入ることができるガラクトース、ラクトースおよびマンノースから成る群から選択される標的細胞結合部分を有し、前記コンプレックスが１２ｎｍ以下の直径に緻密化

されている、非凝集核酸コンプレックスからなる、血友病Ｂの予防または治療用製剤。
【発明の詳細な説明】
本発明は現在係属中の1994年3月23日に出願された米国特許出願第08/216,534号の一部継続出願である。
発明の背景
発明の技術分野
本発明は核酸の緻密化および緻密にした外来性の核酸を多細胞の生物体の細胞に、インヴィヴォでデリバリすることに関するものである。
背景技術の説明
機能外来性遺伝子は、インヴィトロでトランスフェクション、直接ミクロ注入、電気窄孔法、およびリン酸カルシウムとの共沈を含む種々の物理的方法によって哺乳類の細胞に導入することができる。しかし、これらの技術の大部分は無傷の動物内の細胞に遺伝子をデリバリするためには非実用的である。
インヴィヴォでの受容体依存性の緻密化していないＤＮＡのデリバリ。受容体媒介遺伝子導入はトランス遺伝子を適当な受容体細胞に導入する際にインヴィヴォおよびインヴィトロで成功することが示された。この方法は、関係する組織の表面の特定の受容体を標的にするように選択される共有結合したリガンドを含むポリカチオン蛋白質（通常ポリ－Ｌ－リシン）に、ＤＮＡを結合することを含む。遺伝子は組織によって集められ、細胞核に移送され、時間を変えて発現される。標的組織のトランス遺伝子の発現の全体のレベルは幾つかの因子に依存する：ＤＮＡキャリヤ複合体の安定性、標的細胞の表面の特異的受容体の存在と数、受容体－キャリヤリガンドの相互作用、エンドサイトーシスおよび複合体の細胞核への移送、および標的細胞の核中の遺伝子転写の有効性である。
ウらは、USP 5,166,320に、ポリ核酸結合剤（例えばポリリシン、ポリアルギニン、ポリオルニチン、ヒストン、アビジン、またはプロタミン）および組織受容体特異的蛋白質リガンドの共役体を使用するＤＮＡの組織特異的デリバリを開示している。肝臓細胞を標的にするために、ウは「アシアロ糖蛋白質（ガラクトース末端）リガンド」を示唆している。これらは、適当な糖蛋白質の脱シアル化によって、またはラクトースを非ガラクトース挙動蛋白質に結合することによって形成することができると、ウは言っている。ポリ核酸と共役体のモル比は、１：10ないし10：１さらに」般的には１：５ないし５：１、さらに好ましくは１：２ないし３：１の範囲である。ウらによって記述されていないが、われわれの手元には、ウの方法は少なくとも80nmの直径をもつ構造体が得られている。
ロウらは、USP 5,108,921に、受容体依存性エンドサイトーシスを使用して細胞を形質転換するためＤＮＡにビオチンを結合することを開示している。
ストンプらは、USP 5,122,466に、そしてマックケーブらは、USP 5,120,657に、物質にポリリシンを共役結合し、次にＤＮＡをそれに複合させることにより、ＤＮＡを金属ペレットに結合することを開示している。得られた生成物は次に細胞の弾道形質転換に使用される。参照ストンプら、７欄、29～37行目およびマックケーブら、７欄、49～65行目。
ワグナーらは、Proc.Natl.Acad.Sci.,88:4255-4259（1991）に、受容体媒介エンドサイトーシスを介して細胞にＤＮＡをデリバリするためトランスフェリン－ポリリシン結合体とＤＮＡを複合化することを開示している。ワグナーらは、80-100nmの直径のドーナツ形の構造体にプラスミドＤＮＡを緻密にするように混合物中にポリカチオンが十分にあることが重要であると教示し、エンドサイトーシスの発生を容易にすると彼等は推測している。ワグナーらは、一層小さい直径の構造体を得る価値については認識してなく、またさらなる緻密化を得る方法を教示していない。ワグナーらの構造体は多分子コンプレックスであり、これはマクロファージ食作用に一層無防備であり、標的組織による取り込みにあまり敏感に反応しないという欠点をもつ。
裸の緻密化していないＤＮＡの直接の注入。裸のＤＮＡを動物組織に直接注入することによって遺伝子発現を検出する可能性は、最初ドベンスキらによって、Proc.Nat.Acad.Sci.USA,81:7529-33（1984）に示され、マウスの肝臓または脾臓に注入したウイルスまたはプラスミドのＤＮＡは検出できるレベルで発現されたことを示した。このＤＮＡはリン酸カ

ルシウムを使用して沈澱させ、ヒアルロニダーゼおよびコラゲナーゼと一緒に注入された。トランスフェクションした遺伝子は宿主動物の肝臓中に複製することが示された。ベンベニスティおよびレシェフは、Proc.Nat.Acad.Sci.USA,83:9551-55（1986）に、リン酸カルシウム沈澱ＤＮＡを新生児のラットに腹腔内に注入し、トランスフェクション48時間後、動物の肝臓中の遺伝子発現に注目した。1990年に、ウォルフらは、Science,247:1456-68（1990）に、ＤＮＡまたはＲＮＡ発現ベクターをマウスの筋肉に直接注入すると２ヶ月までの期間、遺伝子の発現を検出できることを報告した。この技法はアスカジら、New Biologist,3:71-81（1991）によって拡張され、裸のＤＮＡをラットの心臓に直接注入し、注入した遺伝子は動物の心臓中に25日まで発現された。ジストロフィンのための遺伝子を含む他の遺伝子は、この技法を使用してマウスの筋肉に注入された。この方法は、標的組織に直接注入することによる遺伝子の投与によって動物に免疫反応を生成させるための幅広いアプローチの土台を形成している。遺伝子は、一時的に発現され、特定の抗原を生成する（参照、ドネリーら、The Immunologist,21,20-26（1994）最近の概説）。しかし、これらの実験に使用されるＤＮＡは、細胞内での生存、細胞核への取り込み、または標的細胞の核中の転写の割合を改善するように改質されあるいは緻密にされていなかった。

溶液中のＤＮＡの挙動。リン酸塩の中心軸が負に高帯電された性質によって、ＤＮＡは溶液中で棒状の分子であり、その基本構造はヘリックスと結合した水和殻の修飾によって摂動することができる。この摂動は、二つの方法でもたらされる；第一に、ＤＮＡ分子の荷電中性化度の変化が、広範囲な緻密化となり、緻密構造の形でＤＮＡ相を結局分離する（沈澱）、そして第二に、ＤＮＡヘリックスの比誘電率の変化が緻密構造を形成することになる。これらの摂動はＤＮＡ分子のコンホメーションを変化させて、曲げて緻密になる可撓性ポリマーを可能にし、ＤＮＡ分子の流体力学の性質を著しく変えることになる。得られた構造はＤＮＡが比較的高等な真核生物中の染色体あるいはウイルスキャプシドの内側で呈する性質に似た性質であると考えられている。

比較的高等な真核生物の核中のＤＮＡは、リシンおよびアルギニン（ヒストン類）またはアルギニン（プロタミン類）が多く含まれている塩基性の核蛋白質（すなわち、ヒストン類およびプロタミン類）と完全に結合する。これらの塩基性蛋白質とＤＮＡのコンプレックスは、染色体形成の際に生じるＤＮＡ緻密化をコントロールするために反応し、遺伝子発現の制御に一役を担うと考えられる。ウイルス、バクテリアおよび真核生物の細胞核中に生理学的に生じるＤＮＡ緻密化は、実験室で再現することは非常に困難である。理論的には、ＤＮＡの中心軸の高く負に荷電した性質によって、ＤＮＡの荷電を中性化するような変化は広範囲な緻密化をもたらし、結局、緻密構造の形でＤＮＡ相を分離する（沈澱）。しかし、ＤＮＡ－ポリカチオンコンプレックスの溶液中での振舞はＤＮＡとポリカチオン蛋白質とのコンプレックス形成のための方法に依存する。

核蛋白質コンプレックス形成のためのモデルとしてカチオンのホモポリペプチドを使用するオリンズ、オリンズおよびフォン・ヒップルによる研究は（J.Mol.Bio.24,157-176,1967）、溶液中で両成分をアニーリングした後に、カチオンのポリペプチド（ポリ－Ｌ－リシン、ポリ－Ｌ－アルギニンおよびポリ－Ｌ－オルニチン）とＤＮＡの特定のコンプレックスの生成のための証拠を示した。この方法は２Ｍないし0.010MのNaCl濃度からステップダウン透析を含んでいた。

この研究でいくつかのコメントをすることができる。先ず、ポリカチオンをＤＮＡに添加して形成されたコンプレックスの熱変性は、研究した各ケースで生じたＤＮＡにポリカチオンを結合し、ＤＮＡの二本鎖構造を安定にする。このシステムは、比誘電率の変化（すなわち、アルコール脱水）が、ＤＮＡの熱変性特性の変化がないＤＮＡ崩壊となるものとは異なることに注目することが重要である。第二に、分光光度計による研究は、260nmでの最大吸収が、300nm（ポリカチオンもＤＮＡも何ら吸収を示さない領域）よりも大きい波長で濁度が連続して増加する赤色に僅かにシフトすることを示した。これらの特性は、ＤＮＡとポリペプチドとの間の相互作用によって生じる可能性がある、コンホメーションの小さい変化が変則の吸収スペクトルによって検出されたことを示していると考えられた。第三に、塩基性ポリペプチドをＤＮＡに添加して形成されたコンプレックスは、分子凝

集となり、沈澱物を生成することになる。
旋光分散および偏光二色性は、塩基性ホモポリペプチドおよびＤＮＡ間の溶液中での相互作用の研究に応用された。シャピロ、レングおよびフェルセンフェルド（Biochemistry,8:3219-3232,1969）は、旋光性を試験してＤＮＡコンプレックスの形成と関連した二次構造の変化を、ステップダウン塩透析における両成分をアニーリングするものとは基本的に異なるＤＮＡにポリリシンをコンプレックスするためのプロトコルを用いて、解明させた。彼等は直接ポリリシンとＤＮＡを高塩溶媒（１Ｍ NaCl）中に混合し、「可溶性」コンプレックスを形成させた。高度の濁度は溶液中のコンプレックスと関連し、成分の凝集を示す。偏光二色スペクトルが320ないし360nmの範囲の波長で漸近的にベースラインに達するので、凝集はコンプレックスの旋光性を決定するために使用した。異常なスペクトルは常に濁度と関連していた。われわれは、光学活性の変化が凝集の際の高次の分子コンプレックスの形成から生じると推論した。
上述の実験条件下で得られたＤＮＡコンプレックスは、約5000から10000単位の間で変化する半沈降係数をもつ。平均粒子は直径340nmであり、（光散乱によって与えられる情報を使用して計算した）そして粒子は平均乾燥質量が約70核酸／ポリペプチド分子単位に相当していた。これらの研究によって提供される情報は、完全に量的ではないが、ＤＮＡが塩基性ポリペプチドに結合した後に受ける構造の変化を表す。
溶液におけるＤＮＡ－ポリベースコンプレックスの構造の幾つかの局面が研究された（ハイネス、ギャレットおよびグラツェル, Biochemistry,9:4410-4416,1970）。電子顕微鏡によってシャピロらによって記述されたコンプレックスの規則正しい性質を確認された；ＤＮＡ構造体は外形が300nmのドーナツ状のトロイドとして形成していた。ＤＮＡポリ塩基コンプレックスのC.D.および電子顕微鏡の特徴は、一本鎖ポリヌクレオチド－ポリベースコンプレックス、すなわち、rRNA、ポリ（A）、ポリ（U）等）が異常な光学活性を示さないので、ワトソン・クリックＤＮＡヘリックスにある構造因子に対応していることである。また、規則正しい構造は電子顕微鏡で検出することができる。基本傾斜および／またはヘリックスピッチの変化が、コンプレックス中に観察することができるかどうか明らかにするために、コンプレックスのＸ線回折パターンが決定された。二重ヘリックスは水溶液中の遊離ＤＮＡに対し得られる通常Ｂ形である；ＤＮＡのＣまたはＡ形に対しては明確なトランジションは見られず、ＤＮＡが溶液中の塩基性ポリペプチドに入り込む際に異なる構造形が存在することを示唆している。また塩濃度が減少するときＤＮＡ－ポリリシンコンプレックス中のカウンターイオンが連続的に置換することにより示されるように、電荷が直接ペアになるＤＮＡ－ポリメラーゼコンプレックスの結合もある。従って塩基と荷電したアミノ基との間の強い相互作用はいずれも全く有りそうにない。従って、溶液中のＤＮＡの異常な回転力はキラルパッキングから生じ、この種の現象は同じ平面内の分子の非対称のパッキングに大きい周期性が現れることと関連している。
レルマンらは、Proc.Nat.Acad.Sci.USA,68:1986-90（1971）に、ファージＤＮＡの希釈溶液を十分に高い濃度の単一の中性のポリマー（ポリエチレンオキシド）を高NaCl（細胞内の環境に似せた）の存在下に混合すると、ファージＤＮＡ分子はファージ頭部の緻密な中身に近づく粒子に崩壊する。ＤＮＡコンプレックスの構造はゴスルおよびシェルマンによって決定された（Nature 259：333-335,1976）。彼等の発表とさらに詳細な報告（Gosule,L.,Chattoraj.D.K.,and Schellman.J.,Advances in Polyamine Research 1:201-215,1978）は、塩基性ポリペプチド（スペルミンおよびスペルミジン）によるＤＮＡのコンパクション（非常に希釈した溶液中）は、最初にLi,Biopolymers,12:287（1973）によって記載された条件下に、トロイド構造で得られた。ゴスルおよびシェルマンによって生成されたコンプレックスは最大半径が約50nmに詰められたファージＤＮＡの単一ＤＮＡ単位からなる単分子構造をもっていた。著者らはポリアミンはバクテリア細胞に存在することが知られていると記している。またＤＮＡコンパクションはLaemmli,PNAS 72:4288-92（1975）およびPost and Zimm,Biopolymers,21:2123-32（1982）によって議論されている。
この明細書中で引用した全参照文献はここに参照文献として組み込まれる。いずれの参照文献も従来技術を構成している。参照文献の議論は引用した文書が正確で適切であること

を吟味する権利を保有する。

発明の概要

本発明は、実質的に凝集しないで、核酸を緻密にするための方法、およびこの緻密にしたＤＮＡの治療用途に関するものである。緻密な核酸は生体細胞の膜、特に多細胞の生物体中の細胞を通って有効にデリバリすることができる。小さい粒子に圧縮されたＤＮＡは核の細孔を通る核輸送に一層適しており、ヌクレアーゼから保護することができる。核酸が発現できる遺伝子を含むとき、この遺伝子は細胞中で発現することができる。

幾つかの環境では、組織特異的キャリヤ分子は、核酸結合部分と標的組織結合部分をもつ二機能の分子が調製される。次に核酸を、臨界塩濃度でキャリヤ分子を用いて高濃度に緻密にする。核酸を装填したキャリヤ分子は、次に生物体に投与する。核キャリヤ分子は単一の核酸分子をもつ。

他の好適例では、標的組織結合キャリヤ分子を使用しない。しかし、核酸はさらに、核酸と溶媒の間の相互作用を減らす核酸結合部分からなるキャリヤ分子とコンプレックスを形成して緻密にする。緻密になったコンプレックスは生物体に投与する。

後記の請求の範囲は、ここに本発明の好適例の詳説としてこの記述の中に引用して組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

図１－ガラクトース－ポリ－Ｌ－リシン／ＤＮＡコンプレックスの物理的特徴

図１Ａは溶液中の通常のＤＮＡ、およびある一定のポリ－Ｌ－リシン／ＤＮＡコンプレックスとを関連させたＣＤスペクトルを示す。60ミクログラムのＲＮＡフリーＣＭＶ－β－ガラクトシダーゼプラスミド（ＴＥ緩衝液に溶解、ｐＨ８）と150μｌの700mM NaClを中間速度でVIBRAX装置（IKA-VIBRAX-VXR）中で渦巻状に混合した。150μｌの700mM NaCl中の19ミクログラムのα－ガラクトピラノシル－フェニルイソチオシアネート／ポリ－Ｌ－リシン二共役体を渦巻状に混合しているＤＮＡ溶液に滴加した。ポリカチオンをゆっくりと加えると、濁った溶液を形成し、これを３μｌのアリコートの５M NaClを徐々に一滴ずつ添加して溶解する。濁りが消えたことは目でモニターし、ＤＮＡ／ポリ－Ｌ－リシンコンプレックスの溶液をＣＤによって調べた。この点で（0.97M NaCl）、ＣＤスペクトルは凝集ＤＮＡの特徴があった。さらに２μｌのアリコートの５M NaCl（1.031M NaClの濃度になる）を添加すると、凝縮した（または弛緩した）ＤＮＡコンプレックスに予期されるＣＤスペクトルが生じた。１M NaClでコンプレックスしていない二本鎖でのスペクトルも得られた。スペクトルは0.1cmのキュベットを備えたJASCO-600分光偏光計を使用して得られた。緩衝液のスペクトルをケース毎に減じた。

図１Ｂ－１Ｇは電子顕微鏡写真（ＥＭ）である。１Ｂ－１Ｄ、１Ｆおよび１Ｇは300,000Xで取った。１Ｄの棒線は33.3nmを示す。図１Ｅは600,000xで取った。棒線は16.6nmの長さである。酢酸ウラニル染色は従来技術として記載されているように行った（Ennever ら、Biochem.Biophys.Acta,826:67（1985））。簡単には、染色の前にグリッドにグロー放電した。ＤＮＡ溶液を一滴グリッドに添加し、0.04％の酢酸ウラニルを使用してブロットして染色した。

図１Ｂ－１Ｆに示したＥＭ研究のため、60μｇのPEPCK-hFIXプラスミドＤＮＡ（ＴＥ緩衝液に溶解、ｐＨ８）を、150μｌの700mM NaCl中で中間速度でVIBRAX装置（IKA-VIBRAX-VXR）中で渦巻状に混合した。150μｌの700mM NaCl中の19ミクログラムのα－ガラクトピラノシル－フェニルイソチオシアネート／ポリ－Ｌ－リシン二共役体を渦巻状に混合しているＤＮＡ溶液に滴加した。ポリカチオンをゆっくりと加えると、濁った溶液を形成し、これを３μｌのアリコートの５M NaClを徐々に一滴ずつ添加して溶解する。濁りが消えたことは目でモニターし、ＤＮＡ／ポリ－Ｌ－リシンコンプレックスの溶液をＥＭ（図１Ｃ）によって調べた。さらに２μｌのアリコートの５M NaClを添加すると、図１Ｄおよび１Ｅに示されるような構造の変化となった。

図１Ｂは非コンプレックスＤＮＡ（１M NaClで１μg/ml）のＥＭである。図１ＣはNaClの最適状態に及ばない濃度（760mM）でのＤＮＡコンプレックスを示す。このＤＮＡは凝集した状態にある；単一分子トロイドのクラスターが見られる。図１ＤではＤＮＡコンプレ

ックスは問題のコンプレックスに対し最適濃度のNaClにある（968mM）。ＤＮＡはほど良く凝集されている；各トロイドのみが見られる。図１Ｅについては、図１ＤからのＤＮＡの４個のコンプレックスが選択されさらに高い倍率でプリントされた。図１Ｆでは、このコンプレックスの凝縮として最適より高い1.068M NaClの濃度でＤＮＡコンプレックスが見られる。ＤＮＡは弛緩した状態にある。核の凝縮が見える分枝単分子トロイドと棒状ＤＮＡファイバに注目。上記実験の凝集、凝縮、および弛緩状態に必要なNaClの濃度の差異はＤＮＡまたはポリカチオン特異的差異を示す。

第三の実験では、ＣＭＶ－β－ガラクトシダーゼおよびガラクトシル化ポリ－Ｌ－リシンのコンプレックスが基本的にウらのように生成された。簡単に述べると、プラスミドＤＮＡおよびガラクトシル化ポリ－Ｌ－リシンを３M NaClで合わせた。試料を１時間室温でインキュベーションして、次に3,500ダルトン分子量制限の膜を通して16時間0.15NaClで透析した。視覚検査では、透析液には沈澱物は存在しなかった。

図１Ｇは、得られたＤＮＡコンプレックスの電子顕微鏡写真であり、多分子凝集状態にある。ここではトロイドが１Ｃまたは１Ｄよりも大きいことが注目される（スケールは同じである）。図１Ｈは非コンプレックスＤＮＡおよび凝集した多分子ＤＮＡ／ポリ－Ｌ－リシンコンプレックスに対する240ないし300nmのＣＤスペクトルを示し、通常のＤＮＡのスペクトル最大の転化を269nmで強調するようにした。この転化は多分子凝集の特徴である。

他の実験では、150μlの200mM NaCl中、60ミクログラムのPEPCK-hFIXプラスミドＤＮＡ（ＴＥ緩衝液に溶解、ｐＨ８）を150μlの700mM NaCl中で中間速度でVIBRAX装置（IKA-VIBRAX-VXR）中で渦巻状に混合した。150μlの200mM NaCl中の19ミクログラムのα－ガラクトピラノシル－フェニルイソチオシアネート／ポリ－Ｌ－リシン二共役体を、渦巻状に混合しているＤＮＡ溶液に滴加した。ポリカチオンの添加は視覚による検査で沈澱物を生成させた。

図１Ｉは沈澱したＤＮＡコンプレックスにより与えられるＣＤスペクトルである。本質的に240ないし300nmで平らである。図１Ｊは沈澱したＤＮＡの電子顕微鏡写真である。

図２－遺伝子導入系の機能関連および特異性。（Ａ）ＤＮＡコンプレックスで処理した動物の血液のヒト因子IXの相対濃度はヒト因子IXの凝血促進活性を測定して評価した。１ステージの変更例には、因子IX－不完全ヒト血漿を用いてカオリン活性化部分的トロンボプラスチン時間を使用した。血液試料は静脈穿刺によって実験動物から得た。50分の1容量の500mMクエン酸ナトリウム、ｐH5.0を凝集を避けるために添加し、血漿を－20℃で貯蔵した。試料を二重にアッセイして、それらの活性を24人の正常成人男子からのプールした血漿の機能活性と比較した。全計算で、１mlの正常ヒト血漿の１単位の因子IX活性は、100％機能活性またはml当たり約３μgの因子IXと等しい。ラット血漿のもとからのヒト因子IX活性は、グラフで表す前に控除した。（Ｂ）トランスフェクションした動物に１週間炭水化物を含まない高蛋白質食餌を与えた。血液試料を治療の開始時および食餌の１週間後に取りウェスタンブロットハイブリッド形成によって分析した。８日および12日の動物を標準食餌を与えたトランスフェクションしたラットと比較した。データは、ウェスタンブロット写真フィルムの濃度分析によって得られ、食餌治療後にヒト因子IX蛋白質が数倍増加していた。

図３－インヴィヴォのマクロファージにＤＮＡを標的にする際のマンノシル化ＤＮＡコンプレックスの組織特異性。マンノシル化ポリ－Ｌ－リシンをSV40／ルシフェラーゼＤＮＡに結合させた。300μgのＤＮＡコンプレックスをラットの尾部大静脈に入れた。注入４日後に組織抽出物を作り、ルシフェラーゼ活性をアッセイした。ルシフェラーゼ活性は、脾臓、肝臓および肺嚢からの蛋白質抽出物ミリグラム当たりの集積光単位としてプロットした。他の組織では活性は見られなかった。データーは平均値の±標準誤差（ＳＥＭ）として表した。明るい棒線は非トランスフクションコントロール（ｎ＝４）であり、黒い棒線はマンノシル化ポリ－Ｌ－リシン／ＤＮＡコンプレックス（ｎ＝５）でトランスフェクションした動物である。

図４－インヴィトロでマクロファージの一次培養にＤＮＡ標的とする際のマンノシル化Ｄ

ＮＡコンプレックスの特異性。腹膜マクロファージの一次培養物に、SV40／ルシフェラーゼＤＮＡに結合したマンノシル化ポリ－Ｌ－リシン（黒い棒線）またはガラクトシル化ポリ－Ｌ－リシン（明るい棒線）でトランスフェクションした。指示した時間（２，４，８および24時間）に、細胞を洗浄した。トランスフェクション24時間後に、細胞を取りルシフェラーゼ活性をアッセイした。ルシフェラーゼ活性を、非トランスフェクションコントロールに見られる活性によって標準化した後、相対ルシフェラーゼ活性としてプロットした。データーは平均値の±標準誤差（ＳＥＭ）として表した。

図５－マクロファージのマンノース受容体に結合するためのマンノシル化ウシ血清アルブミンおよびマンノシル化ＤＮＡコンプレックスとの間の拮抗。腹膜マクロファージの一次培養物に、SV40／ルシフェラーゼＤＮＡに結合したマンノシル化ポリ－Ｌ－リシンでトランスフェクションした（Ｔ）。ＤＮＡコンプレックスを添加する前に、100倍過剰のマンノシル化ウシ血清アルブミンを一組のプレートに添加した（Ｔｃ）。非トランスフェクションコントロール（ＮＴ）もまたトランスフェクション24時間後にルシフェラーゼ活性をアッセイした。ルシフェラーゼ活性は、非トランスフェクションコントロールに見られる活性に関して標準化した後、相対ルシフェラーゼ活性としてプロットした。データーは平均値の±標準誤差（ＳＥＭ）として表した。

図６－ＤＮＡコンプレックスに結合した抗ラットPlg-R Fab-ポリ－Ｌ－リシンを使用するインヴィヴォ遺伝子転移。Fab-ポリ－Ｌ－リシンを、SV40／ルシフェラーゼＤＮＡに結合させ、ラットの尾部大静脈に入れた（トランスフェクションした）（ｎ＝３）。非トランスフェクションコントロール（コントロール）（ｎ＝３）、無関係なIgFから得られたFab断片を含むFab-ポリ－Ｌ－リシン－ＤＮＡを注入した動物（IFab）（ｎ＝３）、およびSV40／ルシフェラーゼ遺伝子を含まないＤＮＡコンプレックスを注射した動物（ＩＤＮＡ）（ｎ＝３）を、コントロールとした。注射２日後組織抽出物を調製し、ルシフェラーゼ活性をアッセイした。ルシフェラーゼ活性は蛋白質抽出物ミリグラム当たりの集積光単位としてプロットした。データーは平均値の±標準誤差（ＳＥＭ）として表した。

図７－ＤＮＡコンプレックスに結合した抗ラットplg-R Fab-ポリ－Ｌ－リシンを使用して注入した動物の脾臓および肝臓における発現の時間経過。Fab-ポリ－Ｌ－リシンを、SV40／ルシフェラーゼＤＮＡに結合し、ラットの尾部大静脈に入れた（ｎ＝９）。注入２日（ｎ＝３）、４日（ｎ＝３）および６日（ｎ＝３）後にラットを殺した。脾臓および肝臓抽出物を調製し、ルシフェラーゼ活性をアッセイした。ルシフェラーゼ活性を、対数目盛を使用して蛋白質抽出物ミリグラム当たりの集積光単位としてプロットした。データーは平均値の±標準誤差（ＳＥＭ）として表した。

図８－HepG2細胞のASGP受容体に結合するためのアシアロオロソムコイドおよびガラクトシル化ＤＮＡコンプレックスとの間の拮抗。HepG2ヘプトーマ細胞に、PEPCK-hFIX ＤＮＡに結合したガラクトシル化ポリ－Ｌ－リシンをトランスフェクションした。ＤＮＡコンプレックスを添加する前に、100倍過剰のアシアロオロソムコイドを一組のプレートに添加した（＋Comp.）。ＤＮＡインターナリゼーションを、ＤＮＡコンプレックスを含む培養基のスロット－ブロットハイブリッド形成によってモニターした。データーは、トランスフェクション後の異なる時間での受容体によりインターナリゼーションしたＤＮＡのパーセンテージで表した。

図９－裸のＤＮＡ対凝縮ＤＮＡを筋肉および肝臓に直接注入。SV40－ルシフェラーゼを符号化する裸のＤＮＡ 100ミクログラムを、２匹のラットの肝臓および腹部筋肉に注入した。ポリ－Ｌ－リシンに結合し実施例１に記載したように凝縮したpSV40-ルシフェラーゼプラスミドを同量、他の２匹の動物の肝臓および腹部筋肉に同様に注入した。注入48時間後ラットを殺した。一変の肝臓および腹部筋肉を溶菌緩衝液に均質化し、細胞溶菌液をルシフェラーゼ活性について分析した。全ルシフェラーゼ測定は、３回行い、平均値として表し、全蛋白質に対して標定した。図９は異なる二組の動物の蛋白質mg当たりの積算したルシフェラーゼ単位を示す。

図１０－裸のＤＮＡ対凝縮したＤＮＡを脳視蓋へ直接注入。裸およびポリ－Ｌ－リシン凝縮プラスミドＤＮＡの視蓋内注入は20日を超えるニューロンの細胞体で高水準の発現を得

ることができる。ラットからの網膜のβ－ガラクトシダーゼ活性物をラットの脳の視蓋領域に注入し、裸のpCMV-lacZ、または凝縮pCMV-lacZ（pCMV-lacZ+lys）を示された濃度で投与した。ＤＮＡがポリ－Ｌ－リシンで凝縮しないとき、発現の水準は次の注入10日後にバックグラウンドに戻る。

図１１－凝縮工程中のＤＮＡコンプレックスの吸収の変化。実施例１に詳細に記載した方法を使用して、キメラのCMV-hLDL受容体遺伝子を含むプラスミドをポリ－Ｌ－リシンで凝縮した。ポリ－Ｌ－リシンを添加した後、260nmでの溶液の吸光度を測定した。濃縮したNaClを次に徐々に添加し吸光度を測定した。コンプレックスに含まれるＤＮＡに期待される吸光度を点線で示した。凝縮反応に使用される初期NaCl濃度は500mMであった。

図１２－成人ラットのＤＮＡコンプレックスとその機能との間の関係。図１Ｂ－１Ｇに示される種々の状態の凝縮／凝集に相当するＤＮＡ－ガラクトシル化ポリ－Ｌ－リシンコンプレックスを調製した。SV40プロモーターから成るＤＮＡはP.pyralisルシフェラーゼ遺伝子について構造遺伝子に結合した。ラットの尾部大静脈に300μgの種々のＤＮＡコンプレックスを注入し、注入48時間後に肝臓お脾臓からの抽出物におけるルシフェラーゼの活性を測定した。各棒線は３匹のラットの平均±ＳＥＭを示す；コントロールラットはＤＮＡコンプレックスを注入しなかった。

図１３－弛緩した（コンプレックスしていない）形と凝縮した形における３mgのPEPCK-hLDLrの導入。ＤＮＡコンプレックスを動物に導入するため、ラビットの末端耳静脈に３～10mlのＤＮＡコンプレックス溶液（～400-900mM NaCl）を１回注入した。約1.5mlの血液を４p.m.に耳動脈から、指示された日数で引きだした。血清コレステロールの濃度の測定はクレベランド大学病院の臨床実験室で300μlの血清から行った。ラビット#676に弛緩状態で３mgのpPEPCK-hLDLRを含むＤＮＡコンプレックス溶液を投与したが、全血清コンステロール水準の有意な減少は見られなかった（初めの矢印）。３mgの同じＤＮＡを含む適当に凝縮したＤＮＡコンプレックスの第２の投与では、血液中のコレステロールの水準が20％減少した（第２の矢印）。この第２の投与の４週間後に、コレステロールは前処理の水準にほぼ戻り、約35日でピークに達した。

図１４－９mgのキメラPEPCK-hLDLr遺伝子を含むポリ－Ｌ－リシン／ＤＮＡコンプレックスの注入。２番目の実験では、ガラクトシル化ポリ－Ｌ－リシンで適当に凝縮した９mgのPEPCK-hLDLr遺伝子をラビット#737に投与した。図１４に示されるように、この処理は全血清コレステロールが38％減少し約５週間持続した。従って、ＤＮＡコンプレックスの投与が３倍に増加すると全血清コレステロール水準が２倍減少した。

図１５－３mgのキメラCMV-hLDLr遺伝子を含むポリ－Ｌ－リシン／ＤＮＡコンプレックスの注入。３mgのキメラCMV-hLDLr受容体遺伝子を含むＤＮＡコンプレックス溶液をラビット#16に投与すると、全血清コレステロール水準の最大減少が30％になった（図１５）。注入11日後、コレステロール水準は処理前に観察されたものよりもさらに20％低い。

図１６－３mgのキメラCMV-hLDLr遺伝子を含むポリ－Ｌ－リシン／ＤＮＡコンプレックスの数回の注入。ラビット#775（図１６Ａ）および#774（図１６Ｂ）に３mgのpCMV-hLDLRコンプレックスを注入した。ラビット#775では３週間処理後に血液中のコレステロール濃度が最大24％減少した。２回の追加の注入で血清コレステロールは有意にさらに減少することにはならなかった。ラビット#774では、初期の注入後に血液中のコレステロール水準が、36％減少することが観察された（図１６Ｂ）。同量のＤＮＡコンプレックスを用いて２週間毎に１回、４回再注入した。そのうち２回は最少の結果となり、他の２回は全血清コレステロール水準がゼロの減少となった。しかし、３mgのpCMV-hLDLRを含むＤＮＡコンプレックス溶液を５回投与した後、コレステロール濃度は前処理水準に関して約48％落ちた。

次にラビット#774を10週間一日につき10mgのロバスタチン（ストライプの棒線）で処理した。さらに20％のコレステロール水準の減少が観察された。コレステロール合成のための内生的経路の阻害によりラビット#774コレステロール濃度が最初の遺伝子転移前のそれの40％になった（図１６Ｂ）。

図１７－３mgのキメラSV40－ルシフェラーゼ遺伝子を含むポリ－Ｌ－リシン／ＤＮＡコン

プレックスの模擬注入（無関係なＤＮＡ）。高いNaCl濃度（～900mM）のガラクトシル化ポリ－Ｌ－リシン／ＤＮＡコンプレックス溶液をラビットに注入して、全血清コレステロール水準をできるだけ非特異的に減少させるようコントロールするため、ルシフェラーゼ遺伝子のような無関係のＤＮＡを含むＤＮＡコンプレックス溶液をラビット#775に投与した。図１７は注入により血清コレステロール濃度が有意でなく（≦12％）一時的な（≦５日）の減少となることを示している。従って、ヒトＬＤＬ受容体遺伝子を符号化する適当に凝縮したＤＮＡ粒子を注入した後の全血清コレステロール水準の減少は、高いNaCl溶液濃度またはガラクトシル化ポリ－Ｌ－リシン／ＤＮＡ粒子の存在のいずれの結果でもないことが確認された。

図１８－NaCl濃度に対する濁度との関係。図はＤＮＡ／ポリリシン溶液の濁度について初期と現在のNaCl濃度の効果を示す。各線は異なる初期濃度を示す。

図１９－NaClの凝縮濃度についてポリ－Ｌ－リシンの長さの効果。

図２０－異なるコンプレックスのＣＤスペクトル。ＣＤスペクトルは0.1cm路長のキュベットで行った。ＤＮＡは同モル比のアミノ基とリン酸塩基でポリ－Ｌ－リシンと複合し、種々のＣＤスペクトルを比較した：（Ａ）１MのNaClにおけるＤＮＡの標準コントロール；（Ｂ）多分子凝集が起きるNaCl濃度で観察されるΨ－ＤＮＡ；（Ｃ）凝集したＤＮＡは濁りおよび減少した楕円率を示す；（Ｄ）凝縮した単一分子のＤＮＡコンプレックス；（Ｅ）弛緩したＤＮＡコンプレックススペクトル。スペクトルは等しい濃度のポリマーで取り、緩衝液の信号を各場合に減じた。アッセイの詳細は方法の項で示す。

好適例の詳細な説明

多細胞生物体

外来の核酸を導入するために望ましい任意の多細胞生物体は本発明の可能性のある主題である。多細胞生物体は植物または動物、好ましくは動物である。動物は好ましくは脊椎動物であり、さらに好ましくは高等脊椎動物、すなわち、哺乳動物または鳥であり、哺乳動物が特に好ましい。哺乳動物の中で、好ましいものはヒトおよび他の霊長類、マウス、ラット、ラビットおよびハムスターのような実験動物、犬および猫のようなペット動物、および馬、牛、山羊、豚および羊のような農場動物である。これらの動物は哺乳類の４目：霊長類、齧歯類、食肉類および偶蹄目類である。

標的細胞

標的細胞は、その神経系（例えば、脳、脊髄および末梢神経細胞）、循環系（例えば、心臓、管組織および赤血球および白血球）、消化系（例えば、胃および腸）、呼吸系（例えば、鼻および肺）、生殖系、内分泌系（肝臓、脾臓、甲状腺、上皮小体）皮膚、筋肉、または結合組織に属する（動物の場合）細胞を含む生物体の組織（器官を含む）に属する。あるいは、細胞は標的生物体の任意の器官または組織から引き出される癌細胞、または生物体に感染する寄生体または病原体の細胞、またはウイルスに感染した生物体の細胞である。

肝臓に効く遺伝子療法に有用な方法は肝臓に関係する遺伝子を導入するために有効な比較的健康な組織を侵さないアプローチが必要である。受容体介在遺伝子転移を使用する幾つかの技法が、うまく使用されてきた。しかし、部分的肝切除がない場合にも、肝臓で遺伝子導入の発現を長引かすことになる容易に再現できる方法、従ってヒト遺伝子治療に使用できるものが必要である。外来ＤＮＡはリガンド－ポリ－Ｌ－リシン二共役体によってアシアログリコプロテイン（ASGP）受容体を標的にすることによって成体動物の肝細胞に導入した。有効になるためのリガンド標的技法に対しては、ＤＮＡは血液中にそのまま残るようにする形でなければならず、肝細胞の表面にASGP受容体によって認識されるように十分小さくなければならない。ワグナーら（1991）は、ＤＮＡとポリ－Ｌ－リシン／トランスフェリン結合体を直径が80-100nmのコンプレックスに凝縮して、肝腫瘍細胞のトランスフェリン受容体に遺伝子を標的にさせた。この大きさのＤＮＡ結合体は肝腫瘍細胞のトランスフェリン受容体によって認識するため適当であるが、肝細胞のASGP受容体は直径が10-20nmよりも大きいリガンドに対して区別する。

われわれは受容体介在摂取によって成体動物の肝臓に遺伝子を導入するための方法を開発

し、遺伝子を140日間発現させることになった（実験の継続時間）。この方法はヒト遺伝子治療に応用するために可能性がある。この方法の主な利点は（ｉ）ＤＮＡコンプレックスの調製が容易であること；（ii）特定の組織に遺伝子を標的にする能力；（iii）肝臓での遺伝子の発現を長引かせること；（iv）感染性ウイルスＤＮＡが全くないのでコンプレックスが比較的安全であること；および（v）導入した遺伝子のエピソーム保存である。

標的

Ａ．一般

「標的にする」は、臨床目的を達成するために有効な量で標的細胞に入るように緻密にした核酸を投与することである。これについて、ＤＮＡおよびＲＮＡは標的細胞の核に複製することができ、その結果細胞内の核酸の最大水準が摂取後に増加することに注目する必要がある。さらに、臨床効果が核酸によって発現される蛋白質により媒介されるならば、核酸は鋳型として働き、従って、細胞内の核酸のコピーの数が小さくとも、高水準の蛋白質発現を達成することができる。それでもなお、ＤＮＡを拾い上げる標的細胞の数および各細胞によって拾い上げられるＤＮＡ分子の数を増やすように高濃度のＤＮＡを緻密化することが望ましい。

投与の経路および部位は標的を高めるように選択することができる。例えば、筋肉細胞を標的にするため、関連する筋肉への筋肉内注入を必然的に選択する。肺細胞は緻密にしたＤＮＡをエーロゾルの形で投与することによって標的にすることができる。管内皮細胞は緻密にしたＤＮＡでバルーンカテーテルをコーティングし機械的にＤＮＡを導入することによって標的にすることができる。

ある場合には、核酸を緻密な状態で維持する核酸結合部分はまた、標的剤として働くことができる。正に荷電したアミノ酸のポリマーは多くの核蛋白質中で核局部化信号（ＮＬＳ）として作用することが知られている。ポリ－Ｌ－リシンで凝縮したpSV40-ルシフェラーゼＤＮＡは、そのままラットの腹部筋肉に注入された。はっきりした標的細胞結合部分がないにもかかわらず、複合ＤＮＡを注射したラットでは、裸のＤＮＡを注射したラットよりも、20倍高いルシフェラーゼ活性を観察した。それでもなお、幾つかの好適例では、標的細胞結合部分を使用すると標的が改善される。

Ｂ．標的細胞結合部分の使用

ＴＢＭを使用する場合、関連する標的細胞の接近できる構造（「受容体」）に特異的に結合しなければならない。これらの細胞に対して完全に特異的であることは必要ないが、治療に有効な共役体に十分に特異的でなければならない。好ましくは、その他の細胞との交差反応性が10％よりも小さく、さらに好ましくは５％よりも小さい。

標的細胞の接近できる構造に対してＴＢＭが有しなければならない絶対的な最少親和力はないが、親和力が高い程良い。好ましくは、親和力は少なくとも10^3リットル／モルであり、さらに好ましくは、少なくとも10^6リットル／モルである。

ＴＢＭは、標的細胞の表面でエピトープに特異的に結合する抗体（またはFab,Fab,V_M,V_LまたはＣＤＲのような抗体の特異的結合断片）である。細胞、細胞膜、または単離した細胞表面抗原に対して抗体を増やす方法は、この技術分野で知られている：

ａ．免疫脾臓細胞の生成：可溶性抗原を用いる免疫化、Hurrell,J.G.R.（1982）Monoclonal Antibodies:Techniques and Applications.CRC Press,Boca Raton,Florida.

ｂ．コンプレックス抗原を用いる免疫化：膜、全細胞および微生物。Hurrell,J.G.R.（1982）Monoclonal Antibodies:Techniques and Applications.CRC Press,Boca Raton,Florida.

ｃ．モノクローナル上澄み液および腹水液の生成。Andrew,S.M.and Titus,J.A.（1991）。Purification of Immunoglobulin G.in Current Protocol in Immunology（J.E.Coligan,A.M.Kruisbeek,D.H.J.Margulies,E.M.Shevach and W.Strober,ed.）pp.A.3.9.-A.3.12。Grrene Publishing wiley-Interscience,New York.

ｄ．ラビット中のポリクローナル抗血清の生成。Garvey J.S.,Cremer,N.E and Sussdorf,D.H（eds）（1977）Methods in Immunology;A Laboratory Text for Instruction and Re

search,Third Edition.W.A.Benjamin,North Hampton,Mass.
ｅ．キャリヤ蛋白質への合成ペプチドの化学結合による抗ペプチド抗体の生成。Jemmerson,R.,Morrow,P.I.,Klinman,N.I and Patterson,Y.（1985）.合成ペプチドを使用して哺乳類のシトクロムＣの進化保持部位の分析. Proc.Natl Acad.Sci.,U.S.A.82,1508-1512.
ＴＢＭはレクチンであり、そのために、細胞表面に同起源の炭水化物構造がある。
標的結合部分は標的細胞によって運ばれる受容体によって特異的に結合したリガンドである。
関連するリガンドの１のクラスは炭水化物、特に、モノおよびオリゴ糖類である。適当なリガンドは、ガラクトース、ラクトースおよびマンノースを含む。
関連するリガンドの他のクラスはペプチド類（ここで蛋白質を含む）、例えばインシュリン、表皮生長因子、腫瘍壊死因子、プロラクチン、絨毛膜ゴナドトロピン、ＦＳＨ、ＬＨ、グルカゴン、ラクトフェリン、トランスフェリン、アポリポプロテインＥ、gp120およびアルブミンである。
次表は種々のクラスの標的細胞のための好ましい標的結合部分をまとめるものである：

標的細胞	標的結合部分
肝臓細胞	ガラクトース
クッパー細胞	マンノース
マクロファージ	マンノース
肺	Fab断片　対　ポリメリックグロブリン受容体（Pig R）
脂肪組織	インシュリン
リンパ球	Fab断片　対　CD4またはgp120
腸細胞	ビタミンB12
筋肉	インシュリン
繊維芽細胞	マンノース－６－ホスフェート
神経細胞	アポリポプロテインＥ

標的結合部分はＮＡＢＭ／ＮＡ凝縮コンプレックスを直接注入する場合には厳密に言えば必要がない。この場合の標的細胞はコンプレックスを標的細胞の近所に注入してＮＡＢＭ／ＮＡ凝縮コンプレックスに受動的に接近することができる。
Ｃ．リポソーム媒介遺伝子転移
種々の脂質および溶媒条件を使用してＤＮＡをリポソーム（脂質二重層によって含まれるボディ）に封じ、リポソームを動物組織に注入して遺伝子発現を検出する可能性は、広範囲に示された（１－７）。しかし、種々の生物系に対してこの技法が可能性があるにもかかわらず、これらの実験に使用されたＤＮＡは細胞中の生存、核への取り込み、または標的細胞の核中の転写の割合を改善するように改変または緻密化されなかった。従って、これらの方法は通常、リポソームによって運ばれる遺伝子の一時的な発現だけになっていた（４，５）。
カチオン脂質はＤＮＡを転移するためにうまく使用されてきた。このような脂質のカチオン成分はＤＮＡを溶液中で緻密にすることができる（１～３，７）。この方法は多量に凝縮したＤＮＡコンプレックスとなることを示し（１，２）、ＤＮＡをインヴィトロでトランスフェクションするとき、遺伝子転移および発現の有効性を増加することになる（裸のＤＮＡに対して）。これらのコンプレックスの生成は、インヴィトロで遺伝子転移を促進できるが、このようなコンプレックスをインヴィヴォで注入すると、長く継続した有効な遺伝子転移とならない。従って、われわれの凝縮方法は、ＤＮＡ／カチオン脂質コンプレックスに対して構造上の特徴を与え、インヴィヴォ発現を長続きさせることができる。このような方法の組合せは２方法のいずれかによって達成することができると信じる：
１．後に中性脂質を用いてリポソーム体に封じる凝縮ＤＮＡコンプレックスの生成、または
２．この明細書に記載した方法を用いて、カチオン脂質を用いて凝縮する際に高凝縮単一分子ＤＮＡコンプレックスの生成が達成できる。これらのコンプレックスはインヴィヴォで動物の組織に遺伝子転移を高効率に行う必要がある。ＤＮＡ凝縮のためのわれわれの方

法は、得られた緻密なＤＮＡをリポソーム体に封じるように結合させるならば、動物へのトランスフェクションのために種々の利点を提供することができる：
１．リポソームは組織中の哺乳類細胞の細胞質膜の脂質二重層との受動融合を促進する。
２．次に凝縮したＤＮＡは細胞区画を通って高効率で遺伝子情報を、その発現のための核に転移することができる。
３．凝縮したＤＮＡは細胞内の分解に対して保護され、従って新しく導入された遺伝子の発現の持続性を高めることができる。
４．ポリカチオン凝縮ＤＮＡへの可能な免疫学的応答を、免疫学的に不活性の脂質二重層に封じることによって避けることができる。

参考文献

１　Ghirlando,R.,Wachtel,E.J,Arad,T.,and Minsky,A.（1992）ミセル凝集物によって促されたＤＮＡパッケージ化：新規のインヴイトロＤＮＡ凝縮系。Biochemistry,31,7110-7119.
２　Braulin,W.H.,Strick,T.J.,and Record,M.T.,Jr.（1982）Biopolymers 21,1301-1309.
３　Zhu,N.,Liggitt,D.,Liu,Y.,Debs,R.（1933）成体マウスへの静脈内ＤＮＡデリバリ後の規則正しい遺伝子発現。Science,261,209-211.
４　Alino,S.F.,Bobadilla,M.,Garcia-Sanz,M.,Lejarreta,M.,Unda,F.,and Hilario,E.（1993）ヒトα1-抗トリプシン遺伝子のリボソームによるマウス肝細胞へのインヴィヴォデリバリ。Biochem.Biophys.Research Communications 192,174-181.
５　Takeshits,S.,Losordo,D.W.,Kearney,M.,Rossow,S.T.,and Isner,J.M.（1994）ラビット動脈器官培養モデル中にリボソーム媒介遺伝子転移した後の組み換え蛋白質分泌の時間経過。Lab.Invest.71,387-391.
６　Jarnagin,W.R.,Debs,R.J.,Wang,S.S.,and Bissell,D.M.（1992）Nucleic Acids Res.20,4205-4211.
７　Philip,R.,Liggitt,D.,Phillip,M.,Dazin,P.,Debs,R.（1993）インヴィヴォ遺伝子デリバリ。成体マウス中のＴリンパ球の有効なトランスフェクション。J.Biol.Chem.268,16087-16090。

核酸結合部分

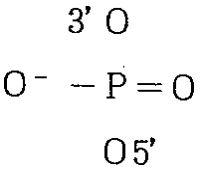
核酸に可逆的に結合する物質はどれも核酸結合部分（NABM）とうして働くことができるが、その条件は、（１）共役体が標的細胞に達して入るまで保持するように核酸に十分に強く特異的に結合し、その結合によって、核酸にダメージを与えたり変化させることがないこと、および（２）核酸と溶媒の間の相互作用を減らし、これによって凝縮を生じさせることである。最後の基準は共役体の治療有効性である。
好ましくは、NABMはポリカチオンである。その正に荷電した基がイオンにより負に荷電したＤＮＡに結合し、その結果、電荷中和によりＤＮＡ－溶媒の相互作用を減らす好ましいポリカチオンはポリリシンである。。他の可能性のある核酸結合部分は、Arg-Lys混合ポリマー、ポリアルギニン、ポリオルニチン、ヒストン、アビジン、およびプロタミンを含む。

核酸

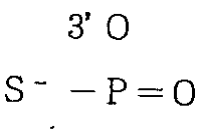
本発明に従う組み換えＤＮＡおよびＲＮＡ分子を構築するための基本的方法はサムブルック・ジェイらによって：Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Second Edition,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY（1989）に開示されており、ここに参考文献として組み込まれる。
核酸はＤＮＡ、ＲＮＡ、またはＤＮＡまたはＲＮＡ誘導体、例えば下記のようなインヴィヴォで分解に耐えられる誘導体である。この明細書では、その前後関係によってはっきり言っていない場合は、ＤＮＡに関する文献は、必要な変更を加えて、同様に他の核酸にも適用する。核酸は一本鎖または二本鎖である。好ましくは10ないし1,000,000塩基（または塩基対）、さらに好ましくは100ないし100,000であり、その塩基は同じかまたは異なる。塩基は「正常の」塩基アデニン（Ａ）、グアニン（Ｇ）、チミジン（Ｔ）、シトシン（

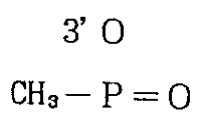
Ｃ）およびウラシル（Ｕ）、または37 CFR Ｌ § 1.822（p）にまとめられたもののような異常塩基である（１）。核酸は任意の望ましい方法で調製することができる。
好適例では、核酸は標的細胞において機能的である発現遺伝子を含む。例えば遺伝子は凝縮因子、（例えば因子IX）、特異的代謝障害に含まれる酵素、（例えば尿素循環酵素、特にオルニチントランスカルバミラーゼ、アルギニノスクシネートシンターゼ、およびカルバミルホスフェートシンターゼ）；受容体、（例えばＬＤＬ受容体）；トキシン；特異的細胞または組織を除去するチミジンキナーゼ；イオンチャンネル（例えば嚢胞性繊維症のクロリドチャンネル）；膜輸送体（例えばグルコース輸送体）；および細胞骨格蛋白質、（例えばジストロフィン）を符号化することができる。遺伝子は合成、ｃＤＮＡまたはゲノムオリジン、またはこれらの組合せである。遺伝子は天然に生じるもの、天然に生じるポリペプチドをそれでもなお符号化する非天然に生じる遺伝子、またはこの種のポリペプチドを認識できる変異体を符号化する遺伝子である。また宿主細胞に見出されるＤＮＡまたは正常に転写されるｍＲＮＡに「アンチセンス」であるｍＲＮＡを符号化することができるが、アンチセンスＲＮＡはそれ自体で機能蛋白質に翻訳することができない。
発現される遺伝子に対して、解読配列は標的細胞中で機能しうるプロモーター配列に操作しやすく結合されなければならない。２つのＤＮＡ配列（例えばプロモーター領域配列および解読配列）は、２つのＤＮＡ配列の間の結合の性質が（１）望ましい遺伝子配列の転写に向くように領域配列中にフレームシフト突然変異を導入することにならない、または（３）プロモーター領域配列によって転写される遺伝子配列の能力を妨げないならば、操作しやすく結合されると言える。プロモーター領域は、プロモーターがＤＮＡ配列の効果的な転写を与えることができるならば、ＤＮＡ配列に操作しやすく結合される。「操作しやすく結合」されるためには、２つの配列が互いに直ぐに近接する必要はない。ＤＮＡのような核酸分子は、転写調節情報を含むヌクレオチド配列を含み、このような配列がＲＮＡを符号化するヌクレオチド配列に「操作しやすく結合」されている場合に、ｍＲＮＡを「発現できる」と言える。遺伝子発現に必要な調節領域の正確な性質は、生物体から生物体へと変わるが、一般にＲＮＡ転写の開始を指示するプロモーターを含むことができる。このような領域はＴＡＴＡボックスのような転写の開始を伴う５’－非解読配列を含むことができる。
望ましくは、望ましいＲＮＡ生成物について解読する遺伝子配列に対して非解読領域３’を得ることができる。この領域は、終結およびポリアデニル化のために提供するもののような、その転写終結調節配列のために保持される。従って、解読配列に自然に隣接する３’－領域を保持することによって、転写終結信号が与えられる。転写終結信号が発現宿主細胞中で十分に機能しない場合には、宿主細胞に機能する３’領域を置換することができる。
プロモーターは、宿主生物体の本来全部の細胞に活性な「偏在性」プロモーターであり、例えば哺乳類については、ベーターアクチンプロモーターであり、またはその発現が標的細胞に多少とも特異的であるプロモーターであってもよい。一般的に言うと、後者が好ましい。標的細胞中で自然に発現される遺伝子本来のプロモーターはこの目的のために使用され、例えば哺乳類の肝臓細胞中で発現するためのPEPCK（ホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼ）プロモーターがある。他の適当なプロモーターには、アルブミン、メタロチオネイン、界面活性剤、アポＥ、ピルベートキナーゼ、ＬＤＬ受容体HMG CoAリダクターゼを含みまたは標的組織中の遺伝子の転写をコントロールするために必要な因子（ホルモン、食餌、重金属等）によって発現および調節に特異的な組織の適当なパターンを持つように単離され、クローニングされ示された任意のプロモーターを含む。さらに広範囲のウイルスプロモーターを使用することができ；これらにはMMTV、SV-40およびCMVを含む。「発現ベクター」は、ベクターにクローニングされてこれによりＲＮＡまたは蛋白質生成物を生成するＤＮＡ（またはｃＤＮＡ）分子を発現することができるベクターである（適当な転写および／または翻訳コントロール配列の存在による）。クローン配列の発現は、発現ベクターが適当な宿主細胞に導入されるときに生じる。原核発現ベクターを使用するならば、そのときには適当な宿主細胞はクローン配列を発現することができる任意の

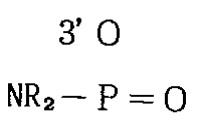
原核細胞である。同様に、真核発現ベクターを使用するならば、そのときには適当な宿主細胞はクローン配列を発現することができる任意の真核細胞である。
発現できる遺伝子に加えてまたはその代わりに、核酸は標的細胞の遺伝物質に相同な配列からなり、それによってそれ自身を相同組み換えによってゲノムに挿入（「組み込む」）ことができ、これにより遺伝子の解読またはコントロール配列を置換し、または遺伝子を全体で除去することができる。
別の好適例では、核酸分子は標的生物体（ウイルスおよび他の病原体を含む）のゲノムまたは他のＤＮＡ配列に、または生物体の細胞中に転写されるメッセンジャーＲＮＡに「アンチセンス」であり、標的ゲノムＤＮＡの転写または標的メッセンジャーＲＮＡの転写を阻害するように十分にハイブリッド形成する。このようなハイブリッド形成の有効性はハイブリッド形成する配列の長さおよび構造の機能である。配列が長く相補性が完全に近いほど、相互作用は強くなる。塩基対のミスマッチの数が増加するとハイブリッド形成の有効性は落ちる。さらに、パッケージング配列ＤＮＡまたはアンチセンスＲＮＡのＧＣ含量も、また、ＡＴ（またはＡＵ）塩基対と比較してＧＣ塩基対中に存在する追加の水素結合によるハイブリッド形成の有効性に影響を与える。従って、ＧＣ含量の多い標的ハイブリッド形成が標的として好ましい。
意図する目的のためにアンチセンス核酸を活性を小さくまたは不活性にするので、分子内ハイブリッド形成による二次構造を形成するアンチセンス配列を避けることが望ましい。当業者は配列が二次構造を形成する傾向があるか否かを容易に認識するだろう。二次構造は異なる標的配列を選択すことによって避けることができる。
長さが約15と約100の間の塩基対で標的配列に相補性があるオリゴヌクレオチドは、天然のモノヌクレオシドからまたは、あるいは、非架橋ホスホラス結合酸素にて置換基を有するモノヌクレオシドから合成することができる。好ましい類似体は天然産のモノヌクレオシドのメチルホスフェート類似体である。さらに好ましくは、モノヌクレオシド類似体は、これを使用すると（ａ）細胞膜を通して拡散する改良された能力および／または（ｂ）対象の体内にヌクレアーゼ消化に耐えられる利点を有するオリゴヌクレオチドになるいずれかの類似体である（Miller,P.S.ら、Biochemistry 20:1874-1880（1981））。このようなヌクレオシド類似体は当該分野では良く知られている。核酸分子はＤＮＡまたはＲＮＡの類似体であってもよい。治療目的を満たし、ヌクレアーゼに十分に耐えられ、十分なバイオアベイラビリティーと細胞取り込みを有するならば、本発明は特にＤＮＡまたはＲＮＡ類似体の使用に制限がない。ＤＮＡまたはＲＮＡは酵素、例えばヌクレアーゼによって、ヌクレオシド内結合（例えばメチルホスホネート類またはホスホロチオエート類）を修飾して、または修飾したヌクレオシド（例えば、２’－メチルリボースまたは１’－アルファ－アノマー）を組み込むことによってインヴィヴォ分解に耐えられるようにすることができる。
自然に生じる結合は



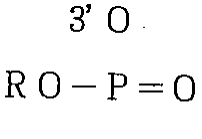
代わりの結合は次のものを含む：



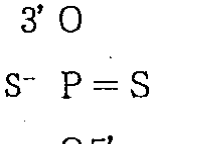




（式中のR_2は水素および／またはアルキルである）



（式中のＲは水素またはアルキルである）



また3’Ｏ－Ｐ－Ｏ5’を、3’Ｏ－CH_2Ｃ（0）－Ｏ5’、3’Ｏ－Ｃ（0）－ＮＨ5’および3’Ｃ－CH_2CH_2Ｓ－Ｃ5’のような他の結合と置換することができる。

全体の核酸分子はこのような修飾結合を形成することができ、または5’および3’のような一定の部分のみが、このように影響を受け、エキソヌクレアーゼに耐性になる。

従って本発明に使用するために適している核酸分子は、以下のものを含むがこれに制限されない、ジデオキシリボヌクレオシドメチルホスホネート、ミルらのBiochemistry,18:5134-43（1979）参照、オリゴデオキシヌクレオチドホスホネート、マツクラらのProc.Nat.Acad.Sci.,84:7706-10（1987）参照、挿入剤に共有結合したオリゴデオキシヌクレオチド、ゼリアルら、Nucleic Acids Res.,15:9909-19（1987）参照、ポリ（Ｌ－リシン）と結合したオリゴデオキシヌクレオチド、レオネッチらのGene,72:32-33（1988）参照、およびリボース誘導サブユニットから集合したカルバメート結合オリゴマー、スンマートンのJ.,Antisense Nucleic Acids Conference,37:44（New York 1989）参照。

核酸の緻密化

核酸のコンプレックスおよび核酸結合部分が受容体媒介エンドサイトーシス、受動インターナリゼーション、受容体媒介膜透過性化、または他の応用できる機構によって取り込みを達成するために十分小さい粒子径であることが望ましい。望ましくは、緻密になった核酸、標的結合部分、および核酸結合部分のコンプレックスは小さく、肺および脾臓のシヌソイドキャピラリー系がその大きさの凝集物を閉じ込めるので、例えば100nm以下であり、さらに好ましくは外被孔エンドサイトーシス小嚢の一般的内径である80または90nmである。

30nmよりも大きいコンプレックスは脾臓および肝臓のマクロファージによって非特異的に取り込まれ易いので、共役体も30nmよりも小さいことが好ましい。
肝臓のASGP受容体の場合には、15-23nmよりも大きいコンプレックスが取り込まれない。受容体に対するインヴィヴォでのこの大きさの制限は多分、肝臓のクッパー細胞中のガラクトシル化蛋白質のための他の受容体の存在に直接関連しているのだろう。クッパー細胞受容体はインヴィヴォでの大きい寸法のガラクトシル化分子を取り込み分解する際に有効であり、従って、肝細胞の表面にASGP受容体を用いてガラクトシル化ＤＮＡコンプレックスを取り込むために競争するだろう。最も好ましくは、肝臓デリバリのために、コンプレックスは直径が23nmよりも小さく、さらに好ましくは15nmよりも小さく、なおさらに好ましくは12nmよりも大きくない。
本発明は凝集または沈澱を生じないで、そして好ましくは凝縮状態まで緻密になる核酸および核酸結合キャリヤのコンプレックスに関する（図12参照）。本発明の目的のために、ＤＮＡを次の状態の一つとして特徴付けることが有用である：正常（凝縮していない）；凝縮した；弛緩した；単一凝集した（単一分子トロイドのクラスター）；多凝集した（多分子トロイドのクラスター）；および沈澱した。これらの状態は電子顕微鏡下での外観で定義される（表１０３参照）。
凝縮ＤＮＡは溶媒との相互作用が最少の状態にあり、従ってＤＮＡは、単離した球またはトロイドの形である。目に見える程度まで繊維質ではない。弛緩したＤＮＡは、一般にＤＮＡからのポリカチオンの乖離によって形成され、繊維質を形成する。凝集したＤＮＡは群がったまたは多分子のトロイドを形成する。
単一分子ＤＮＡコンプレックスの理論的な大きさは表１０６の凡例「ｂ」および「ｃ」で示される式によって計算することができる。好ましくは、この発明のコンプレックスは直径が、これらの式の１または両方によって計算される大きさの二倍よりも小さい。さらに大きいコンプレックスは多分子凝集ＤＮＡに相当するようだ。
ＤＮＡはその電荷を中和することによって、例えばポリカチオンを添加して、または溶媒との相互作用を減らすことによって、凝縮状態に緻密化される。しかし、ポリカチオンは、凝集または沈澱を避けるようにカオトロピック剤（向混沌性剤）を使用しなくともＤＮＡの凝集または沈澱の原因となる。従って、ポリカチオン（ＤＮＡを凝縮するため）および（必要ならば）向混沌性剤（凝集または沈澱を避けるため）の両方を賢明に使用して緻密化を行うことができる。
向混沌性剤の過剰使用は、しかしＤＮＡを弛緩することになる。好ましくは、コンプレックスは凝集してなく、直径が23nmよりも小さく凝縮した単一分子のトロイド構造を有する；緻密化の程度は、電子顕微鏡によって測定することができる。例えば、PEPCK-hFIX遺伝子とガラクトシル化ポリリシンのコンプレックスは単一分子トロイドまで緻密化され、表１０６に示すように、平均直径が約12nmである。
「単一分子トロイド」の語は、トロイドが唯一の核酸分子を含むことを意味する；トロイドは多くのキャリヤ分子を含むことができる（例えば、ガチクトシル化ポリ－Lys）。一般的比率は、「単一分子」トロイドに対して、ＤＮＡ１分子対約100キャリヤ分子である。あるいは、そして勿論さらに正確には、この構造はモノ核酸トロイドと称される。単一分子および多分子トロイド（後者は各１個以上のＤＮＡ分子を含む）は、電子顕微鏡で観察したとき、各コンプレックスの大きさが異なることで識別でき、トロイドの多－または単一分子（ＤＮＡ分子のみを数える）組成を含む。
またわれわれはポリ－Ｌ－リシン結合の際にＤＮＡの構造変化を同定するために他の技法を使用した。これらの第一は、400nmでの吸光を使用する溶液中の濁度の分光光度計測定である。濁度は先ず凝集のインジケーターである。凝集は300ないし340nmの波長での０よりも大きい円偏光二色性（ＣＤ）の値によって確認される。
図１８はポリ－Ｌ－リシンをＤＮＡ溶液に異なる出発濃度のNaClにて添加した濁度の効果を示す図である。塩の初期濃度が増加すると濁度は増加し（これは目視で容易に確認できる）、一層低いイオン強度でのＤＮＡコンプレックスの凝縮により、互いに相互に作用する単一分子ＤＮＡ－ポリ－Ｌ－リシンコンプレックスからなる粒子の懸濁液となることを

示す。われわれは、一層低い塩濃度で凝縮したＤＮＡの溶液は、懸濁液中に粒子物質が存在しているが、澄んでいることに注目した。異なる濁度をもつＤＮＡコンプレックスを含む溶液は、それぞれの状態で形成されたＤＮＡ構造を目視してＥＭによって分析した。適当に凝縮した単一分子のＤＮＡコンプレックスを澄んだ溶液および僅かに濁った溶液の両方に見出した。これは、懸濁液内の粒子を含む溶液が400nmで吸収しないので、400nmでの最少吸収（図１８）に注目した初期の低いイオン強度ではＤＮＡコンプレックスの凝縮については正しくない。しかし、これらの溶液をＥＭを使用して分析するとき、われわれは図１に示される予想したトランジション構造に注目した。懸濁液中の粒子が全体に分散されると、ＥＭによって測定された構造は、基本的に凝縮した単一分子のＤＮＡコンプレックスと同一であった。従って、ＤＮＡコンプレックスを含む溶液の濁度は、コンプレックスの凝縮に使用した塩の初期濃度に依存する。初期の低いそして高いイオン強度でのＤＮＡの濃度において観察された差異に対して応答できる機構は、明らかでないが、われわれは濁溶液の生成を避けて、ＤＮＡを適当に凝縮するように我々のプロトコルを適合させた。

溶液中のＤＮＡ－ポリ－Ｌ－リシンコンプレックスの構造トランジションを調査分析するためのさらに信頼できる技法は、NaClの濃度が増加するとき260nmで凝縮するコンプレックスの吸光度である。懸濁液中の単一凝集ＤＮＡコンプレックスは、粒子物質が260nmで吸光しないので期待された吸光度の10～30％のみを示した。NaClの添加は単一凝集ＤＮＡコンプレックスを懸濁液に分散させて、図１１に示される吸光度の急な増加を観察した。この時点で、溶液は澄み、懸濁液中には目視できる粒子構造は存在しない。ＤＮＡ－ポリ－Ｌ－リシン凝縮のこの特徴は明らかに図１に示した構造と関連する。260nmでの急な吸光度の増加の原因であるNaClの濃度で、われわれはＥＭによって凝集していない凝縮したコンプレックスを観察した；NaClのこの臨界濃度に達する以前に、ＤＮＡコンプレックスは凝集し、さらに高いNaCl濃度ではＤＮＡコンプレックスは弛緩した。260nmでの吸光度の第二のトランジションは、懸濁液中にある凝縮したＤＮＡコンプレックスが弛緩した結果、ＤＮＡコンプレックスが完全に可溶化したことを示している。

円偏光二色（ＣＤ）を使用して、ＤＮＡの凝縮をモニターすることができる。スペクトルがＤＮＡ単独のスペクトルと同一であるとき、ＤＮＡコンプレックスは正しく緻密になっている、すなわち、単一分子コンプレックスになっていると仮定される。言葉を変えると、220nmでの正のスペクトルはＤＮＡ単独の220nmスペクトルに量的に似ており、クロスオーバー（コンプレックスのスペクトルが０点で交差する波長）は本来ＤＮＡ単独の場合と同一である。ＤＮＡが多分子コンプレックスに凝集するとき、270nmでの正のスペクトルはその波長で負のスペクトルに逆転する（これはpsi－ＤＮＡ構造またはΨ－ＤＮＡと呼ばれる）。

表１０３は裸眼観察、円偏光二色分光計、電子顕微鏡、および260nmでの吸光度によって測定される各状態の特性を示す。特に、凝縮したＤＮＡコンプレックスを同定することができる任意の他の技法を、上記のものの代わりにまたは組み合わせて使用することができる。

核酸を緻密にするために、キャリヤを核酸溶液に添加し、これによってキャリヤは核酸を粉砕する：溶媒の相互作用はは核酸を凝縮させる。好ましくは、少なくとも溶液の濁度はキャリヤを添加するときモニターされ、状態変化が速やかに検出されるようにする。濁りが一旦現れると、ＤＮＡの状態はさらにＣＤ分光計によって分析され、ＤＮＡが凝縮しているか凝集状態にあるか測定することができる。（沈澱はまた裸眼によって検出する必要がある）。好ましくは、キャリヤは核酸溶液に、沈澱と凝集が最少になるように十分ゆっくりと添加される。沈澱または凝集が生じた場合には、カオトロピック塩をゆっくり添加し、その結果を再度ＣＤ分光計によって調べなければならない。好ましい塩はNaClである。他のカオトロピック塩を、投与される動物（または細胞）によって許容される限り使用することができる。適当な薬剤には硫酸ナトリウム（Na_2SO_4）、硫酸リチウム（Li_2SO_4）、硫酸アンモニウム（$(NH_4)_2SO_4$）、硫酸カリウム（K_2SO_4）、硫酸マグネシウム（$MgSO_4$）、リン酸カリウム（KH_2PO_4）、リン酸ナトリウム（NaH_2PO_4）、リン酸アンモニウム（

$NH_4H_2PO_4$）、リン酸マグネシウム（$MgHPO_4$）、塩化マグネシウム（$MgCl_2$）、塩化リチウム（LiCl）、塩化ナトリウム（NaCl）、塩化カリウム（KCl）、塩化セシウム（CeCl）、酢酸アンモニウム、酢酸カリウム、酢酸ナトリウム、フッ化ナトリウム（NaF）、フッ化カリウム（KF）、テトラメチルアンモニウムクロリド（TMA-Cl）、テトラブチルアンモニウムクロリド（TBA-Cl）、トリエチルアンモニウムクロリド（TEA-Cl）、およびメチルトリエチルアンモニウムクロリド（MTEA-Cl）を含む。

われわれは、インヴイトロでＤＮＡの凝縮に影響する変数、および受容体媒介エンドサイトーシスによって動物にＤＮＡコンプレックスを有効にデリバリするためのこれらのパラメーターの機能的関連性を調べた。われわれは凝縮したＤＮＡ－ポリ－Ｌ－リシンコンプレックスが溶液中に安定なままであるイオン強度とＤＮＡの濃度との間の強い相互関係に注目した。これらの実験は、溶液中の正と負の電荷が１対１となるＤＮＡとポリ－Ｌ－リシンの比を使用して、hFIXに対する構造遺伝子に結合したPEPCKに対する遺伝子からのプロモーターを含む4.5kbプラスミドを使用して行った。粒子を溶解するために必要なNaClの最終濃度の変化は、ＤＮＡ濃度の対数関数であり、高濃度のＤＮＡ－ポリ－Ｌ－リシンコンプレックスの凝縮がイオン強度の僅かな増加でのみ生じる。このＤＮＡ濃度の物理的特性は、動物の血液中のイオン負荷にあまり影響しないので、インヴィヴォでの成体動物の組織にＤＮＡ粒子をデリバリするために非常に有利である。

最少二乗法を使用するデーターの線形適合は、次の関数によって記述される：

LOG_{10}（NaCl，mM）=b0*（DNA，μM リン酸塩）+b1　r2=0.97

式中、b0=2.52x10E-3，b1=0.577

凝縮工程の間に異なるＤＮＡプラスミドおよび異なるＤＮＡ調製を使用するとき、上記式によって記載される関数で変化を観察した。これらの相違は多分、異なる出所および組成物のＤＮＡに対するポリ－Ｌ－リシンの親和性の変化に関連しているのだろう。最大の結合親和力について、われわれは一般に酢酸ナトリウムおよび2.5容量の－40 iCエタノール（方法参照）で２回沈澱させたＤＮＡを使用する。異なる形態（すなわち、スーパーコイル、ニックおよび線状）のＤＮＡ、およびアニオン交換クロマトグラフィーまたは塩化セシウム勾配遠心分離を使用して抽出したＤＮＡに対するポリ－Ｌ－リシンの結合親和力に明白な相違が見られなかった。これは、ポリ－Ｌ－リシン結合活性を有する異なる出所からのＤＮＡ調製において不純物の存在を示しており、これは逐次ＤＮＡ沈澱によって除去される。

またＤＮＡの有効な凝縮のために必要なNaClの濃度のポリ－Ｌ－リシンの長さの効果を調べた（図１９）。これらの変数の間の関係を、異なる出所からのＤＮＡの一定濃度を使用して評価した。広範囲のポリ－Ｌ－リシンの長さを使用した；本来、市販されているポリ－Ｌ－リシンの大きさである。しかし、化学的に合成されたポリ－Ｌ－リシンの各ロットの低角度光散乱分析によって測定されるような、種々の大きさの蛋白質の平均のポリ－Ｌ－リシンの長さである。各試料内の寸法の実際の分布は、分布する物質の60％から80％まで変化し、これは平均寸法の＋／－20％である。単一寸法内のこの広い分布はわれわれの測定の誤差の原因になる。それにもかかわらず、ポリ－Ｌ－リシンの長さと、溶液中のＤＮＡコンプレックスの凝縮に必要なNaClの濃度との間に、図１９に認められる明白な相関関係がある。この相関関係は、大きさが150個のリシン残基までポリ－Ｌ－リシンの長さが直線関数であり、その後に関数は飽和に達し、さらに長いポリ－Ｌ－リシンではＤＮＡの凝縮に必要なNaClの濃度の増加はない。これらのデーターはポリ－Ｌ－リシンとＤＮＡリン酸塩中心軸との間の協同的結合と一致している。従って、ＤＮＡを凝縮するために使用されるポリ－Ｌ－リシン分子の長さを減らすことによって、動物に注入されるＤＮＡコンプレックスの溶液は高張性が小さくなる。また、遺伝子治療のためのこの方法の有効性についてイオン強度の変化の関数の有意性を評価ため、動物の血液中のＤＮＡコンプレックスの希釈を考慮することが重要である。図１９に示されるものよりもさらに長いポリ－Ｌ－リシンを含むＤＮＡコンプレックスを用いてラットに注入し、ラビットにはさらに短いポリ－Ｌ－リシンを注入し、両者の場合のトランスフェクション遺伝子の明確なそして不変の発現に注目した。

好ましい最少の初期の塩濃度はキャリヤのコンパクション活性および塩の向混沌活性に依存する。NABMが（Lys）$_8$または（Lys）$_{27}$である場合には、初期のNaCl濃度はゼロであることができる。さらに長いポリLys鎖では、しかし、NaClがないと、沈澱は即時である。（Lys）$_{50}$では、初期のNaCl濃度は好ましくは少なくとも約300mMである。それでもなお、ＴＢＭが凝縮に影響する蛋白質であるならば、初期の塩濃度は殆どゼロである。
キャリヤは連続して、または小さい不連続の工程で添加することができる。さらに高い流速、またはさらに大きいアリコートで開始し、所望の反応終点に近づくように流速またはアリコートの大きさを減らすことができる。一般には、0.1ないし10％のキャリヤ溶液を一度にＤＮＡ溶液に添加する。各添加は、一定の渦攪拌で好ましくは２秒ないし２分毎に行う。しかし、さらに長い設定時間でも良い。
１好適例では、塩溶液に含まれる核酸は、好ましくは少なくとも0.5Mであるが、1.5M以下であり、同濃度（例えば、0.5ないし1.5M NaCl）のNaCl溶液に含まれる共有結合した標的細胞結合部分（例えば、ガラクトース）を含むポリ－Ｌ－リシン（109個のリシン）と混合する。好ましくは、核酸リン酸塩基とＤＮＡ結合部分の正に荷電した基とのモル比は、４：１ないし１：４の範囲にあり、さらに好ましくは約1.5：１である。
幾つかの実験結果を表１０４に示す。１６実施例を行い（表１０４の最初の欄に星印を付けた）インヴィヴォで試験して作業し、最終のNaCl濃度（独立した変数）をＤＮＡ濃度およびポリ－Ｌ－リシンの長さ（従属した変数）に対して回帰推定し、その結果を表１０５に示した。

接合

標的結合キャリヤ分子に依存する好適例では、核酸結合部分は、標的細胞結合部分に、直接または間接に、共有結合または非共有結合して接合いる。接合は、関心のある核酸で核酸結合部分を装填した後、またはさらに通常はその前に、行うことができる。どちらの方法でも接合は核酸が核酸結合部分に結合すること、または、そのために、標的細胞結合部分の標的細胞に結合する能力を実質的に妨げてはいけない。

製薬組成物および方法

緻密化した核酸は、随意にＴＢＭと結合し、ヒトまたは他の動物対象に投与するために製薬的に受け入れられるキャリヤと混合することができる。ＤＮＡ溶液に対して凝縮したＤＮＡおよび弛緩したＤＮＡの両方を含むことができることは認められる。本発明の組成物は好ましくは、260nmで同じ濃度の裸のＤＮＡの吸光度よりも吸光度が50％小さいような凝縮したコンプレックスで十分に豊富である。表１０３に述べたように、通常は、凝縮したＤＮＡは吸光度が20-30％であり、弛緩したＤＮＡでは裸のＤＮＡの吸光度の80-100％である。
投与は任意適当な投与経路で行われる。投与形態はその経路に対して適当でなければならない。適当な投与経路および投与形態は、血管内（注射できる溶液）、皮下（注射できる溶液、徐々に放出するインプラント）、局所（軟膏、膏薬、クリーム）、および経口（溶液、助剤、カプセル）を含む。投与経路の幾つかは投薬形態が、例えば、保護被覆またはヌクレアーゼ阻害剤を含めて、分解から結合体を保護するように配合しなければならない。
投薬は、この分野で通常行われるように、代替投薬の系統的試験によって決定する必要がある。
ラット（200-300g）は、生長または健康にはっきりと悪い影響を与えることなく実施例１のＤＮＡコンプレックスを600μgの用量で許容する。マウス（25g）は、はっきりした問題もなくＤＮＡコンプレックスを150μg注入した。
ヒトでは、一般的試験用量は60-120mgのＤＮＡであり；この用量が有効であるには低すぎまたは毒性があるほど高すぎるならば、適量が決められるまで、系統的方法で、それぞれ増減させることができる。
短命の細胞、例えば、マクロファージについては、典型的な用量スケジュールで２週間毎に１回投与する。長命細胞、例えば、肝細胞では、２ヶ月毎に１回投与する事が好ましい。

アジュバントを使用して、ＤＮＡコンプレックスの大きさを減らす（例えば2－10mM MgCl）、その安定性を増加する（例えば、スクロース、デキストロース、グリセロール）、または、デリバリ効率を改善する（例えば、クロロキンおよびモネンシンのようなリソソーム向性因子剤）。コンプレックスはリポソーム中に封入し、保護し、標的細胞への進入を、容易にする（リポソームの細胞膜との融合）。

以下実施例により本発明を説明するが、制限するものではない。

実施例１

序論

クリスマス病、または血友病Ｂ、は血液循環中の凝固因子ＩＸの機能の欠乏による伴性劣性遺伝の血液疾患である。ヒト第ＩＸ因子（ｈＦＩＸ）は、通常、肝臓中で生成される血漿糖タンパク質であり、内因性の凝固経路において不可欠な役割を果たす。いったん、前身である活性血漿トロンボプラスチン（ＸＩａ）によってセリンプロテアーゼ形（ＩＸａ）に転化すると、活性化したタンパク質は凝固因子ＶＩＩＩａ、カルシウムイオン、および燐脂質と反応し、第Ｘ因子からＸａに転化する複合体を生成する。第ＩＸ因子は、血液中への分泌の前に、その役割のために必須の幾つかの翻訳後の修飾をを肝臓中で受ける。これらは、アミノ末端のグルタミン酸残基およびアスパラギン酸のβ－ヒドロキシル化によるビタミンＫを含む。

クリスマス病は、全ての遺伝される凝固障害のおよそ10～20パーセントの原因となっている。冒された人は、循環する第ＩＸ因子のレベルに一般的に関連した幅広い臨床上の苦しみを示す。機能性因子第ＩＸの厳しい遺伝子欠乏をもった患者は、柔組織および関節への内発的な出血、あるいは小さな外傷性障害後の出血がある。一時的に遺伝し欠乏を正すことで出血症状の発現を阻止するために、血漿の輸血、あるいは第ＩＸ因子に富む濃縮液が使われる。不運なことに、保存した血漿へのウイルスの混入によって、臨床上の管理が混乱してきた。血液由来の感染、例えば肝炎や後天的な免疫不全症は、遺伝的凝固障害の治療において、重大な問題になっている。これらの合併症は、代替治療の開発の重要性を強めている。

ヒト凝固因子第ＩＸのための遺伝子は、同定・配列決定されている；1,248塩基対、長さは、相補ＤＮＡから416のアミノ酸からなるタンパク質であると予想され、そして、翻訳後の修飾の後の、完全に発達したタンパク質の分子量は約54,000ダルトンである。ヒト凝固因子第ＩＸは、血友病Ｂの遺伝子補正に使用されるかもしれない。

P-エノールピルビン酸塩カルボキナーゼのキメラ－ヒト因子ＩＸ（ＰＥＰＣＫ－ｈＦＩＸ）遺伝子（50％がスーパーコイルし／50％が開環している）が、ガラクトシル化されたポリ－Ｌ－リシン（平均長は50あるいは109アミノ酸）とともにNaClの滴定によって凝縮された。この過程は、ＣＤスペクトルおよび電子顕微鏡によってモニターされ、NaCl臨界濃度中で、直径10～12nmのＤＮＡ－キャリヤ複合体の形成がなされた。我々は、この操作を使用して共役させて、ＰＥＰＣＫ－ｈＦＩＸ遺伝子を、生体のラットの完全な肝臓に導入し、ＤＮＡ－キャリヤ複合体がこの組織の遺伝子を特異的に標的にし、また、ｈＦＩＸＤＮＡ、ｍＲＮＡおよびｈＦＩＸタンパク質がＤＮＡ－キャリヤ複合体処理の140日間後（この実験の期間）にも存在することを、証明した。ＤＮＡ－共役体の注入32日間後の動物の肝臓から分離されたＤＮＡのサザン分析によって決定されたように、この遺伝子はエピソームとして存在する.ＰＥＰＣＫ－ｈＦＩＸ遺伝子の転写は、実験の期間中ずっとされている食餌によって管理される；炭水化物が含まれない食餌を一週間動物に与えることによって、ｈＦＩＸの血液中への予想された誘発をもたらし、これは、ウェスタンブロットハイブリダイゼイションによって検出される。

方法

Ａ．　ガラクトシル化

平均の鎖の長さが109（シグマ）であるＬ－リシン－HBrあるいは、Ｌ－リシン-Clのポリマーを、本質的には、Monsignyら、（1984）Biol.Cell.,51,187.に記述されたようにガラクトシル化した。簡単には、２mgのポリ－Ｌ－リシンが、N, N－ジメチルフォルムアミド（5mg／ml）に溶解した89gのα－Ｄ－ガラクトピラノシルフェニル－イソシアネート（シ

グマ　G-3266）と反応した。この溶液は、pH9.0の１／10体積の１Ｍ炭酸ナトリウムを添加することによって、pH9.0に調整された。この反応は10％の効率なので、溶液中に存在する0.8％のε－NH_3基はグリコシルかされている。チューブはアルミニウムホイルによって光から遮断されていて、室温で６時間混合された。この溶液を次にSpectra-Por透析チューブ（Fisher 3500 M.W.遮断）を使用して、500mlの5mM NaCl緩衝液に対して、たびたび緩衝液を交換しながら（二回／日）二日間透析した。

Ｂ．　リガンドの分析

透析した溶液は、次に分光光度計によって、205Åおよび250Åにおいてポリ－Ｌ－リシンの濃縮物およびフェニル－ガラクトース残基の濃縮物のそれぞれについて、測定された。修飾されたガラクトースのみが、250Åにおいて溶液中で吸光するから、この段階で透析中に重大な損失はおこらず、そしてガラクトシル化反応が完全であることが確かめられる。

Ｃ．　複合体形成

プラスミドＤＮＡを、標準的な技術を用いて用意した。pH8.0で1mMのＥＤＴＡを含んだ10mM トリス－HCl中で、ＤＮＡを再び懸濁し、ＤＮＡの濃度は分光光度計によって決定された。RNAアーゼA+T1によってＤＮＡ調整品は二回蒸解された。この段階によって、ＲＮＡが溶液中に存在しないことが確認される（ＲＮＡはポリ－Ｌ－リシンによるＤＮＡの凝縮を妨害する）。高濃度ＤＮＡ溶液（1.5-2mg／ml）が、次の段階から使用される。ＤＮＡ凝縮の典型的なプロトコル例は、次に記述するとおりである：

ａ）200μｌの0.75M　NaCl溶液（5M　NaCl溶液から加えられた）中にある300μgのＤＮＡを、VIBRAX装置（IKA-VIBRAX-VXR）を用いて中間速度で回転攪拌した。この操作は、高塩濃度溶液中のＤＮＡポリマーの効果的な長さを増すために好ましく、それ故、ポリ－Ｌ－リシン部分のＤＮＡ中心軸への効果的な結合が達成される。

ｂ）200μｌ中の0.75M NaCl溶液（5M　NaCl溶液から加えられた）中にある84μgのポリ－Ｌ－リシン－ガラクトースを、30分間から1時間にかけて20μｌずつに分割して、滴下した。この量は、分子の割合にしてひとつのＤＮＡのPO4-グループを0.7のキャリヤNH3+グループの分子に転化する。

ｃ）この溶液は、この操作の終了時には濁る。３μｌずつに分割した5M NaCl溶液を、視覚によってモニターしながら、濁りが消えるまで、回転攪拌している溶液中に滴下した。この操作はゆっくりと、次の5M　NaClの分割を加えるのに30秒間待つ。そして、逐次2μｌずつの5M　NaClを加えながら、この溶液はＣＤスペクトル分光器のモニターにかけられる。凝縮のプロセスは、ＤＮＡ複合体の特徴的なスペクトルが観察された時点で完了する。次の、同じヌクレオチド濃度での同じプラスミドＤＮＡ中の、ＤＮＡ複合体の準備のために、このプロトコルはＣＤをモニターする必要なく踏襲でき、結果は完全に再現性がある。異なるＤＮＡ濃度あるいは異なるプラスミドを用いるときには、ＣＤのモニターを繰り返すことは必要である。

我々は、ＤＮＡ複合体の構造をモニターするための代替技術が、似た結果をもたらすことを見出した。この技術は次の各段階からなる。

ａ）およびｂ）は同上。

ｃ）この溶液は、この操作の終了時には濁る。３μｌずつに分割した5M NaCl溶液を、視覚によってモニターしながら、濁りが消えるまで、回転攪拌している溶液中に滴下した。この操作はゆっくりと、次の5M　NaClの分割を加えるのに30秒間待つ。この溶液を、次に、マイクロ遠心器を使用して、最高スピード（12000x　G）で30分間遠心分離にかけ、そして沈殿の存在が確認された。もし沈殿が観察されたら、２μｌずつに分割された5M NaClを滴下する。この溶液を、さらに0.5分回転攪拌し、そして遠心分離の段階が繰り返される。沈殿の出現は、溶液中のＤＮＡ－複合体の凝集によってであり、ＤＮＡが全部崩壊したのでないことを示す。

結果および論考

ここに記述された操作を開発するために、我々はＤＮＡ／リガンド－ポリ－Ｌ－リシン結合共役の物理的性質を、円二色性分光光度計（ＣＤ）および電子顕微鏡を使用してモニタ

ーし、機能複合体が生成することによるコンディションを研究した。我々は次に、完全な動物を使用して、ＤＮＡ／リガンド－ポリ－Ｌ－リシン結合共役の物理的性質と機能との関連を決定した。様々な濃度のNaClの存在において、リガンド－ポリ－Ｌ－リシンの添加によってＤＮＡは凝縮した。60μgのＲＮＡの存在しないＣＭＶ－β－ガラクトシダーゼ（Ａ）あるいはphＦＩＸ（Ｂ、Ｃ、ＤおよびＥ）のいずれにおいても、最終的に700mM NaCl中に150μｌの体積にまで希釈されたものは、中間速度でVIBRAX装置（IKA-VIBRAX-VXR）を用いて回転攪拌された。19μgのα－ガラクトピラノシル－フェニルイソチオシアネート／ポリ－Ｌ－リシン二結合共役（シグマ）が、同様に希釈され、回転攪拌されているＤＮＡ溶液中に滴下された。インヴィヴォでの研究においては、150μｌの700mM NaCl中の300μgのＤＮＡ（ＴＥ緩衝液中に溶解、pH8.0）が、150μｌの700mM NaCl中の95μgのα－ガラクトピラノシル－フェニルイソチオシアネート／ポリ－Ｌ－リシン二結合共役とともに凝縮した。ポリカチオンのゆっくりした添加は、濁った溶液の形成をもたらし、この濁りは、5M NaClを３μｌずつの分割を徐々に滴下することで溶解する。この濁りの消失は、視覚によってモニターされ、濁りが消失した段階で、このＤＮＡ／ポリ－Ｌ－リシン複合体溶液は、電子顕微鏡（Ｅ．Ｍ．）およびＣＤ分光光度計の両方をを用いて調べた。２μｌずつに分割した5M NaClの継続した添加は、図１Ａ～１Ｆに示したような構造変化をもたらした。様々なNaCl濃度および、添加ポリ－Ｌ－リシンの存在あるいは不在における、ＤＮＡ複合体の異なる構造配座を表す典型的なスペクトルは、図１に示された。ＤＮＡへのポリカチオンの結合は、長波長側へのクロスオーバーに置換することを特徴とする特異的なスペクトルとなった；このシフトは高い序列の、ＤＮＡのＹ型に似た非対象構造でのＤＮＡ／ポリ－Ｌ－リシン結合のカイラルパッキングに関連づけられる。図１Ａに示されたように、二本鎖ＤＮＡ（１M NaCl中）は特異的なスペクトルを持ち、これは様々なイオン強度におけるポリ－Ｌ－リシンの添加によって著しく部分的に変化する（図１ａ）。ＤＮＡ／リガンド－ポリ－Ｌ－リシン結合共役のイオン強度が強まれば、複合体は凝集状態（図１Ｃ）から凝縮状態（図１Ｄおよび図１Ｅ）へののトランジションが進行する。これは、図１Ａに示したように、複合体のスペクトルのシフトにも一致する。溶液中のイオン強度の増加とどもに生じるクロスオーバー（図１の０線）でのシフトおよび220nmでのＣＤスペクトルの変化が、ＣＤ分光器による凝縮ＤＮＡコンプレックスの生成をモニターする際に、特に重要である。ＤＮＡ複合体の凝集に必要とされる臨界幅を超えて、イオン強度が増大したときは、この複合体は凝縮していないような、弛緩した構造をとる（図１Ｆ）。このＤＮＡ複合体の構造におけるトランジションは、ＣＤスペクトル分光計ではモニターできず、そのため正確なNaClの滴定が、この操作の成功にとって非常に不可欠である。図１Ｄで観察されるＤＮＡ複合体の直径（約10nm）は、アシアロ糖タンパク質のための肝臓の受容体による、分子リガンドの取り込みのために、望まれる識別する範囲に一致する。

我々はそのため、インヴィヴォにおいて、受容体－媒介エンドサイトーシスによるＤＮＡを肝細胞に運ぶ媒介物として観察されたＤＮＡの構造の適切さを証明した。取り込みのプロセスの性質を確証するために、我々はアシアロ糖タンパク質受容体をもっているHepG2細胞によって血液からＤＮＡ複合体を取り除いた。ＤＮＡ複合体の取り込みは、100倍モル過剰のアシアロゲトインを競合体として使用するとき完全に阻害され、複合体はＡＳＧＰを通じて受容体－媒介エンドサイトーシスによって取り込まれることが示された。

ラットからのＰ－エノールピルベイトカルボキシジナーゼ（ＰＥＰＣＫ）の細胞ゾルの形成のための遺伝子のプロモーターからなる、キメラの遺伝子プラスミド（pPFIX）は、ヒト凝固因子第ＩＸ（ｈＦＩＸ）（Ferkolら、FASEB Ｊ.,7:1081（1933））のためのｃＤＮＡに結びつけられ、デリバリについていって肝臓中でのＤＮＡ発現のために使用される。時間経過におけるトランスフェクションされた動物中でのｈＦＩＸ遺伝子の発現は、完全に発達したｈＦＩＸペプチドに対するモノクロナル抗体を用いて、ウェスタンブロットハイブリダイゼイションによって決定された。

平均体重が約250gである、成体スプラグ・ドーリイラットをエーテルで麻酔した。前述したようにガラクトース－ポリ－Ｌ－リシンとともに混合した、300μgのpPFIXを含んだ300

～400μｌの溶液を、尾部の大静脈に注入した。ラットを、トランスフェクション後０、４、８、12、32、72および136日後に殺し、組織と血液サンプルを取り出した。
トランスフェクションされた動物からの血漿サンプル（１μｌ）および、１：４に希釈されたヒトの血漿対照実験物を、ＳＤＳ／10％ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動にかけ、一般的な技術を用いて、ニトロセルロース膜フィルター上に移された。ブロットは１ｘPBS、pH7.4、0.03％ポリオキシチレンソルビタンモノラウレート（Tween　20）、および10％（w/v）の乾燥ミルク皮膜で、室温で2時間覆った。続いて1/1000希釈のモノクロナルハツカネズミ抗人因子第ＩＸ抗体（３μg/ml）とともに室温で２時間インキュベートした。このモノクロナル抗体は、ケニス・スミス（United Blood Services、New Mexico）から親切にも提供してもらった。膜はpH7.4の１×PBSおよび0.03％　Tween 20で３回洗浄し、次に抗ハツカネズミlgg（H+L）－セイヨウワサビペルオキシダーゼ共役体の１／500希釈とともにインキュベートした。この膜は、次にpH7.4の１×PBSおよび0.03％　Tween 20で４回洗浄して、次に化学ルミネセンスを強化した10mlのウェスタンブロット検出溶液を１分間加えた。フィルターから発するルミネセンスを、感光紙によって２０秒間検出した。我々は、140日間にわたってｈＦＩＸモノクロナル抗体に対して特異的にハイブリダイズしているバンドを検出した。トランスフェクションされていない対照群においては、ハイブリダイズしているバンドは検出されなかった。
トランスフェクション後３２日間後の動物からの肝臓が取り出され、ゲノムＤＮＡが一般的な技術を用いて分離された。トランスフェクションした動物からおよびトランスフェクションしていない対照からの全部で5μgのＤＮＡが、EcoRIあるいはBgl IIによって一晩切断された。サザンブロット電気泳動を確立された方法で行った。トランスフェクションされた動物からのＤＮＡのみが、Bgl IIで4.5kb、EcoRIで2.6kbのプローブにハイブリダイズされた。
脾臓、肺、心臓および肝臓器官を、300μgのＤＮＡ複合体によってトランスフェクションされたラットから得た。これらの器官から分離された全てのゲノムＤＮＡについて、ＰＣＲ法分析を実施した。トランスフェクションされたラットの肝臓のみが、720bpプローブについて陽性であり、ラットの脾臓、肺、心臓、あるいは対照動物の肝臓は違った。
pFIXによってトランスフェクションしたラットの肝臓中のヒト因子ＩＸのためのｍＲＮＡ転写物の存在は、モロニーハツカネズミ白血病ウイルス逆転写酵素による全細胞質肝臓のＲＮＡの処理および、ポリメラーゼ連鎖反応による生成したｃＤＮＡの増幅後に決定された。簡単には、１μgの全ラット肝臓ＲＮＡを、10UのDNAse Ｉ（RNAseは含まれない）で処理し、次に500nMの$(dT)_{16}$オリゴヌクレオチドプライマーおよび500nMの各dNTP含んだ溶液に加え、次に42℃に熱し、次に１μｌのcDNAプールをＰＥＰＣＫプロモーターの５’ＵＴＲ領域に広がるプライマーおよびｈＦＩＸのためのcDNAを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応によって増幅した。対照として、同じＲＮＡサンプルで逆転写酵素によってｃＤＮＡに転化していないものも、ポリメラーゼ連鎖反応の鋳型として使用し、混入プラスミドＤＮＡが増幅していないことを確かめた。生成物は、アガロースゲル電気泳動および蛍光標識されたヒト因子第ＩＸのｃＤＮＡプローブを使用したサザンブロットによって分離された。我々は、トランスフェクションされた動物のみ、ｈＦＩＸプローブによって特異的にハイブリダイズされたバンドを確認した。トランスフェクションされていない対照群、あるいは逆転写酵素によってｃＤＮＡに転化されていないトランスフェクションされたサンプルのいずれにおいてもバンドは検出されなかった。
トランスフェクションされた動物の血漿中でのｈＦＩＸの機能活性は、ヒト因子第ＩＸの凝結促進活性を測定して分析すればよい。１段階の変更は因子ＩＸ欠失ヒト血漿でカオリン活性化の、部分的トロンボプラスチン時を使用した。静脈穿刺によって実験動物から血液サンプルを得る。５０分の１体積の500mMクエン酸ナトリウム（pH5.0）を、凝固を防ぐために加え、そして血漿は20℃で保存される。このサンプルを二重に分析し、次にこれらの活性は、24人の正常な人の男性からの貯められていた血漿の機能活性と比較される。正常な人の血漿中は100％の機能活性あるいは、約３μg／mlのヒト因子ＩＸに相当する。ラット血漿中の因子ＩＸ活性のバックグランド（ラット血清中で、約0.15ユニット／mlの因

子ＩＸ活性）は、それぞれの動物中で決定されたヒト因子ＩＸの値からそれぞれ引かれている。バックグランドの値は、この分析で使用されたヒトＩＸ因子アッセイで測定されたラット因子ＩＸの非特異的交叉活性である。静脈穿刺によって実験動物から血液サンプルを得る。５０分の１体積の500mM硝酸ナトリウム（pH5.0）を、凝固を防ぐために加え、そして血漿は20℃で保存される。人の血漿中における正常なｈＦＩＸ濃度は３μｇ／mlである。約15ng／ml（トランスフェクション７２日後）から1050ng／ml（トランスフェクション４８日後）の活性化ヒト因子第ＩＸが、ＤＮＡ複合体によってそれぞれの動物に注入された（表102）。動物中で見出される組み替えｈＦＩＸの濃度の小さな変化が、デリバリー効率による違いあるいは新しく導入された遺伝子の発現による違い、のどちらを表すのかははっきりしない。このｈＦＩＸ遺伝子は、動物中で140日間（この実験の期間）にわたって発現し、特に48日目に最も高いレベルを示した（表102）。

トランスジェニック動物を使用して、ＰＥＰＣＫプロモーターからの転写を、低タンパク質・高炭水化物食餌の投与によって導くことが確立されている（McGraneら、1988,1990;Shortら、1922）。トランス遺伝子の調節された発現を立証するために、我々は、一週間にわたる高タンパク質・低炭水化物の食餌を与え、あるいは普通の食餌をあたえた、その前後におけるトランスフェクションした動物の血液中のｈＦＩＸの存在を、ウェスタンブロットハイブリダイゼイションによって調べた。PFIX遺伝子を含む動物中の、PFIX遺伝子の発現の三倍までの誘導を、ＤＮＡ複合体の注入後140日後までに記録した。ASGEを標的にした受容体に媒介された遺伝子転移代替方法を用いた、ラット肝臓に導入されたこれと同じＰＥＰＣＫ－ｈＦＩＸ遺伝子は、２日間のみの活性であった（Ferkolら、1933）；これは、高度に緻密にしたＤＮＡ複合体が、本研究において記録されたトランス遺伝子の発現の長期化の原因であろうことを、示唆する。

140日間中の複数の時点のｈＦＩＸタンパク質の維持されたレベルの検出は、実験期間中を通して発現していることの証拠となる。ヒトＦＩＸ800bp.の特異的転写は、逆転写酵素による全細胞質ＲＮＡから生じたｃＤＮＡのＰＣＲ増幅によって検出され、動物の肝臓中では機能ｈＦＩＸタンパク質が発現している（図３Ａ）。ｍＲＮＡの実験期間中にわたっての存在は、これらの動物中に転写活性ＤＮＡの維持されたプールがあることを示し、この持続性によって長きにわたっての発現およびｈＦＩＸと特異的ｍＲＮＡの検出を説明できる。

我々はまた、トランスフェクション３２日後の動物の肝臓中に、トランスフェクションされたＤＮＡを存在することを確立でき、また、その物理的性質を研究した。この採取したＤＮＡは、このプラスミドを線状（4.5kb）にするBgl IIおよびこのプラスミドからキメラの2.6kbの遺伝子を放出するEco RIを用いて制限酵素分析にかけられた。ｈＦＩＸに特異的なプローブを使用したサザンブロットハイブリダイゼイションによって、トランスフェクションしたＤＮＡは、トランスフェクションした肝臓中でエピソームできる状態で残っていることが示され、その理由は、Bgl IIから生じるシングルバンドが、線状プラスミドのサイズと一致し、ランダムな増殖が起こったときに予期される不鮮明なハイブリダイゼイションと対照的になるからである（図３Ｂ）。我々は、トランスフェクションしたＤＮＡが、トランスフェクションした動物のｅｎｏｍｅ中でランダムな増殖をすることの可能性を除外することはできない。しかしながら、肝臓は有糸分裂の刺激（すなわち、肝切除）を受けていないので、この事象は起こりそうもない。

アシアロ糖タンパク質受容体は、肝臓の柔組織の細胞にのみ存在する。それにもかかわらず、アシアロ糖タンパク質および他のガラクトース末端のリガンドが、分子リガンドの大きさに依存する機構によって、マクロファージによって取り上げられ得ることが示された。参照、Schlepper-Schafer,J.ら、Exp.Cell.Res.,5:494（1986）;Bijsterbosch,M.K.ら、Mol.Pharmacol 36:484（1989）；およびBijsterbosch,M.K.ら、Mol.Pharmacol 41:404（1922）。我々の実験におけるＤＮＡ／リガンド－ポリ－Ｌ－リシン複合体の大きさは、アシアロ糖タンパク質受容体の識別するための範囲と矛盾しない。このＤＮＡ複合体の特異性を研究するために、我々は、トランスフェクションした動物中の異なる組織からＤＮＡを得て、そしてそのトタンスフェクションされたＤＮＡをＰＣＲ法によって増幅した。

我々の結果は、肝臓以外の組織中では、増幅できるＤＮＡが存在しないことを示し、これは肝細胞の特異的な取り込みを示す。特に興味深いのは、肺や脾臓といったマクロファージを含んだ組織中においては、検出できる取り込みがなかったことである。対照的に、トランスフェクションした動物の肺や脾臓中から、トランスフェクションされたＤＮＡを、ウらによって記述されたアシアロ糖タンパク質受容体を用いて、受容体によって媒介されたエンドサイトーシスのための方法を用いることで、我々は検出した。我々の実験中でなされた分子リガンドの小ささが、ここに報告された特異的な取り込みの原因になっていると、我々は考えている。

実施例２

この実施例中では、異なるプロモーター遺伝子構成物（ＳＶ４０／ルシフェラーゼ）が、異なる標的細胞結合部分を使って、異なる細胞タイプ（マクロファージ）中へデリバリーされる。

序論

特定の細胞による循環している糖タンパク質の認識および取り込みは、この分子表面に存在していてさらされている糖残基の性質によって決定される。特定の糖タンパク質のクリアランスシステムは、比較的限定的で、特定の種類の細胞によって媒介されている。マンノース受容体は糖タンパク質を、表面にさらされて還元されていない位置でのマンノース、グルコース、フコース、およびＮ－アセチルグルコサミンの残基とともに認識する。様々なタンパク質および糖タンパク質が結合共役して、分離した肺胞のマクロファージに結合したこれら炭水化物残基を運び、そしてラットの循環中へ注入したマンノース－末端糖タンパク質はインヴィヴォでクッパー細胞によって取り除かれる。逆に、ガラクトース－末端タンパク質は、これは肝細胞上のアシアロ糖タンパク質受容体によって取り除かれるのだが、これらの細胞によっては認識されることはない。この細胞－表面受容体は、循環する単球ではなく、様々なマクロファージサブタイプによって発現され、そして、マンノース－末端糖タンパク質のデリバリーおよび内面化を媒介する。このマンノース受容体は、前リソソーム区画から細胞表面への継続したリサイクルを行い、そして受容体発現はマクロファージによって調節されている。

マンノース末端糖タンパク質に結合し、それ故受容体を介する遺伝子運搬の標的細胞になりうるかもしれない様々な器官（すなわち、肝臓、脾臓、肺、および骨髄）に、マクロファージは存在する。マンノース受容体を運搬する機能外来性遺伝子をデリバーする我々の能力を確かめることによって、この仮説をテストした。このレポートにおいて、マンノース－末端ネオ糖タンパク質キャリヤーを合成し、ハツカネズミの腹膜の浸出液から分離された一次ネズミマクロファージへの受容体媒介遺伝子転移のためのリガンドとして使用した、これはその表面に受容体を豊富に発現する。加えて、リポーター遺伝子を、マンノース－末端ネオ糖タンパク質キャリヤーを使用して、無傷のラットの肝臓および脾臓中のマクロファージにうまく転移させた。

方法

材料：ＤＮＡ－修飾酵素、ヌクレオチド、および5-ブロモ-4－クロロ-3－インドール－β－Ｄ－ガラクトピラノサイドをBoehringer Mannheim（Indianapolis,Indiana,USA）から購入した。ポリ（Ｌ－リシン）、ａ－Ｄ－マンノピラノシルフェニルイソチオシアネートアルブミン、およびａ－Ｄ－ガラクトピラノシルフェニルイソチオシアネートを含む全ての化学物質を、Sigma Chemical Conmany（St.Louis,Missouri,USA）から購入した。ルシフェラーゼ分析システムを、Promega（Madison,Wisconsin,USA）から購入した。ウサギ抗－β－ガラクトシダーゼ抗体およびフルオレセインイソチオシアネート－結合共役ヤギ抗－ウサギIgGを、５ Prime to 3 Prime,Inc.から購入した。すべての中膜、血清、および抗生物質を、Gibco Laboratories（Grand Island,New York,USA）から購入した。

マンノース末端糖タンパク質キャリヤーの調製：合成の糖タンパク質キャリヤーを作成する、ここでは、平均鎖長が100（M_r 20,000Da）であるポリ（Ｌリシン）を、Ｎ，Ｎ－ジメチルフォルムアミドに溶解しているａ－Ｄ－マンノピラノシルフェニルイソチオシアネートを使用して、糖タンパク質にした。この溶液はｐＨ9.5の１Ｍ炭酸ナトリウムを加え

ることで、ｐH9.5に調節した。光を遮断し、22℃で16時間インキュベートしてから、溶液を５ｍM塩化ナトリウムに対して２日間透析した。約0.8から1.0％のポリリシン中のアミン側鎖が糖タンパク化され、これは250nmにおける吸光波長によって決定された。対照として、代替糖タンパク質キャリヤーを、ａ－Ｄ－ガラクトピラノシルフェニルイソチオシアネートとともに、ａ－Ｄ－マンノピラノシルフェニルイソチオシアネートによって合成した。

レポーター遺伝子およびプラスミドの準備：発現プラスミドpGEMlucはＳＶ40ウイルスプロモーターを含み、増大要素をP.pyralisルシフェラーゼ遺伝子に結紮した。プラスミドpCMVZおよびpCMVIL2rは、E.coli lacZおよびインターロイキンの２受容体遺伝子にそれぞれ結びついている巨細胞ウイルス（ＣＭＶ）プロモーターからなり、やはりレポーター遺伝子として使用される。このプラスミドはE.coli DH5a中で成長し、抽出して、そして一般的な技術（14）を用いて生成される。制限エンドヌクレアーゼによるプラスミドの分解によって、適切な長さのフラグメントが得られ、そして、1.0％アガロースゲルによる電気泳動によって、純度が達成される。プラスミドのサイズは次の通りである：pGEMluc、6.0;pCMVlacZ、10.9、pCMVIL2r、5.4kB。プラスミドの準備において、バクテリアの遺伝子ＤＮＡは存在しなかった。

マンノース末端糖タンパク質キャリヤーＤＮＡ複合体の準備：複合体は案施例１と類似して形成されるが、しかしながら、このＤＮＡは約80％超ヘリクス構造をとり、20％は開環構造である。

細胞および細胞培養：一次マクロファージを、１mlの醸造用チオグリコレート媒介の腹膜内への注入４日後のマウスの腹膜腔から、分離した。この腹膜浸出液からのマクロファージは、前述したように集められ、そしてRPMI Media 1640中で保持した。この方法で、約５×10^6個の細胞を一匹のマウスから集めることができ、このうち40から75％は、形態学上の細胞の特徴および細胞化学の同定にもとづくと、単核食細胞である。トランスフェクションは、収集した１日から２日後になされる。分離した細胞は約30から60％のトランスフェクションの時点の合流がある。細胞の生存能力は、ひとつづきの細胞の数およびトリパンブルー排除によって決定される。

培養中のマクロファージへのＤＮＡデリバリー：分離１日後、マウスの腹膜腔内から分離されたこの細胞は、ＰＢＳ（ｐH7.4）によって一度洗浄され、中膜をトランスフェクション前に素早く取り替える。５μg（0.4から0.7pmol）プラスミドを含んだ、この結合共役－ＤＮＡ複合体は、培養基質に適用され、他の実験が要請されない限り、細胞上に24時間そのままの状態であることが許される。この細胞は、次にタンパク抽出のために収集しても、あるいはトランスフェクション後の幾つかの時点におけるβ－ガラクトシダーゼアッセイのために、そのまま固定してもよい。

動物：平均体重が約250gである、成体のオスのスプラグドーリイラットを、エーテルを用いて麻酔した。無菌技術を用いて、300μg（20.8～42.0pmol）のキャリヤに複合した発現プラスミドを含んだ0.3から0.6mlの溶液を、尾部の大静脈に注入した。ラットを、複合体の注入後、異なるインターバルで殺し、肝臓、肺、および脾臓をトランスフェクションした動物から分析のために取りだした。さらに、マクロファージが肺胞、骨髄、および脾臓から分離された。骨髄細胞はラットの大腿骨から得た。この大腿骨は、実験動物が殺された後に外科的に取り出されて、次に１mlの媒体を髄腔に注入し髄腔から吸引した。髄の単細胞懸濁液を、パスチュールピペットを用いて慎重に細胞を吸引することで用意した。骨髄から抽出した細胞は、RPMI Media 1640中で8～12時間の間維持されて、スライドガラスにつけられることができ、この時点では付着した細胞は免疫細胞化学染色のために固定されている。トランスフェクションされていない動物と模擬トランスフェクションした動物を、全ての分析において、対照群として使用した。動物実験のプロトコールは、ケースウェスタン　リザーブ　ユニバーシティ　インスチテューショナル　アニマル　ケア　コミティによって検査・承認された。

β－ガラクトシダーゼ活性のための細胞化学的アッセイ：β－ガラクトシダーゼを発現しているそれぞれの細胞は、5-ブロモ-4－クロロ-3－インドール－β－ガラクトピラノサイ

ド（X-gal）を前述したように用いて、以下のインキュベーションによって同定される。簡単には、この細胞を、15分間ＰＢＳ中の１％グルタルアルデヒド溶液によって固定し、次に、0.5% X-galを含んだ溶液を用いて37℃で12時間インキュベートした。また、この細胞を、非特異的エステラーゼ活性のために、染色し、これは不溶性の黒灰色染料を生じる。組織培養基中の最少100個の細胞を数えてβ－ガラクトシダーゼ活性を発現する細胞の割合を決定した。

組織中のβ－ガラクトシダーゼを発現しているそれぞれの細胞は、X-galを前述したように用いて、以下のインキュベーションによって同定した。簡単には、この細胞を、10分間ＰＢＳ中の0.5%グルタルアルデヒド溶液によって固定し、pH7.5のＰＢＳで２回洗浄し、次に、リン酸塩－緩衝塩水（ｐH7.4）中の0.5%X-gal、５mMのポタシウムフェリシアネート、５mMのポタシウムフェロシアネート、および1mM塩化マグネシウムを含んだ溶液を用いて、37℃で６時間インキュベートした。この染色された組織は、ＰＢＳ中の２％パラホルムアルデヒド／0.5%グルタルアルデヒドの中で、４℃で固定し、パラフィンを一般的な操作で固定し、そして５μｍの切片にカットした。切片を0.1%核fast redによって対比染色した。隣接する組織の部分も、非特異的エステラーゼ活性のために染色し、これは、黒褐色を生じる。青く染色された細胞は、分光顕微鏡によって同定した。

マクロファージの細胞化学的同定：細胞および組織分画は、非特異的エステラーゼ活性として染色し、これは単核食細胞に比較的特異的である。細胞の塗抹標本は、上述のように固定し、そしてａ－ナフチルアセテートおよびFast Blue BB塩を含んだ濾過溶液とともに、室温で10分間インキュベートした。組織部分はこの溶液によって１～３時間染色し、0.1%核fast redによって対比染色した。

ベータガラクトシダーゼのための免疫細胞化学染色：プラスミドｐＣＭＶＺでインヴィヴォでトランスフェクションした組織（脾臓および骨髄）から単離した細胞中のトランスジーンの発現は間接免疫螢光法によって測定した。細胞塗抹標本は、室温で２分間メタノール／アセトンで固定し、細胞を３７℃で１時間ラビット抗－ｂ－ガラクトシダーゼポリクローナル抗体でインキュベーションした。最初の抗体を固定した細胞塗抹標本の疫検出用ＰＢＳ中で１：１００に希釈した。ＰＢＳ中で１：１００に希釈した抗ラビットイムノグロブリンＧを結合したフルオレセインイソチオシアネートを二次抗体として使用した。また細胞は、細胞核に赤い螢光を生じるヨウ化プロピジウムで対比染色した。各インキュベーションの間で、細胞を３回５分間ＰＢＳで洗浄した。染色した細胞を螢光顕微鏡で調べた。

ルシフェラーゼ活性用アッセイ：培養細胞を上記のように収集し、溶菌し、前記のようにルシフェラーゼ活性を分析した。動物を犠牲にしてそのまま５０ミリリットルの冷ＰＢＳでｐＨ７．５にて潅流した後、トランスフェクションしたコントロールラットから組織を収集した。組織は溶菌緩衝液中で均質にし、１０分間２２℃でインキュベーションさせた。細胞溶菌液を次に５分間４℃で遠心分離し、蛋白質抽出物をルシフェラーゼ活性について分析した。溶菌液は蛋白質含量についてアッセイし、測定した積算した光単位を全蛋白質含量に対して標準化した。全測定は３回行い、平均値で表した。

統計学上の分析：データーは平均値（ＳＥＭ）の±標準誤差で表し、スチューデント－ニューマン－ケールス（ＳＮＫ）試験を使用して分散量を分析して評価した。

結果

マンノース終結糖蛋白質キャリヤを使用する一次マクロファージのインヴィトロトランスフェクション

リポーター遺伝子としてＥ．ｃｏｌｉ　ｌａｃＺ遺伝子を符号化する発現プラスミド（ｐＣＭＶＺ）を使用して、プラスミドおよびマンノース終結糖蛋白質キャリヤのコンプレックスをマウスから単離した細胞腹膜滲出物に塗布した。トランスフェクション２４時間後、細胞をβ－ガラクトシダーゼ活性について試験した。トランスフェクションした細胞の数は試験した全細胞の５から２６パーセントまで変化した。さらに、非特異的エステラーゼ活性、トランスジーンを発現する単核細胞およびマクロファージの細胞化学マーカー特性をもつ細胞の割合は４０％から７５％までの範囲だった。キャリヤに結合した無関係の

プラスミド（ｐＧＥＭｌｕｃ）またはガラクトース終結糖蛋白質キャリヤに結合した発現プラスミド（ｐＣＭＶＺ）からなるコンプレックスを使用するトランスフェクションは、滲出物細胞では有意のβ－ガラクトシダーゼ活性はない。薄い青色の染色がこれらのコントロール細胞に見られ、これは内生のβ－ガラクトシダーゼ活性に起因するものであるらしい。それにもかかわらず、コントロール中の青色染色細胞の割合お強度はトランスフェクションしたディッシュのものよりも著しく小さかった。マンノース終結糖蛋白質キャリヤ－ＤＮＡコンプレックスは、細胞数およびトリパンブルー染色に基づき、処理後に変わりやすい細胞の割合が、コントロールとは有意差が無かったので、細胞に対して毒性がないことを示した。

マンノース終結糖蛋白質キャリヤと発現プラスミドｐＧＥＭｌｕｃのコンプレックスを、期間を増やすために腹膜滲出物から単離した細胞に塗布し、ルシフェラーゼ活性を、トランスフェクションに続いて２４時間トランスフェクションした細胞の蛋白質抽出物で測定した。先の実験で注目されるように、転移した遺伝子の発現水準は変わった。トランスフェクションした細胞における関連するルシフェラーゼ活性の増加は８倍であり（ｐ＜０．０１）、これに対して、ガラクトース終結糖蛋白質キャリヤを使用して生成したコンプレックスで処理した細胞から得られた蛋白質抽出物はトランスフェクションしていないコントロールとは有意に異なる活性を示さなかった。さらに、マンノース受容体をキャリヤと競争しなければならないトランスフェクション直前に、培養基にコンプレックスに対して百倍のモル過剰のマンノシル化ウシ血清アルブミンを添加すると、リポーター遺伝子の取り込みと発現を完全に阻害した（ｐ＜０．０１）。これら細胞のトランスジーン発現の持続時間も試験した。マンノース終結糖蛋白質キャリヤと発現プラスミドｐＧＥＭｌｕｃのコンプレックスを、２４時間細胞に塗布し、蛋白質抽出物をトランスフェクション後数時間の時点でルシフェラーゼ活性についてアッセイした。最適のトランスジーン発現は処理後１日で検出され、ルシフェラーゼ活性はトランスフェクション８日後にコントロール水準まで減少した。

マンノース終結糖蛋白質キャリヤを使用するマクロファージのインヴィヴォトランスフェクション

マンノース終結糖蛋白質キャリヤを使用してリポーター遺伝子を無傷の動物の脾臓および肝臓に移した。ラットに麻酔をかけ、３００μｇのプラスミド（ｐＧＥＭｌｕｃ）をマンノース終結糖蛋白質キャリヤに混合し、数分間にわたり尾部の大動脈に徐々に注入した。コントロールと、キャリヤに結合した無関係のプラスミド（ｐＣＭＶｌａｃＺ）からなるコンプレックスを使用する動物の模擬トランスフェクションも並行して行った。全動物に残存したコンプレックスを注入した。肝臓、肺、および脾臓から抽出した組織ホモジェネート中のコンプレックスを注入した４日後にルシフェラーゼアッセイを行った。トランスフェクションした動物から得られた脾臓からの蛋白質抽出物に有意の水準のトランスジーン発現を認めた。さらに低い水準のルシフェラーゼ活性を肝臓と肺に見出した。トランスフェクションしていないラットと、マンノース終結糖蛋白質キャリヤに結合した無関係のプラスミド（ｐＣＭＶｌａｃＺ）からなるコンプレックスで処理した動物は、どの組織からの蛋白質抽出物も有意のルシフェラーゼ活性はなかった。トランスフェクション１２日後、ルシフェラーゼ活性は試験した全組織でバックグラウンド水準に近づいた。

トランスジーン発現の細胞分布を、ｐＣＭＶｌａｃＺを含むコンプレックスを注入した３日後に脾臓および肝臓の切片で試験した。組織は、細胞化学染色によってｂ－ガラクトシダーゼ活性について分析した。コンプレックスで処理した動物はコントロールとして使った無関係のプラスミド（ｐＣＭＶＩＬ２ｒ）を使用して作った。ベーターガラクトシダーゼ発現は、細胞化学染色に基づいて非特異的エステラーゼ活性を発現した細胞の分布に従った被膜下の領域にある脾臓の小細胞を数個検出した。コントロールの脾臓の対応する細胞にはベータガラクトシダーゼ活性は見られなかった。希有青色染色細胞はトランスフェクションした動物の肝臓部分に存在し、やはり表面マンノース受容体をもつ肝臓内皮細胞はトランスジーンを発現しなかった。また核をもつ細胞は脾臓から単離されインヴィトロで染色した。さらに、トランスフェクションした動物とコントロールの動物の骨髄と気管

支肺胞性の洗浄液から抽出した細胞もまた、Ｘ－ｇａｌを含む溶液で処理し、ベーターガラクトシダーゼ活性について試験した。脾臓から得られた約１０－２０パーセントの核のある細胞が青色に染色した。模擬トランスフェクションした動物からの希有細胞も薄く青色に染色し、これは内在性β－ガラクトシダーゼに起因するらしい。それにもかかわらず、コントロール中の青色染色細胞の割合と強度はコントロール動物に見られたものよりも有意に小さかった。

細菌のベーターガラクトシダーゼに向けたポリクローナル抗体を、トランスジーン生成物の免疫細胞化学の局在化に使用し、脾臓中の青色染色細胞が内生のベーターガラクトシダーゼまたはＸ－ｇａｌの非特異的加水分解によるものではないことを確立した。核をもつ細胞は、上記の動物の脾臓と骨髄から単離し、ベーターガラクトシダーゼおよびフルオレセインイソチオシアネート複合抗ラビットに向けた抗体で染色し、免疫螢光を試験した。細胞化学アッセイで示された青色染色細胞と形態学的に似ている幾らかの単離した細胞は、免疫螢光染色性があった。さらに、これらの細胞は非特異的エステラーゼ活性があった。

論考

培養物のマクロファージおよび全動物の肝臓への機能遺伝子の転移を媒介できる合成糖蛋白質コンプレックスを開発した。マンノース終結糖蛋白質キャリヤに非共有結合した発現プラスミドは、マンノース受容体を発現する細胞に有効に導入することができる。受容体媒介遺伝子転移系によるＤＮＡのデリバリは標的細胞の表面に存在する受容体に依存する。アシアログリコプロテイン受容体を発現できない細胞は、この系によってはトランスフェクションされなかった。マクロファージに加えて、マンノース受容体を発現できない腹膜の滲出物に存在する他の細胞のタイプ、すなわち、顆粒性白血球、リンパ球および繊維芽細胞はトランスフェクションされなかった。リポーター遺伝子の発現は、マクロファージ同定に使用した細胞化学マーカーに頼る非特異的エステラーゼまたはペルオキシダーゼ活性のいずれかをもつ細胞に局在していた。

特異的受容体についてリガンドの特異性および親和性は外因性遺伝子のデリバリにかなり重要である。マクロファージはマンノース終結糖蛋白質を高い親和力と特異性で結合する。マンノース終結糖蛋白質キャリヤはリポーター遺伝子を培養基および無傷の動物のマクロファージにうまく導入したが、トランスジーン発現はガラクトース終結糖蛋白質キャリヤを使用してトランスフェクションした細胞中に検出されなかった。培養基中に存在する糖蛋白質に従属する飲作用または食作用の非特異的増加による取り込みは現れない。プラスミドのデリバリと発現は、マンノース受容体の結合部位について恐らく競争するであろう培養基にマンノシル化牛血清アルブミンを添加して阻害される。最後に、マンノース受容体はまた、暴露位置でグルコース、フコース、およびＮ－アセチルグルコサミン残基をもつ糖蛋白質を認識するので、マンノースに代わる単糖類を置換するとＤＮＡキャリヤコンプレックスの親和力を増加する。さらに、単糖類は多価糖蛋白質よりも受容体に対して不十分なリガンドなので、遺伝子転移効率はオリゴ糖、即ちオリゴマンノースに炭水化物残基を変えることによって潜在的に改善することができる。

標的細胞に転移した遺伝子の発現の水準を決定する際の主な因子は、核への外因性ＤＮＡの生存とデリバリを含む。受容体媒介機構によって導入された遺伝子の発現はエンドソームの区画中のコンプレックスのトラッピングと分解によって制限することができる。マンノース終結糖蛋白質は、受容体媒介エンドサイトーシスによってマクロファージに導入され、プリリソソーム酸性区画にデリバリされて、続いて二次リソソームに送られる。明らかに、発現されるトランスジーンのために細胞にコンプレックスが入った後に転移したＤＮＡは分解を避けなければならないので、導入された結合部分は分解を防止する。これらのデリバリ系によって細胞中に転移したＤＮＡの物理的状態は、生存と続く発現に貢献することができ、ＤＮＡが非常に緊密な形でヌクレアーゼ消化に一層耐えられる。さらに大きさが小さいキャリヤ－ＤＮＡコンプレックスもまた、食作用によるものではなく、特異的にマンノース受容体を介してプラスミドを網内系の細胞に導入できる。

この研究は、マンノース受容体を標的にすることによってマクロファージに特異的に向か

う遺伝子転移の可能性を示しており、理論的にゴーシェー病のような代謝の種々の先天性のエラーの治療に近づくことができる。またマンノース受容体を標的にする薬理学療法がゴーシェー病の患者に有効であることが示された。
修飾したヒトグルコセレブロシダーゼで感染個体を繰り返し治療すると、外の炭水化物部分が分解し終結マンノース残基をさらし、病気が実質的に臨床的に改善され、肝脾腫を小さくして貧血を解消した。不幸にも、この治療のコストは多くの患者には高すぎた。骨髄移植は非神経病の形の病気に効くことが示されたが、移植の潜在的合併症が多くの患者、特に軽い病気の個体では、その実施を阻んでいる。しかし、ゴーシェー病は骨髄移植によって癒されるので、ゴーシェー病の遺伝子治療のために提案されたひとつの可能性のあるアプローチは正常のグルコセレブロシダーゼ遺伝子を自家移植した造血幹細胞に生体外移植し、次に患者の中に導入することを含む。あるいは、リンパ芽球は冒された個体から収集でき、複製－不全の、野性型遺伝子を含む組み換えレトロウイルスで感染させ、患者に戻すことができた。分泌した酵素はマンノース受容体を介してマクロファージに入り、従って治療の二次標的になる。この系では、マクロファージは遺伝的修正のための一次標的である。発現の遺伝子デリバリの有効性、持続時間および発現水準に関する実際的な疑問は、この技法を用いて達成され、ＤＮＡ－キャリヤコンプレックスの免疫学的性質が扱われる必要がある。それにもかかわらず、受容体媒介遺伝子治療は、このような病気の治療に健康な組織を冒すことなくアプローチする可能性をもっている。
実施例３
また気道上皮に発現するラット多因子免疫グロブリン受容体に向けたモノクローナル抗体のＦａｂ断片を使用した。Ｆａｂペプチドはポリ－Ｌ－リシンに共有結合し、下記方法を用いてＳＶ４０－ルシフェラーゼ発現ベクターに結合する。ＤＮＡコンプレックスを注入したラットは、受容体を発現した組織にだけ８日間の長さで（実験の継続期間）ルシフェラーゼ活性をもった。これらの発見はＤＮＡを成体動物の特異的組織にデリバリするためのこのシステムの融通性を強調している。
序論
気道への遺伝子転移の幾つかの方法は、機能性遺伝子をインヴィヴォで細胞に導入するように開発された。しかし、これらの方法の多くは特異性が不足しており、細胞毒がある。複製欠失の組み換えアデノウイルスを使用してリポーター遺伝子を、種々の動物モデルの呼吸上皮細胞にデリバリしてきた。しかし、アデノウイルスを用いた治療の生理学的効果は良く理解されておらず、最近の証拠は高ウイルス力価で投与された第１世代のアデノウイルスベクターは肺の中に実質的な炎症性応答を生じることを示唆している。またリポソームを使用して、機能性遺伝子を気道上皮に転移させたが、この方法は一般に細胞には毒性があり、特異性が不足していた。
受容体媒介遺伝子転移は、非感染性の非毒性のベクターを用いてＤＮＡを特異的標的細胞にデリバリするための方法を提供することができる。この遺伝子転移の形態は、かなりの大きさのＤＮＡプラスミドで特異的に組織を標的にし、トランスジーンだけでなく、プロモーターおよびエンハンサー要素のデリバリを可能にする。受容体媒介系の場合には、外性ＤＮＡのデリバリは、ＤＮＡ－キャリヤコンプレックスの安定性、標的の細胞の表面の特異的受容体の存在と数、受容体－リガンド親和力および相互作用、およびコンプレックスの有効なインターナリゼーションに依存している。さらに、転移した遺伝子の発現はエンドソーム小嚢からの回避および標的細胞核へのトラフィッキングに依存する。受容体媒介エンドサトーシスの活用によってデリバリされる全動物のトランスジーン発現の持続時間は一般に一次的であり、治療後７２時間以内にもとの水準に戻る。これは、アデノウイルス－ポリリシンおよびトランスフェリン－アデノウイルス－ポリリシンベクターを使用して、気管内経路を経て気道上皮細胞に導入されるリポーター遺伝子のためのケースであった。
多因子の免疫グロブリン受容体（ｐＩｇＲ）を標的にするヒト気管上皮細胞の一次培養が、受容体を運ぶ細胞に特異的にトランスジーンを有効デリバリさせることをわれわれは示した。この多因子の免疫グロブリン受容体は、気道上皮および粘膜下組織の腺細胞を含め

て、粘膜上皮細胞にのみ発現し、大きい分子のインターナリゼーションおよび非分解性の転移に特異的に採用される。この報告で、われわれはインヴィヴォでの多因子免疫グロブリン受容体を標的にすると、トランスフェクション６日後に最大である受容体を運ぶ細胞を含む組織中のトランスジーンの発現となることを示す。

方法論

材料。ＤＮＡ修飾酵素、ヌクレオチド、および５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－ガラクトピラノシドをベーリンガーマンハイム（インジアナポリス、インジアナ、ＵＳＡ）から購入した。ルシフェラーゼアッセイシステムはプロメガ（マジソン、ウイスコンシン、ＵＳＡ）から入手した。プロテインＡ　ＭＡＰＳ　アガロースカラムはビオラド（リッチンド、カリフォルニア、ＵＳＡ）から購入した。パパインとポリ（Ｌ－リシン）はシグマケミカル社（セントルイス、ミズーリー、ＵＳＡ）から入手し、Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロプリオネートはピエルスケミカル社（ロックフォルド、イリノイス、ＵＳＡ）から入手した。マウスモノクローナル抗ヒトインターロイキン２受容体抗体はダココーポレイションから入手した。（カーペンテリア、カリフォニルニア、ＵＳＡ）、そしてフルオレセインイソチオシアネート標識二次ヤギ抗マウス抗体はシグマイムノケミカルス（セントルイス、ミズーリー、ＵＳＡ）から入手した。イムノパーオキシダーゼ染色法に使用したベクダステインＡＢＣ法は、ベクターラボラトリーズ（バーリンガム、カリフォルニア、ＵＳＡ）から入手した。全培養基、血清、抗生物質はギブコラボラトリーズ（グランドアイランド、ニューヨーク、ＵＳＡ）から入手した。

Ｆａｂ断片の調製。ラット分泌成分で免疫させたラビットから導いた抗体の単離とパパイン消化は先に述べた。簡単に言うと、ポリクローナル抗体をラビット血清から、製造元が記載しているようなプロテインＡ　ＭＡＰＳアガロースカラムを用いて単離した。単離した免疫グロブリンＧ（２ｍｇ）を２０μｇのパパインで１２時間３７℃で、１００ｍＭの酢酸ナトリウム（ｐＨ５．５）、５０ｍＭのシステイン、および１ｍＭのＥＤＴＡの存在で処理した。Ｆａｂ断片を無傷の抗体およびＦｃ断片からプロテインＡカラムクロマトグラフィーによって分離した。無関係のＦａｂ（ＩＦａｂ）は免疫前のラビット血清からＩｇＧのパパイン分解によって生成した。

Ｆａｂ－ポリリシン結合体の調製。ヘテロ二価架橋試薬Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロプリオネート（ＳＰＤＰ）を用いて、抗－ｐＩｇＲ免疫グロブリンＧのＦａｂ断片をポリ（Ｌ－リシン）（M_r １０，０００Ｄａ）に共有結合した。Ｆａｂ断片は０．１Ｍリン酸塩緩衝食塩水（ＰＢＳ）、ｐＨ７．５中で２２℃で６０分間、７５倍モル過剰のＳＰＤＰでインキュベーションした。２－ピリジルジスルフィド構造をＦａｂ断片に導入した後、未反応のＳＰＤＰおよび低分子量の反応生成物を透析によって除去した。修飾したＦａｂ断片のジスルフィド橋を２５ｍＭのジチオトレイトールで開裂させた。ポリ（Ｌ－リシン）とＳＰＤＰの両方を１５倍モル過剰で修飾Ｆａｂ断片に添加し、反応を２２℃で２４時間行った。結合体を透析して、低分子量の反応生成物を除去し、得られた蛋白質を０．１％ＳＤＳ－７．５％ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離して分析した。先に述べたように、結合体の分析は、ゆっくり移動した蛋白質が大きさが２００ｋＤａよりも大きい蛋白質に相当することを示した。

リポーター遺伝子とプラスミド調製。発現プラスミドｐＧＥＭｌｕｃはＰ．ｐｙｒａｌｉｓルシフェラーゼ遺伝子に結合したＳＶ４０ウイルスプロモーターを含んでいた。プラスミドｐＣＭＶＺおよびｐＣＭＶＩＬ２ｒは、それぞれ、Ｅ．ｃｏｌｉ　ｌａｃＺに結合したサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーターおよびインターロイキン２受容体遺伝子からなり、リポーター遺伝子として使用した。ルシフェラーゼ活性を研究するために、これらのプラスミドを無関係のＤＮＡ（ＩＤＮＡ）コントロールとして使用した。プラスミドはＥ．ｃｏｌｉ　ＤＨ５ａで生長させ、抽出し、標準技法で精製した。制限エンドヌクレアーゼでのプラスミドの分解は適当な大きさの断片を生成し、純度は１．０％アガロースゲル電気泳動によって立証した。プラスミドの大きさは次のようである：ｐＧＥＭｌｕｃ，６．０；ｐＣＭＶｌａｃＺ，１０．９；およびｐＣＭＶＩＬ２ｒ，５．４ｋＢ。バク

テリヤゲノムＤＮＡおよびＲＮＡでの汚染はプラスミド調製で存在しなかった。
Ｆａｂ－ポリリシン－ＤＮＡコンプレックスの調製。キャリヤ－ＤＮＡコンプレックスは先に述べた方法を用いて生成した。
動物：抗ラット分泌成分Ｆａｂ抗体－ポリリシンキャリヤを使用してリポーター遺伝子を無傷の動物の気道および肝臓に移した。体重が約２５０ｇの成体の雄のスプラグ・ドーリイラットに麻酔をかけた。無菌技法を用いて、キャリヤに結合した発現プラスミド３００μｇを含む溶液０．３ないし０．６ｍｌを尾部の大静脈に注射した。コンプレックスの注入後数回に分けて殺し、種々の器官を分析用に除いた。キャリヤに結合した無関係のプラスミド、または無関係のＦａｂ断片で作ったキャリヤに結合した発現プラスミドからなるコンプレックスを使用して動物の模擬トランスフェクションを、並行して行った。動物研究プロトコルを検討してケース　ウェスタンェリザーブ　ユニバシティ　インスチチューショナル　アニマル　ケア　コミッティによって承認された。
β－ガラクトシダーゼ活性の細胞化学アッセイ：組織中のβ－ガラクトシダーゼを発現する各細胞を先に述べた５－ブロモ－４－クロロ－３－インドイル－β－ガラクトピラノシド（Ｘ－ｇａｌ）と用いるインキュベーションにより同定した。簡単に述べると、細胞を１０分間ＰＢＳ中の０．５％グルタルアルデヒド溶液で固定し、２回ＰＢＳ、ｐＨ７．５で洗浄し、次に０．５％Ｘ－ｇａｌ、５ｍＭのポタシウムフェリシアネート、５ｍＭのポタシウムフェロシアネート、および１ｍＭの塩化マグネシウムを燐酸塩緩衝液食塩水（ｐＨ７．４）中からなる溶液で４時間、３７℃でインキュベーションした。染色した組織を２％パラホルムアルデヒド／０．５％グルタルアルデヒドのＰＢＳ溶液に終夜４℃に固定し、標準法によりパラフィンを埋め込み５μｍの切片に切断した。切片を核ファーストレッドで対比染色した。青色着色細胞を光学顕微鏡で同定した。最少の１００細胞を数えてβ－ガラクトシダーゼを発現する切片に対する細胞の割合を決定した。さらに隣接す切片を標準プロトコルを用いてエルシァンブルー／過ヨウ素酸シッフまたはヘマトキシロン／エオシンで染色した。
ルシフェラーゼ活性のアッセイ：培養基の細胞を収集し、溶菌し、先に述べたようにルシフェラーゼ活性を分析した。動物を殺して後、組織をトランスフェクションしたラットおよびコントロールラットから収集した、そしてそのまま冷ＰＢＳ、ｐＨ７．５で５分間潅流した。組織を溶菌緩衝液に均質化し、２２℃で１０分間インキュベーションした。細胞溶菌液を続いて５分間４℃で遠心分離し、蛋白質抽出物をルシフェラーゼ活性について分析した。溶菌液を、蛋白質含量についてアッセイし、測定した積算した光単位（１０秒間隔）を全蛋白質含量に対して標準化した。全測定値は３回行い平均値で表した。
インターロイキン２受容体の免疫組織化学染色。プラスミドｐＣＭＶＺでトランスフェクションした組織のトランスジーンの発現を間接免疫螢光法で測定した。種々の組織の凍らせた切片をアセトンで１０分間－２０℃で固定し、１０分間２２℃で処理し自己螢光を減少させた。次に切片をＰＢＳ、ｐＨ７．５の１０％ヤギ血清で１時間室温でインキュベーションした。細胞は連続してマウスモノクローナル抗－インターロイキン２受容体抗体およびフルオレセインイソチオシアネート結合ヤギ抗－マウスＩｇＧでインキュベーションした。両方の抗体をＰＢＳ中１：１００に希釈し、各インキュベーションの間に、細胞を３回、５分間ＰＢＳ、ｐＨ７．５で洗浄した。染色した細胞を螢光顕微鏡で調べた。
結果
抗－分泌成分Ｆａｂ抗体－ポリリシンキャリヤを用いるインヴィヴォトランスフェクション
抗－ラット分泌成分Ｆａｂ抗体－ポリリシンキャリヤ－ＤＮＡコンプレックスを注射した全動物が生存した。ルシフェラーゼアッセイは肝臓、肺、脾臓、および心臓から抽出した組織ホモジネート中のコンプレックスを４８時間注入して行った。トランスフェクションした動物から得られた肝臓と肺からの蛋白質抽出物のトランスジーン発現の有意な水準を観察した。ルシフェラーゼ活性はｐＩｇＲを発現しない組織の脾臓および心臓には発見されなかった。さらに、キャリヤに結合した無関係のプラスミド（ｐＣＭＶｌａｃＺ）からなるコンプレックスまたは無関係のＦａｂ断片に基づくキャリヤに結合した発現プラスミ

ド（ｐＧＥＭｌｕｃ）で処理した動物は、どの組織を調べても有意のルシフェラーゼ活性を示さなかった。従って、ｐＩｇＲを運ぶ細胞を含む組織のみが、トランスフェクションされ、トランスフェクションは無関係のＦａｂ抗体に基づくコンプレックスを非特異的に取り込むことに帰することができない。

４組織から導いた蛋白質抽出物のルシフェラーゼ活性を、コンプレックスの注射後の異なる時点で測定した転移遺伝子の発現の時間経過が明らかになった。ｐＩｇＲをもつ組織の肝臓および肺中に持続したルシフェラーゼ活性は、それぞれ注射後４日ないし６日に、蛋白質抽出物ミリグラムにつき、最大値１３７９５±４４３１および４６１４０２±２３００７８の積算光単位（ＩＬＵ）に達した。受容体を発現できなかった組織は有意のトランスジーン発現を持たなかった。トランスジーン発現の細胞分布は種々の組織の切片で試験した。ｐＣＭＶｌａｃＺを含むコンプレックスを注射した３日後に、気管、肺、および肝臓の組織切片はｂ－ガラクトシダーゼ活性の細胞化学染色を示した。コンプレックスで処理した動物は、コントロールとして供給された無関係のプラスミド（ｐＣＭＶＩＬ２ｒ）を使用して作った。気管での発現は、上皮表面に並ぶ細胞に制限された。β－ガラクトシダーゼ活性は模擬トランスフェクション動物からの気管切片に検出されなかった。トランスジーンの発現は変わりやすく、青色に染色した細胞の５０％以上が呼吸器上皮の領域にあった。一般に、気管上皮細胞の１０～２０％の範囲で発現した。気道の近接切片のアルシャンブルー／過ヨウ素酸シッフ染色に基づいて、繊毛のあるそして分泌性の（杯状）呼吸上皮細胞はβ－ガラクトシダーゼ活性を発現した。トランスジーンからの発現は末端気道または肺胞のいずれにも、トランスフェクションまたはコントロールの動物に検出されなかった（データーは示されていない）。これは上皮細胞の分布が、そのまま免疫細胞化学染色に基づくｐＩｇＲを発現することと適合している。希有な粘膜下組織腺は気管切片にあり、かすかな青色染色のみを示した。炎症性の反応は、非－、模擬－、およびトランスフェクションした動物からの気管切片のどれにも見られなかった。さらに、ヒトインターロイキン２受容体に向けたマウスモノクローナル抗体、インヴィトロで呼吸器上皮細胞の形質導入のリポーターとして使用されたがこれらの細胞中では自然には発現されない表面蛋白質を、プラスミドｐＣＭＶＩＬ２ｒでトランスフェクションした動物の気管中のトランスジーン生成物の免疫螢光局在化に使用した。気管の連続切片は螢光の存在を調べ、トランスフェクションした動物からの多くの呼吸器上皮細胞の先端膜は適当に染色した。ｐＣＭＶｌａｃＺで模擬トランスフェクションした動物の気道上皮には特定の螢光染色は検出されなかった。希有な青色染色肝細胞もまたトランスフェクションした動物の肝臓切片に見出された。トランスジーン発現は非－または模擬－トランスフェクションラットのいずれからの肝臓にも検出されなかった。

討論

ポリ（Ｌ－リシン）に結合し、プラスミドＤＮＡに非共有的に結合したラット多因子の免疫グロブリン受容体に向けた免疫グロブリンＧのＦａｂ断片からなる目標コンプレックスの注入に続いて、インヴィヴォでの気道上皮へのリポーター遺伝子の転移に成功したことを我々は報告する。この技法は特異的にトランスジーンを肝臓および肺にデリバリして組織中の受容体が発現される。脾臓および心臓のように、受容体を発現しない他の組織は、トランスフェクションされなかった。さらに、無関係のＦａｂ断片で調製した結合体の次の注入では、発現は検出されず、無関係のリポーター遺伝子を含むプラスミドで調製したコンプレックスもルシフェラーゼ活性を検出することができなかった。従って、このコンプレックスは受容体を運ぶ組織を特異的に標的として、受容体の自然のリガンドの通常のトラフィッキングは、インヴィヴォでのトランスジーンの取り込みを妨害しない。

現在入手できる呼吸管への遺伝子転移のための戦略の多くは、呼吸上皮細胞を特異的に標的にしないウイルスベクターに依存しており、気道を標的にするデリバリの気管内経路に依存している。気管内点滴注入もまた、気道上皮に対して、リポソームおよびアデノウイルス－トランスフェリン－ポリシンのような、他の手段によって特異的に遺伝子転移に向けるように使用されてきた。カチオンリポソームに結合したＤＮＡの組織デリバリはは、選択的ではなく、機能性遺伝子を異なる組織中の多数の細胞タイプに移す。ｐＩｇＲを運

ぶ細胞のための受容体媒介遺伝子転移の特異性は、嚢胞性繊維症の患者の気道中の欠陥のある細胞を標的にする際に有用である。

実施例４

家族性過コレステリン血症（ＦＨ）は電撃様のアテローム性動脈硬化症および心臓欠陥症に特徴のあるヒト遺伝病である。低密度リポ蛋白質（ＬＤＬ）の取り込みを媒介する受容体のための遺伝子の突然変異は、この病気の原因である。５００人に１人はＦＨの原因であるＬＤＬ受容体遺伝子中の突然変異体に異型接合性がある。その結果、ＬＤＬは正常割合の３分の２のみが血漿から除かれる。４０ないし５０年の寿命で、血漿中高水準のＬＤＬがこれらの患者の症候的なアテローム性動脈硬化症の原因である。ＦＨ－同型接合体（百万人に１人）は、突然変異体によって影響される蛋白質のドメインに依存して、ＬＤＬ受容体が殆どないかまたは機能しない。これは２０才前の症候的な冠動脈アテローム性動脈硬化症となる。胆汁酸結合レジンおよびコレステロール合成のインヒビターによる治療は、単一の正常遺伝子からのＬＤＬ受容体の生産を刺激することによって異型接合性ＦＨ患者にかなり成功している。ＦＨ同型接合体では薬物治療に反応しない。刺激できる正常遺伝子がないため、突然変異させた遺伝子の置換が、同型接合性ＦＨ患者の治療のための唯一可能なアプローチである。肝臓はＬＤＬ異化作用に応答する主器官であるから、病気の治療に取り入れられる２つのアプローチがこの器官を標的にする：肝臓移植および遺伝子治療である。正常肝臓をＦＨをもつ患者に移植すると脂肪過剰血症を癒すが、肝臓ＬＤＬ受容体の再構成が表現型の改善に十分であることを示唆している。この結果に基づいて、ＦＨの治療に遺伝子療法を使用して行われるアプローチが肝細胞を標的にしてきた。

病気のメカニズムを理解するために、生物体内のコレステロールの代謝／最終結果に気付く必要がある。各細胞は血漿膜の合成にコレステロールを必要とする。副腎および卵巣中の黄体は、さらに、ステロイドホルモンを合成するためにコレステロールを必要とする。肝臓は胆汁酸の生成のために最も高く要求する器官である。コレステロールは、血液中の内生コレステロールの主キャリヤである低密度リポ蛋白質（ＬＤＬ）の受容体媒介取り込み、または生合成によって周辺組織から得られる。ＨＭＧ　ＣｏＡリダクターゼは経路中の割合を決定する酵素である。食餌のコレステロールは、肝臓中の特異的受容体によって取り込まれるキロミクロン粒子によって血流に運ばれる。コレステロールをもつ異なる組織を用意するために、肝臓は、トリグリセリド、コレステリルエステルおよびアポ蛋白質Ｃ、ＥおよびＢ－１００からなる非常に低密度のリポ蛋白質（ＶＬＤＬ）粒子を分泌する。脂肪組織および筋肉によるＶＬＤＬからのトリグリセリドの取り込みは、これらの粒子を中間密度リポ蛋白質（ＩＤＬ）に変える。ＬＤＬ受容体は肝臓および副腎に高濃度で存在するが他の組織にも存在し、ＩＤＬのアポＥおよびアポＢ－１００を認識する。従って、正常の状態では、ＬＤＬはＬＤＬ受容体媒介取り込みによって血流から大部分一掃される。残っているＩＤＬはＬＤＬに代わり、同様にアポＢ－１００を認識するＬＤＬ受容体によって取り出される。器官からコレステロールの一掃は肝臓で行われ、胆汁酸に代わり、消化管に分泌される。大部分のコレステロールは肝臓の再利用のために末端回腸に再吸収されるが、この経路は出口経路を提供する。従って、血液からＩＤＬおＬＤＬを一掃できない非機能性ＬＤＬ受容体の存在は、血清ＬＤＬ、従って、全血清コレステロールの水準を高めることになる。これは動脈壁のコレステロール沈着、従ってアテローム性動脈硬化症の原因となる。

ワタナベ遺伝性脂肪過剰血症（ＷＨＨＬ）ラビットを先に使用してコレステロール過剰血症を癒す際の遺伝子治療技法の有効性を研究した。ＦＨ患者に見られる突然変異の１クラスに似ているＬＤＬ受容体のリガンド結合ドメインの１２個のヌクレオチド組織内欠失は、ＦＨのそれと並行している症状、展開および組織変化となる。

材料および方法

ＤＮＡプラスミドの構築

この研究で使用されるプラスミドＤＮＡはｐＬＤＬＲ－１７、ＰＣＫ－ｈＬＤＬＲ、ＰＣＫ－ｒＬＤＬＲおよびＳＶ４０－ルシフェラーゼである。ｐＬＤＬＲ－１７は、ドクター　ディビッド　ラッセル（テキサス大学、メディカルセンター、ダラス）によって提供さ

れ、ヒトＬＤＬ受容体ｃＤＮＡに結合したサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター／エンハンサーからなる。これはヒトＬＤＬ受容体ｃＤＮＡに結合したアルファルファ・モザイク・ウイルス４（ＡＭＶ４）ＲＮＡの５’非翻訳領域（ＵＴＲ）に対応するＤＮＡの断片を含む。この配列は蛋白質合成の開始因子の必要性を減らすことによって翻訳エンハンサーとして働く。ＰＣＫ－ｈＬＤＬＲプラスミドはｐＬＤＬＲ－１７からのｈＬＤＬ受容体ＤＮＡを、ホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼ（ＰＥＰＣＫ）プロモーター（－４６０ないし＋７３）および、サルのウイルス４０（ＳＶ４０）小Ｔ抗原からのイントロンおよびポリアデニル化信号を含むｐＴＺ１８Ｒベクターにサブクローニングすることによって構築された。２段階方法では、ｈＬＤＬ受容体ｃＤＮＡは、ｐＬＤＬＲ－１７からのＳａｃＩとＳｍａＩで切除しＴ４ＤＮＡポリメラーゼを使用して鈍くした。ブルント（ｂｌｕｎｔ）した断片をｐＴＺ１８ＲベクターのＨｉｎｃＩＩ部位にサブクローニングした。次にｃＤＮＡをＸｂａＩとＳａｌＩで切除し、ｐＴＺ１８Ｒ－ＰＥＰＣＫプロモーター－ＳＶ４０ポリＡプラスミドの相同部位に導入した。ｐＰＣＫ－ｒＬＤＬＲを構築するためにラビットＬＤＬ受容体ｃＤＮＡを含むｐｒＬＤＬＲ－９からのＥｃｏＲＩ－ＥｃｏＲＩ断片（ドクター　ジェイムス　ウィルソン、ペンシルベニア大学）をｐブルースクリプト（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）のＥｃｏＲＩ部位にサブクローニングした。この構築物をＳａｃＩで消化しブルントし次いでＸｂａＩで消化し、ＰＥＰＣＫプロモーター（－４６０ないし＋７３）およびＳＶ４０小Ｔ抗原からのイントロンおよびポリアデニル化信号を含むｐＴＺ１８ＲベクターのＸｂａＩ－ブルントＨｉｎｄＩＩＩ部位に指向的にサブクローニングした。ＳＶ４０－ルシフェラーゼプラスミド（プロメガ）はＳＶ４０ウイルスプロモーターおよび、ｐＵＣベクター（ファーマシア）に挿入したＰ．ｐｙｒａｌｉｓルシフェラーゼ遺伝子に結合したＳＶ４０ウイルスプロモーターとエンハンサーを含む。

ポリ－Ｌ－リシン－ＤＮＡコンプレックスの生成

ガラクトシル化ポリ－Ｌ－リシンの生成。ポリ－Ｌ－リシンは上記のようにガラクトシル化した（ＰＮＡＳ）。２ｍｇのポリ－Ｌ－リシン－ＨＢＲ（シグマＰ－７８０、平均鎖長、１００）を８５ｍｇのａ－Ｄ－ガラクトピラノシルフェニル－イソチオシアネート（シグマＧ－３２６６）と反応させた。溶液に１／１０容量の１Ｍ炭酸ナトリウムｐＨ９を添加してｐＨ９に調整した。チューブをアルミ箔で遮光し、１６時間室温で混合し、次にスペクトラ－プロ透析チュービングを用いて（３５００Ｍ．Ｗ．カットオフ）緩衝液を何回も変えて（１日４回）２日間５００ｍｌの５ｍＭ　ＮａＣｌで透析した。反応物は化学量論量であり、溶液中に存在する０．８ないし１％のNH_3基をガラクトシル化している。

ＤＮＡの凝縮のための基本プロトコル。プラスミドＤＮＡを標準技法を使用して調製した。１ｍＭのＥＤＴＡを含む１０ｍＭトリス－ＨＣｌ、ｐＨ８．０にＤＮＡを懸濁させ、ＤＮＡ濃度を分光光度計で測定した。ＤＮＡの調製は２回ＲＮＡｓｅ　Ａ＋Ｔ１で処理した。この工程はＲＮＡが溶液中に存在しないことを確認する（ＲＮＡはポリ－Ｌ－リシンによってＤＮＡの凝縮を示す）。高濃度のＤＮＡ（１．５－２ｍｇ／ｍｌ）をさらに次の工程に使用した。ＤＮＡ凝縮のための代表的なプロトコルは次の通りである：

ａ）２００ｍｌの０．７５Ｍ　ＮａＣｌ（５Ｍ　ＮａＣｌ溶液から添加した）中に３００ｍｇのＤＮＡを、ＶＩＢＲＡＸ装置（ＩＫＡ－ＶＩＢＲＡＸ－ＶＸＲ）を使用して中間速度で渦巻攪拌する。この工程には高塩溶液中のＤＮＡポリマーの有効な長さを増加して、ＤＮＡ中心軸にポリ－Ｌ－リシン部分を有効に結合させる必要がある。

ｂ）２００ｍｌの０．７５Ｍ　ＮａＣｌ（５Ｍ　ＮａＣｌ溶液から添加した）中に１２０ｍｇのポリ－Ｌ－リシンまたはガラクトシル化ポリ－Ｌ－リシン（平均鎖長１００）を、５μｌのアリコートで３０分ないし１時間かけて滴加した。この量は１ＤＮＡ　PO_4^-基対１キャリヤNH_3^+基のモル比に言い換えられる。

ｃ）溶液はプロセスの終りには濁る。５Ｍ　ＮａＣｌの３μｌのアリコートを一滴ずつ攪拌溶液に濁りが目視で見えなくなるまで添加する。この工程はゆっくりと、５Ｍ　ＮａＣｌの各新しいアリコートを添加する間６０秒間である。次に溶液を円偏光二色分光器モニタリングにかける。また、ＤＮＡ／ポリ－Ｌ－リシンコンプレックス溶液はＪＥＯＬ－１

００Ｃ電子顕微鏡を用いて分析した。凝縮工程は、ＤＮＡコンプレックスの診断スペクトルが観察されるときに完了し、さらにＥＭによって確認する。同じ濃度のヌクレオチドで同じプラスミドＤＮＡにあるＤＮＡコンプレックスを次に調製するために、ＣＤでモニターしないでプロトコルを続けることができる。異なる濃度のＤＮＡまたは異なるプラスミドを使用するときは、ＣＤモニタリングを繰り返す必要がある。

動物

６匹の成体雄ラビット（２．８－３．２ｋｇの体重）をこれらの研究に使用した。これらの動物はナショナル・インスチチュート・オブ・ヘルスで確立したコロニイから購入した。ＤＮＡコンプレックスを動物に入れるため、ラビットの末端耳静脈に３－１０ｍｌのＤＮＡコンプレックス溶液（～４００－９００ｍＭ　ＮａＣｌ）を１回注射した。約１．５ｍｌの血液を４ｐ．ｍ．に耳動脈から取り出した。血清コレステロールの濃度の測定は、３００μｌの血清からクレベランド大学病院の臨床実験室で行った。ＤＮＡコンプレックスを導入した後、異なる時間に、ラビットを肝臓バイオプシーに委ねた。肝臓試料から全ＤＮＡを単離しＰＣＲ増幅を行い転移したＤＮＡの存在を検出した。ラビット＃７７４はロバスタチン（Ｍｅｖａｃｏｒｐ　Ｍｅｒｃｋ　ａｎｄ　Ｄｏｈｍｅ）で経口により１日１０ｍｇ投与して処理した。

ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）増幅

処理した動物の肝臓中に転移したＤＮＡの存在を検出するため、全ＤＮＡをバイオプシーの際に得られた肝臓試料から単離した。ラビット＃７３７の場合に、関係するＤＮＡを次に、ＰＥＰＣＫ遺伝子の５’ＵＴＲのエキソン１の部位３２－５０に相当する上流プライマーおよび、ヒトＬＤＬ受容体ｃＤＮＡのヌクレオチド５８９－６０７に相補てきな下流プライマーを使用して、ＰＣＲによって増幅した。増幅した断片は、３２Ｐ－ｄＣＴＰで標識を付けたヒトＬＤＬ受容体ｃＤＮＡに相当する７００ｂｐ断片でのハイブリッド形成の際の１１００ｂｐバンドに相当する。キメラＣＭＶ－ｈＬＤＬに相当する適当なプライマーは、ラビット＃７７４から得られた肝臓組織からの転移プラスミドのＰＣＲ増幅に使用される。

ＥＬＩＳＡ

新しく調製したガラクトシル化－ポリ－Ｌ－リシン／ＤＮＡコンプレックス、プラスミドＤＮＡまたはガラクトシル化－ポリ－Ｌ－リシンのいずれかのＤＮＡ１μｇに相当する７５μｇのアリコートを、９６ウェルミクロタイタープレートの各ウェルを被覆して終夜４℃でインキュベーションした。次の日、ウェルを３回リン酸塩緩衝食塩水（ＰＢＳ）で洗浄し、次いで２時間３７℃でＰＢＳ中の５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）でブロッキングして３回ＰＢＳ中の１％ＢＳＡおよび０．５％Ｔｗｅｅｎ－２０を含む洗浄緩衝液で洗浄した。１：３および１：３０の希釈率でＤＮＡコンプレックスを繰り返し投与する前および後の異なる時点で得られたラビット＃７７４から得られた７５μｌの血清を、ウェルに添加し、３７℃で９０分間インキュベーションした。次にウェルを緩衝液で洗浄し、１：３０００の希釈率で二次抗体を用いてインキュベーションした。二次抗体はアルカリ性ホスファターゼ（シグマ）に結合したラビット免疫グロブリンに対してマウスモノクローナル抗体からなる。洗浄緩衝液での最後の洗浄の後に、グリシン緩衝液中の１ｍｇ／ｍｌでのｐＮＰＰ基質をウェルに添加し、反応物を現像し４１０ｎｍでの分光光度計の読み取りをＤｙｎａｔｅｃｈ自動化ＥＬＩＳＡリーダーで行った。１２０分に読み取った数値を比較のために選択した。

結果

１．ラビット＃６７６：キメラＰＣＫ－ｈＬＤＬＲ遺伝子３ｍｇを含むポリ－Ｌ－リシン／ＤＮＡコンプレックスの注入

第１組の実験では、われわれわの実験室で開発した技法を使用してガラクトシル化ポリ－Ｌ－リシンで３ｍｇおよび９ｍｇのｐＰＣＫ－ｈＬＤＬＲを凝縮し、それらをワタナベラビットの末梢循環系に注射した。

ラットからのホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼ（ＰＥＰＣＫ）の細胞質ゾルの形の遺伝子からのプロモーターの特徴を詳細に述べた。このプロモーターは、肝臓中で

高水準で発現され、食餌とホルモンでコントロールできるので、これらの実験で使用した。飢餓および高蛋白質、炭水化物を含まない食餌はＰＥＰＣＫ遺伝子転写を刺激するが、高炭水化物食餌はＰＥＰＣＫプロモーターからの転写を減らす。さらに、ｃＡＭＰおよびグルココルチコイドは、肝臓中のＰＥＰＣＫ遺伝子の発現を促し、インシュリンは阻害する。ＰＥＰＣＫプロモーターは従って肝臓に導入される結合構造遺伝子の制御に適しており、我々の最初の実験ではＬＤＬ受容体の肝臓発現に使用された。

最初のアプローチでは、３ｍｇのＤＮＡを含むポリ－Ｌ－リシン／ＤＮＡコンプレックスを注入した。このＤＮＡの基本用量はラットで行った先の実験に基づき決定された。図１３に示すように、ラビット＃６７６に弛緩した状態でｐＰＣＫ－ｈＬＤＬＲプラスミド３ｍｇを含むＤＮＡコンプレックス溶液を投与すると全血清コレステロール水準を有意に減少させることにはならなかった。同じＤＮＡ３ｍｇを含むほぼ凝縮したＤＮＡコンプレックスの第２の注射は、血液中のコレステロール水準を２０％減少させた。この第２の投与４週間後、コレステロールはほぼ処理前の水準に戻り、約３５日でピークに達した。

ＰＣＫ－ｈＬＤＬ受容体遺伝子の発現から得られた全血清コレステロール水準での２０％の増加は、役に立ちそうであるが、全体的にＦＨ患者の疾患を軽減しない。これらの実験への最初の接近で動物に導入した３ｍｇのＤＮＡに相当するポリ－Ｌ－リシン／ＤＮＡコンプレックスの数は、肝臓中のアシアログリコプロテイン受容体の全体の数の０．０１％を説明する。従って、ＤＮＡコンプレックスの増加する濃度とＰＣＫ－ｈＬＤＬ受容体遺伝子の発現との間に直線の相関関係が期待される。

２．ラビット＃７３７：キメラＰＣＫ－ｈＬＤＬＲ遺伝子９ｍｇを含むポリ－Ｌ－リシン／ＤＮＡコンプレックスの注入

第２の実験において、ガラクトシル化ポリ－Ｌ－リシンで適当に凝縮したＰＣＫ－ｈＬＤＬＲ遺伝子９ｍｇをラビット＃７３７に投与した。図１４に示すように、この処理により全血清コレステロール水準が３８％減少し約５週間続いた。従って、ＤＮＡコンプレックスの用量を３倍増加すると、全血清コレステロール水準が２倍減少することになった。

３．ラビット＃１６：ＣＭＶ－ｈＬＤＬＲ遺伝子３ｍｇを含むＤＮＡコンプレックスの注入

ＰＥＰＣＫ遺伝子の細胞ゾルの形のプロモーターはほとんど特異的に制御された形で肝臓中に発現させる利点がある。これらは生理的でも制御的でもないが、ウイルスプロモーターは構造遺伝子に高水準の発現を与える。キメラＣＭＶプロモーター／エンハンサーを使用すると遺伝子転移のためのアデノウイルスを使用してＷＨＨＬラビットの遺伝子治療に成功した。最近、コザルスキイらは、ＣＭＶプロモーター／エンハンサーおよびキメラβ－アクチン／ＣＭＶプロモーターは、アデノウイルス感染を使用してＷＨＨＬラビットに転移させたヒトＬＤＬ受容体遺伝子を高発現させるために選択したプロモーターであることを報告した。これらの考察に基づき、われわれはＷＨＨＬラビットの肝臓におけるヒトＬＤＬ受容体遺伝子の発現水準を増加させるためにキメラＣＭＶ－ｈＬＤＬ遺伝子を注入した。

キメラＣＭＶ－ｈＬＤＬ受容体遺伝子３ｍｇを含むＤＮＡコンプレックスをラビット＃１６に注射すると、全血清コレステロール水準が最大減少３０％となった（図１５）。注射して１１週間後にコレステロール水準は未だ処理前に観察されたものよりも２０％低い。

４．ラビット＃７７５：ｐＣＭＶ－ｈＬＤＬＲ３ｍｇを含むＤＮＡコンプレックスを繰り返し投与

ＤＮＡコンプレックス溶液に含まれた３ｍｇのｐＣＭＶ－ｈＬＤＬＲをラビット＃７７５に注射して、処理３週間後に血液中のコレステロールの濃度を最大２４％減少させた（図１６Ａ）

肝細胞の寿命は約１０８－１５０日であることが報告されており、従って導入したＤＮＡの持続性は限られている。さらに、より大きい治療効果はＤＮＡを一回注入した後に関係する。従って、肝臓中のＬＤＬ受容体の適当な水準を確保するため数回患者に注射する必要がある。同じ動物に数回ＤＮＡコンプレックスを注射する効果を試験した。ラビット＃７７５に３週間の間隔で３ｍｇのｐＣＭＶ－ｈＬＤＬＲ　ＤＮＡコンプレックスを２回注

射した。コンプレックスを繰り返し投与しても、全血清コレステロール水準をさらに有意に減少することはなかった。

５．ラビット＃７７４：ｐＣＭＶ－ｈＬＤＬＲ３ｍｇを含むＤＮＡコンプレックスを繰り返し投与

ラビット＃７７４にｐＣＭＶ－ｈＬＤＬＲコンプレックスを３ｍｇ注射した。た。血液中のコレステロール水準の３６％減少を観察した。２週間毎に１回、同量のＤＮＡコンプレックスを４回注射した。そのうちの２回は、全血清コレステロール水準の減少はゼロであった。しかし、ｐＣＭＶ－ｈＬＤＬＲ３ｍｇを含むＤＮＡコンプレックス溶液を５回投与した後に、コレステロールの濃度は処理前の水準に対して約４８％減少した。

６．ラビット＃７７４へのロバスタチンの投与：コレステロールの内生合成の抑制

序論で述べたように、細胞内のコレステロール合成のための経路がある。ヒトＬＤＬＤＮＡによる取り込みによってコレステロールを肝細胞が供給されるときにもこの代謝経路を抑制できないので、多分さらにコレステロールのクリアランスを阻止できるだろう。ロバスタチンはＨＭＧ　ＣｏＡレダクターゼの既知のインヒビター、コレステロール合成の律速酵素である。従って、ＤＮＡコンプレックスを繰り返し注射したラビットをこの薬剤で処理して、コレステロール合成が全血清コレステロール水準を更に減少することを制限する因子であるかどうかを示す必要がある。ラビット＃７７４は１０週間１日につき１０ｍｇのロバスタインで処理した。さらに２０％のコレステロール水準の減少が観察された。内生経路のコレステロール合成への阻害は従って最初の遺伝子転移前のそれの４０％まで、ラビット＃７７４のコレステロール濃度をもたらした。

７．無関係のＤＮＡを含むＤＮＡコンプレックスの注入

高ＮａＣｌ濃度（～９００ｍＭ）の溶液中のガラクトシル化ポリ－Ｌ－リシン／ＤＮＡコンプレックスをラビットに注射することにより全血清コレステロール水準を人工的に減少させるために、ルシフェラーゼ遺伝子のような無関係のＤＮＡを含むＤＮＡコンプレックス溶液をラビット＃７７５に投与した。図１７は注入が血清コレステロール濃度の非有意（≦１２％）および一時的（≦５日）の減少となることを示す。さらに、またＰＣＫ－ｈＬＤＬＲ遺伝子を符号化する不適当に凝縮したＤＮＡコンプレックスを注射した。同様に血液中のコレステロール水準はゼロまたは最少および一時的減少となる。従って、ヒトＬＤＬ受容体遺伝子を符号化する適当に凝縮したＤＮＡ粒子を注入した後、全血清コレステロール水準の減少は、高濃度のＮａＣｌ溶液またはガラクトシル化ポリ－Ｌ－リシン／ＤＮＡ粒子の存在の結果ではないことを確認した。

８．ラビット＃７７４の肝臓中での転移ＤＮＡの検出

このプロジェクトに使用したＤＮＡコンプレックスを、リガンドとしてガラクトースを使用して肝臓アシアログリコプロテイン受容体に標的にする。マクロファージは、血液から１５ｎｍよりも大きいガラクトシル化粒子を一掃することができる類似の受容体をもつことが知られている。

ヒトＬＤＬ受容体ＤＮＡが肝細胞に送られることを証明するために、ラビット＃７３７で３ｍｇのＰＥＰＣＫ－ｈＬＤＬ受容体遺伝子を注入した６０日後に肝臓パイオプシーを行った。全ＤＮＡを単離し、注射しなかったラビットの肝臓からの全ＤＮＡと共に、上記プライマーでＰＣＲ増幅をした。期待された１，１００ｂｐのバンドが処理したラビットに対応するレーンに検出されたが、処理しなかった動物には検出されなかった。

９．ポリ－Ｌ－リシン／ＤＮＡコンプレックスを繰り返し投与した後のラビット＃７７４の免疫反応の評価

遺伝子治療の分野で、デリバリビヒクルの免疫原性が関係することが多い。レトロウイルスベクターは免疫系によって検出を逃れることができるが、アデノウイルスベクターはできないことが報告されている。ヒトＬＤＬ受容体遺伝子のワタナベラビットに転移するためのアデノウイルス粒子の二次投与の成功は、ウイルス蛋白質に対する免疫反応の開始によって阻まれた（ＲＥＦコザルスキイ）。

受容体媒介遺伝子転移のためのシステムはその免疫原性に関して深くは研究されていない。アシアロオロソムコイド－ポリ－Ｌ－リシン／ＤＮＡコンプレックスをマウスに繰り返

し投与した後に、コンプレックスのアシアロオロソムコイドとポリ－Ｌ－リシン成分に対して抗体を中和するがＤＮＡに対しては中和しないことが１：１０００（ＲＥＦ）の希釈率で検出できる。フェルコルらも、マウスに繰り返し投与した後、Ｆａｂ断片－ポリ－Ｌ－リシンに対して１：２０００の希釈率で循環する抗体を検出したが、コンプレックスのＤＮＡ部分には検出されないことを報告した。

従って、ＤＮＡの凝縮のためにガラクトシル化－ポリ－Ｌ－リシンを使用すると、同様に免疫原性であるかどうかを試験する必要がある。このために、ガラクトシル化－ポリ－Ｌ－リシン－ＤＮＡを対して抗体の存在は、繰り返しコンプレックスを投与した前後の異なる時点で評価した。最初の実験では、１μｇのＤＮＡを含むＤＮＡコンプレックス溶液を、ミクロタイタープレートのウェルに吸収させ、次に希釈率１：３、１：３０および１：３００にて血清でインキュベーションした。結合した抗体を、アルカリ性ホスファターゼと結合した抗ラビット二次抗体で検出した。ＤＮＡコンプレックスを繰り返し投与した際のラビット＃７７４の血清には抗体の増加がある。事実、ＤＮＡコンプレックスの３回目の注入後に検出できるが、１回または２回目の後には検出できないように開始した。さらに、特に希釈率１：３と１：３０だけに検出される反応があった。

第２の実験はＤＮＡコンプレックスの部分が弱いが明らかな免疫反応を促すため応答性があるようにするために行った。次に１μｇのＤＮＡ、新しく調製した１μｇのＤＮＡを含むＤＮＡコンプレックスまたは対応する量のガラクトシル化－ポリ－Ｌ－リシンのいずれかをミクロタイタープレートのウェルに吸収させた。その結果は、ガラクトシル化－ポリ－Ｌ－リシン部分がほぼ全体的にワタナベラビット中のコンプレックスに対して免疫反応を促すことを説明している。

討論

ここに示されたデーターは本方法がＷＨＨＬラビット中の少なくとも部分的に脂肪過剰血症を癒すことができることを示唆している。

図１３－１６はヒトＬＤＬ受容体インキュベーションを含むＤＮＡコンプレックスの１回の注入がＷＨＨＬラビットの全血清コレステロール水準を有意に減少させることになることを明らかに示している。この減少はラビット＃６７６の２０％からラビット＃７３７の３８％までの範囲である。これに対して、ｐＳＶ４０－ルシフェラーゼのような関係のないプラスミドＤＮＡ（図１７）、または適当に凝縮されていないヒトＬＤＬ受容体の符号化プラスミド（図１７）を投与すると、血清コレステロールがゼロまたは無意味に減少することになる。

ヒトＬＤＬ受容体インキュベーションの発現を制御するために２個の異なるプロモーター領域を使用した。ＣＭＶ制御領域は、ラットＰＥＰＣＫインキュベーションの細胞ゾルの形でのプロモーターよりも高い水準の発現をラビットの肝臓中で与えることが仮説として示唆される。この観察はすべての種については正しくない。ラビットの肝臓中のＰＥＰＣＫ活性は、細胞ゾルのイソ酵素によって１０％だけであることが特徴である。さらに、細胞ゾルインキュベーションの刺激は２倍だけの活性誘導となる。従って、ＰＥＰＣＫプロモーターはこの種に最良の選択ではない。しかしＰＥＰＣＫ遺伝子のためのものとして生理学的にしっかりと制御されたプロモーターを使用すると、他の遺伝子病の治療のためにまたは他の種のＣＭＶとして強いがウイルス性のプロモーターを超えるものとして良くすることができる。

治療の効果の時間経過を決定するためにラビット＃６７６、＃７３７および＃１６にヒトＬＤＬ受容体遺伝子を含むＤＮＡコンプレックスを１回注入した。血液中のコレステロール水準の減少は、ラビット＃６７６では４週間、ラビット＃７３７では５週間続いた。トランスフェクションしたｐＰＥＰＣＫ－ヒト因子ＩＸ遺伝子の発現が１４０日間まで示されたラットで行った先の実験に基づき、長期の効果を期待した。種々の因子が、脂肪過剰血症の強制効果のこの早まった終結を説明することができる。ラビットは非常に免疫原性があるが、ラットはないことは良く知られている。ヒトＬＤＬ受容体遺伝子を導入した後にヒト蛋白質をＷＨＨＬラビットで合成することは、蛋白質水準で両方の種の間には８０％のホモロジーがあるが、外来蛋白質に対して免疫反応の引金となることができる。さら

に、肝細胞は寿命が限られている。ラットの幾つかの研究では肝細胞の寿命は１０８－１５０日であることを示している。この観察に基づいて、ＤＮＡコンプレックスを導入して５週間後のコレステロール水準の４０％の増加は、肝臓細胞の生理学的代謝回転からのものである。しかし、この事実は１００％の増加を説明できない。さらに、ｐＰＥＰＣＫ－ヒト因子ＩＸを注入したラットに観察された長期の発現に矛盾する。ヒトＬＤＬ受容体遺伝子の発現から得られる治療効果の早まった終結に対する別の可能な説明は、転移したＤＮＡの不活性化または分解であろう。

３ｍｇのＤＮＡで生成されるポリ－Ｌ－リシン－ＤＮＡコンプレックスの理論的な数は肝臓中のアシアログリコプロテインの全数の０．０１％を説明する。従って、ＤＮＡコンプレックスの用量の増加は治療効果を高めることになることが期待される。用量と反応の関係を研究するために、ラビット＃６７６に３ｍｇのｐＰＣＫ－ｈＬＤＬＲを、ラビット＃７３７に９ｍｇの同じＤＮＡを注入した。図１３および１４に示されるように、ＤＮＡコンプレックスの用量の３倍の増加は、コレステロール水準を２倍減少させることになる。これらのデーターは直線の関係を示さないが、用量の増加は明らかに応答性が高められたことを示す。

可能性のある薬剤としてポリ－Ｌ－リシン／ＤＮＡコンプレックスを考慮する場合、同じ動物にこれを繰り返し投与することができることが好ましい。そのために、ラビット＃７７４に２週間毎に１回３ｍｇのＣＭＶ－ｈＬＤＬＲ　ＤＮＡを繰り返し投与した。最初の注入に続き血清コレステロール水準が３６％最初減少した後に、ＤＮＡコンプレックスの繰り返しの投与の効果は一貫していなかった。ラビット＃７７５は３ｍｇのＣＭＶ－ｈＬＤＬＲ　ＤＮＡで３回処理した。再度、コレステロール水準が最初２４％減少した後に、第２および第３の処理では明らかな効果はなかった。これらの結果について３つの説明をすることができる。まず、ＤＮＡコンプレックスはほとんど凝縮していなかった。ポリ－Ｌ－リシンとの凝縮の際にＤＮＡは３種の構造になることができる：凝集（溶液から凝縮した粒子）、しっかりと凝縮、および弛緩。小粒子にしっかりと凝縮したＤＮＡのみが、インヴィヴォでの遺伝子デリバリに有効である。第２に、ラビットがビヒクルに対して中和する抗体を生成中である。ポリ－Ｌ－リシン－ＤＮＡコンプレックスに対するラビット＃７７４の免疫反応に関する幾つかの予備的データーがある。第３に、血液からさらにコレステロールを一掃するには、突然変異体の肝細胞中のコレステロールの内生代謝における欠陥によって制限される。この最後の仮定を試験するために、ラビット＃７７４をロバスタチン（１０ｍｇ／日）、ＨＭＧ　ＣｏＡリダクターゼの既知のインヒビターで１０週間処理した。さらに２０％のコレステロール濃度の減少が観察されたことは、肝細胞におけるコレステロール合成の阻害が、異種構造のＬＤＬ受容体によってＬＤＬの取り込みの際にコレステロールを細胞に供給しないときにも、完了しないことを示唆している。

ガラクトシル化－ポリ－Ｌ－リシン／ＤＮＡコンプレックスの免疫原生に関する仮の結果は、繰り返し投与するとワタナベラビットに免疫反応の開始の引金となることを示している。また、循環する抗体がガラクトシル化－ポリ－Ｌ－リシンを認識するが、ＤＮＡ部分は認識できないことを示している。これらの結果はアシアロオロソムコイド－ポリ－Ｌ－リシン／ＤＮＡコンプレックスおよびＦａｂ－ポリ－Ｌ－リシン／ＤＮＡコンプレックスの免疫原生に関する先の報告と一致する。我々の実験室で設計したコンプレックスが実際に、同じ動物に繰り返し投与した際に免疫反応を引きだすことができることは明らかであるが、非常に低い希釈率（彼等の場合には１：１０００および１：２０００であるのに比較して１：３および１：３０）で循環する抗体を検出しただけであることに注目されなければならない。この観察は免疫系によって検出を免れるさらに良い能力を示している。それにもかかわらず、ワタナベラビットにおけるコレステロール水準をさらに低くする際に繰り返し注入できないため、免疫原生が応答できると結論するには、コンプレックスに対して中和する抗体の存在について、ＤＮＡコンプレックスを繰り返し投与する動物をさらに多くして、その血清で試験する必要がある。

実施例５

複合ＤＮＡと裸のＤＮＡを筋肉に直接注入

方法
実験セットにつき３匹のラットをＤＮＡコンプレックスの直接の組織注入を含む実験に使用した。ＳＶ４０－ルシフェラーゼ遺伝子を含む１００ミクログラムの裸のＤＮＡを１匹の動物の肝臓および腹部の筋肉に注入した。同量のＳＶ４０－ルシフェラーゼプラスミドをポリ－Ｌ－リシンに混合し、上記のように凝縮して同様に他の２匹の動物の肝臓および腹部の筋肉に注入した。ラットを注入４８時間後に殺した。一片の肝臓および腹部の筋肉をルシフェラーゼ活性の測定のために得た。
結果
ラットの肝臓および筋肉にＤＮＡコンプレックスを直接注入した評価。直接注入によってマウスの筋肉細胞に裸のＤＮＡを転移することに成功したことを報告した。ルシフェラーゼＤＮＡに結合したロウックス・サルコマウイルス（ＲＳＶ）を含むキメラ遺伝子の長期の高水準の発現が、実験で観察された。ＤＮＡが直接注入によって肝臓または筋肉に転移されなければならないとき、ポリ－Ｌ－リシンに複合しフリーＤＮＡを使用して凝縮したＤＮＡを用いた利点を調べた。３匹のラットをこれらの実験に使用していた。ＳＶ４０－ルシフェラーゼを符号化する裸のＤＮＡ１００ミクログラムを１匹の動物の肝臓および腹部筋肉に注入した。同量のポリ－Ｌ－リシンに複合し上記のように凝縮したＳＶ４０－ルシフェラーゼプラスミドを他の２匹の動物の肝臓および腹部の筋肉に同様に注入した。ラットは注入４８時間後に殺した。一片の肝臓および腹部の筋肉を溶菌緩衝液中に均質化し、細胞溶菌液をルシフェラーゼ活性のために分析した。全ルシフェラーゼ測定は、３回行い、平均値で表し全蛋白質に対して標準化した。図９は、２組の異なる動物の蛋白質ｍｇ当たりの統合したルシフェラーゼ単位を示す。ポリ－Ｌ－リシンに対して複合し凝縮したＤＮＡのトランスフェクションの効率は肝臓に注入したとき僅かに高い。しかし、筋肉組織に入れたときはさらに高い効率となることが明らかである。裸のＤＮＡを注入ものと比較して、凝縮ＤＮＡを注入した筋肉の試料では２０倍高いルシフェラーゼ活性を認めた。非常に凝縮しパッケージされたＤＮＡはヌクレアーゼに対して保護され、さらに安定になると考える。さらに、ポリ－Ｌ－リシンは細胞内に入ると各輸送の効率を増加することができる。先ず、大きさが小さいコンプレックスは核孔を通過でき、第２に、リシンおよびアルギニンのような正に荷電したアミノ酸の鎖は種々の蛋白質中で核局在化信号（ＮＬＳ）であることが知られている。肝臓と筋肉での反応が異なることに関しては、骨格筋肉細胞の特徴的な相互連結構造がそれらを細胞から細胞へのＤＮＡの受動拡散のためにより良い標的となることが最も確からしい。これは筋肉組織に沿ってＤＮＡコンプレックスを用意に分布させ核に輸送させる。
実施例６
裸のＤＮＡおよび凝縮下ＤＮＡを脳に直接注入：インヴィヴォでのレチナールガングリオン細胞の転移
序論
外来ＤＮＡを成体ニューロンに挿入することは正常ニューロン生理学の研究および神経病の治療のために将来性がある。ニューロン中の遺伝子転移はウイルスベクターを使用して達成されたが、精巧な方法論を要し、通常トランスフェクションした細胞は特定のタイプのニューロンに制限できない。
軸索逆行性輸送は、大多数の種々のタイプの分子を輸送することが見出された連続的生理学プロセスである。多くの分子は、吸着または流体通過粒子であろうといずれでも、エンドサイトシスを通って軸索管腔に入ることが知られている。軸索が働く場合には、細胞外空間からの可溶性粒子は軸索に拡散し細胞体に移動することができることが前提条件である。
この実験では、裸のプラスミドＤＮＡまたは緊密なスフェロイドに凝縮されたプラスミドのいずれをも試験し、視神経中の網膜神経節細胞軸索の切断端または脳の視蓋に塗布し、細胞体に戻して、蛋白質に発現させた。
方法
広範囲の真核生物細胞タイプに有効な３つのプロモーターの１つのコントロール下に３個

のプラスミドを使用した：ＲＳＶ－ｌａｃＺ、ＣＭＶ－ｌａｃＺおよびＳＶ４０－ｌｕｃ。これらを１ないし２０μｇ／μｌの範囲の異なる濃度で調製した。ｐＣＭＶ－ｌａｃＺおよびｐＳＶ４０－ｌｕｃはジョース・カルロス・ペラレス（ＰＮＡＳ，１９９４）によってポリ－Ｌ－リシン（１：１）で混合した。

網膜ガングリオン細胞体へのプラスミドコンプレックスの後退移送の評価は、エピフルオレセンス顕微鏡ＦＩＴＣ－ポリ－Ｌ－リシンを使用して行い、ｐＣＭＶ－ｌａｃＺでコンプレックスを形成した。純粋なプラスミドの後退移送を評価するために、ｐＲＳＶ－ｌａｃＺをＨｉｎｄＩＩＩを用いて１つの部位で分解した。ビオチン－ｄＵＴＰを次にｐＲＳＶ－ｌａｃＺの３’－ＯＨ末端に末端デキシヌクレオチジルトランスフェラーゼと結合させた。次にプラスミドを沈澱させてフリービオチン－ｄｔｙｒｐから洗浄し、２μｇ／μｌで再懸濁させた。

成体ウイスターラットを麻酔にかけ、視神経を露出させた。１．５μｌのプラスミド溶液（異なる濃度およびプラスミド）を視神経を覆うように塗布した。視神経軸索を次に網膜血液供給を避けて切断した。別の１．５μｌの同じプラスミド溶液を浸透ゲル泡中で塗布した。次に結合体を閉鎖した。同じ方法を非特異的プラスミドを使用して反対側の目に行った。３日後に動物を殺した。視蓋領域に直接注入するため、動物を麻酔にかけ、顕微鏡で脳の視蓋領域に裸のＤＮＡまたは凝縮ＤＮＡを注入した。

－液体β－ガラクトシダーゼアッセイのため、繰り返し解凍氷結して細胞溶菌するまで、網膜を－７０℃に保持した。組織を１２００ｒｐｍで２分間遠心分離し、上澄み液を収集し、蛋白質含量を分析した。３６０μｇの蛋白質を含む溶液を、１５ｍｇ／ｍｌのコレステロール赤色Ｂ－Ｄ－ガラクトピラノシド（ＣＰＲＧ）を含む緩衝液Ａでインキュベーションした。吸光度を記録した。

－ルシフェラーゼアッセイのため、網膜の溶菌上澄み液にルシフェラーゼアッセイ緩衝液を添加して行った。試料をＤ－ルシフェリンを注入したルミノメーターに入れルルミネセンスを記録した。

－そのままのβ－ガラクトシダーゼアッセイのため（ｐＲＳＶ－ｌａｃＺおよびｐＣＭＶ－ｌａｃＺのため）、網膜を２％のホルムアルデヒドに固定し、０．５％；グルタルアルデヒド、ＰＢＳに３０分間、ＰＢＳで洗浄し、６時間３７℃で１ｍｇ／ｍｌのＸ－ｇａｌ、４ｍＭポタシウムフェロシアニド、４ｍＭポタシウムフェリシアニド、２ｍｇ　$MgCl_2$、ＰＢＳ　ｐＨ７．３、０．０２％ノニデトｐ－４０、０．０１％デオキシコレートでインキュベーションした。次に組織を濯ぎ、直ぐに分析した。青色標識細胞の数を数えてトランスフェクション細胞の割合を評価した。

結果

１）プラスミドＤＮＡをラットの視覚軸索の切断端に投与すると、細胞体に後退移送した。視神経の切断端にＦＩＴＣ－ポリ－Ｌ－リシン／ｐＣＭＶ－ｌａｃＺコンプレックスを投与した２日後、網膜からの二重標識フィールド（焦点共有顕微鏡）を、次にヨウ化プロピジウムでインキュベーションして、ＦＩＴＣ（緑）、ヨウ化プロピジウム（赤）および両方の二重標識（黄色）の混合物を、４５％の網膜ガングリオン細胞数の約４５％を示す無作為化フィールドで数えた。

異なる大きさで取り出した顕微鏡フィールドは、網膜ガングリオン細胞層中に青色細胞を示し、網膜中でそのままβ－ガラクトシダーゼアッセイを続けた。２０μｇ／μｌのｐＲＳＶ－ｌａｃＺを切断した視神経に投与し、ｐＳＶ４０－ｌｕｃで処理した反対側の目と比較した。β－ガラクトシダーゼにポジティブの細胞は特に網膜中のガングリオン細胞にのみ知られた範囲の大きさであった。これらの細胞は無作為フィーマドで数え、全ガングリオン細胞の３５％を示すと評価された。

２）網膜ガングリオン細胞中のプラスミドＤＮＡを用量依存法で表すと、凝縮ＤＮＡは高い有効性を発現する。

ラットからの網膜で、軸索切断したばかりの網膜と比較して、または非特異的プラスミドｐＣＭＶ－ｌａｃＺ（１μｇ／μｌ）で処理したものと比較して、濃度を増加させてｐＳＶ４０－ｌｕｃを投与したシビアな視神経は、ルシフェラーゼ活性がｐＳＶ４０－ｌｕｃ

の活性において濃度依存性の増加を示した。
シビアな視神経にｐＣＭＶ－ｌａｃＺを投与したラットからの網膜のβ－ガラクトシダーゼ活性の結果は、軸索切断したばかりの網膜、または非特異的プラスミドｐＣＭＶ－ｌａｃＺ（１μｇ／μｌ）で処理したものと比較して、ｐＣＭＶ－ｌａｃＺの最大濃度から最高の活性が記録されたことを示した。ポリリシンを複合させたｐＣＭＶ－ｌａｃＺは非特異的プラスミドよりも高いβ－ガラクトシダーゼ活性を生成した。
３）この方法はそれらの計画によってニューロンタイプを制限する特異的遺伝子の移送に使用することができる。
４）裸のＤＮＡおよびポリリシン凝縮プラスミドＤＮＡの中脳蓋内注入は高水準の発現をニューロンの細胞体に２０日間以上発現することができる。ＤＮＡがポリ－Ｌ－リシンと凝縮していないとき、発現の水準は注入後１０日で元に戻る（図１０）。
参考文献：

1. Shapiro, J.T., et al., (1969). Deoxyribonucleic acid-polylysine complexes. Structure and nucleotide specificity. Biochemistry 8:3219-3232.
2. Haynes, M., et al., (1970). Structure of nucleic acid-polybase complexes. Biochemistry 9:4410-4416.
3. Lang, D. (1973). Regular superstructures of purified DNA in ethanolic solutions. J. Mol. Biol. 78:247-254.
4. Lerman, L.S. (1971). A transition to a compact form of DNA in polymer solutions. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68: 1886-1890.
5. Olins, D.E., et al., (1967). Model nucleoprotein complexes: Studies on the interaction of cationic homopolypeptides with DNA. J. Mol. Biol. 24:157-176.
6. Miller, I.R., et al., (1969). Biopolymers 7:619.
7. Carroll, D. (1972). Optical properties of deoxyribonucleic acid-polylysine complexes. Biochemistry 11:421-426.
8. Cheng, S.M., et al., (1974). The thermal transition of "psi" DNA monitored by circular dichroism. FEBS letters 49: 37-42.
9. Chenge, S.M., et al., (1975). Condensed states of nucleic acids. II. Effects of molecular size, base composition, and present of intercalating agents on the transition of DNA. Biopolymers 14:663-677.
10. Onge, E.C., et al., (1976). Chromatin models. The ionic strength dependence of model histone-DNA interactions: circular dichroism.
11. Moran, F., et al., (1989). Kinetic analysis of Ψ-DNA structure formation induced by histone H1 and its C-terminal domain. Biophysical Chemistry 33:133-141.
12. Shih, T.Y., et al., (1970). J. Mol. Biol. 52:125.
13. Cantor, K.P., et al., (1970). J. Mol. Biol. 49:213.
14. Li, H.J. (1973). Biopolymers 12:287.
15. Li, H.J., et al., (1973). Biochemistry 12:1763.
16. Change, C., et al., (1973). Conformational studies of nucleoprotein . Circular dichroism of deoxyribonucleic acid base pairs bound by polylysine. Biochemistry 12:3026-3032.
17. Gosule, L., et al., (1976). Compact form of DNA induced by

spermidine. Nature 259:333-335.
18. Gosule, L., et al., (1978). Condensation of phage DNA by polyamines. Advances in polyamine research 1:201-215.
19. Wu, C.H., et al., (1984) J. Biol. Chem. 264 (29), 16985-16987
20. Wu, G.Y., et al., (1991) J. Biol. Chem. 266 (22), 14338-14342
21. Neda, H., et al., (1991) J. Biol. Chem 266 (22), 14143-14146
22. Wilson, J.M., et al., (1992) J. Biol. Chem. 267 (2), 963-967
23. Chen, J., et al., (1993) Submitted for publication to FASEB J..
24. Ferkol, T., et al., (1993) FASEB J., 7;1081.
25. Wagner, E., et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Scie. USA, 88:4255-4259.
26. Laemmli, U.K. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72:(11), 4288-4292.
27. Lerman, L.S. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68 (8), 1886-1890
28. Post, C.B., et al., (1982) Biopolymers, 21, 2123-2137
29. Hatzoglou, M., et al., (1990) J. Biol. Chem. 265:17285-17293.
30. Monsigny, M., et al., (1984) Biol. Cell., 51, 187

表１０１

	ウら	ワグナーら	本発明*
〔ＤＮＡ〕mg/ml	～1	～0.01	～1
PO_4/NH_3 比	～100	～1	～1.5
緩衝液	150mM NaCL	10mM ヘペス (pH7), 150 mM NaCL	変わる 〔NaCl〕
コンパクション法	アニーリング	直接混合	核化
ＤＮＡコンプレックスの構造	(Psi)	(Psi)または単一分子	単一分子
コンプレックスの大きさ	～200nm	80nm	～10nm
診断ツール	ゲル遅延	電子顕微鏡	円偏光二色法および電子顕微鏡
インヴィヴォでの発現	あり	なし	あり
発現の長さ	6日	--	少なくとも140 日

＊好適例

表１０２　ＤＮＡコンプレックスを注入したラットの肝臓のＰＥＰＣＫ－ｈＦＩＸ遺伝子の発現の水準

ラット＃	注入後の日数	ｈＦＩＸ活性の単位
1	2	0.040
2	2	0.045
3	4	0.045
4	4	0.025
5	6	0.330
6	8	0.135
7	12	0.160
8	12	0.075
9	32	0.125
10	48	0.350
11	72	0.005
12	136	0.105

表１０３

ＤＮＡの状態 または ＤＮＡ／ポリカチオン コンプレックス	裸眼 （または400nm での濁度）	円偏光二色法	電子顕微鏡	260nmでの 吸収
正常ＤＮＡ （コンプレックス なし）	濁りなし 透明な溶液	正常ＤＮＡ スペクトル 即ち220と269nm で最大 258nmで交差する ゼロ点	非常に薄い （約1nm厚さ 以下，そして 長い（約300- 1,000nm）繊維 （図1B）	この吸収は 他の状態を 参照
凝縮したコンプレックス（ポリカチオンが原因）	低い濁度 殆ど透明な溶液	非結合のスペクトル 同一（ポリ－Ｌ－リシンなし）二本鎖ＤＮＡ溶液； 269nmでポジティブ 220nmでのスペクトルへのポリ－Ｌ－リシンのアミド結合からの貢献は小 （図1A）	個々に単離した球状または トロイド構造 約５ｋｂのＤＮＡに対し、外 トロイドの外 径10-20nm 大きいトロイド占有密度粒子 電子密度粒子 繊維なし （図1d）	約20-30%K 参照吸光度

弛緩したコンプレックス（過剰塩が原因）	濁りなし 透明な溶液	凝縮した形態から区別することは非常に困難。 唯一の相違は220nm でのスペクトルへのポリ－Ｌ－リシンのアミド結合からの貢献多少（図1A）	ＤＮＡの棒状繊維（通常10-20 倍裸のＤＮＡ繊維の直径、即ち、通常10-20nm の厚さ、60nmよりも長い）寸法が大きい分枝トロイド構造（図1F）	約80-100%の参照吸光度
沈澱したコンプレックス（十分な塩の場合にポリカチオンが原因）	溶液中でＤＮＡ繊維	平たいスペクトル（図1I）	肉眼で見えるコンプレックス（ミクロメートルの範囲）ＤＮＡ繊維	約1%の参照吸光度
単一分子 凝集したコンプレックス	細かい粒子から大きい濁りまで大きく変わる	特徴のある赤色シフトおよび300-320nm でのポジティブellipticity	単一分子 トロイド構造 異種構造の大きさと形のランダムネットワークを形成するように塊構造	約10-20%の参照吸光度

単一分子 凝集したコンプレックス （不十分な塩の場合にポリカチオンが原因）[1]	透明	ネガティブへの 269 nmで最大スペクトルで特徴のある反転。220nm でのスペクトルへのポリ－Ｌ－リシンのアミド結合からの貢献明瞭 （図1H）	単離した多分子トロイド構造の一緒に凝縮したＤＮＡ分子の数によって変わる大きさ。大きさは単一分子トロイドの10ないし70倍（ワグナーらとシャピロら参照）（図1G）	約100%の参照吸光度

1　ＤＮＡは、ポリ－Ｌ－リシンの凝縮がＤＮＡ溶液で突然増加したときに多分子コンプレックスに凝集する（即ち、ＤＮＡの渦巻攪拌に非常に急にポリ－Ｌ－リシンを添加して）またはワグナーらによっても使用されたシャピロの方法のようにＤＮＡとポリ－Ｌ－リシンの直接混合したときも。多分子コンプレックスへの凝集はまた、減少するＮａＣｌ濃度のグラジエントで両方の成分（ポリ－Ｌ－リシンとＤＮＡ）をアニーリングする結果であろう（即ち、ウおよびウの方法）。

表 104

Lys#	ＤＮＡ（超コイル状％）	初期 [NaCl]	最終 [NaCl]	[DNA] (mg/ml)	物理的状態**	活性 †
15*	CMV-βGal (50)	151.6	200	0.2	CD: ND EL: ND Turbidity : None	+
20*	MT-hGH (100)	0	267	0.85	CD: ND EL: Relaxed Turbidity : None	-
27*	PEPCK-hLDLR (100)	178	439	1	CD: ND EL: Condensed Turbidity : Low	+++
56	RS-Tr (50)	803	1000	0.24	CD: ND EL: ND Turbidity : None	ND
56	CMV-βGal (50)	250	746	0.2	CD: ND EL: ND Turbidity : Low	ND
56*	PEPCK-hFIX (50)	800	933	0.35	CD: ND EL: Condensed Turbidity : Low	+++
56*	PEPCK-hFIX (50)	636	970	0.6	CD: ND EL: ND Turbidity : Low	+++
109*	CMV-βGal (50)	500	909	0.2	CD: + EL: ND Turbidity : Low	+++
109*	CMV-βGal (50)	689	1000	0.39	CD: ND EL: ND Turbidity : None	ND

109*	CMV-βGal (50)	616	1036	0.95	CD: ND EL: ND Turbidity : Low	+++
109*	CMV-βGal (50)	735	941	0.39	CD: ND EL: ND Turbidity : Low	+++
109*	CMV-βGal (50)	500	1031	0.7	CD: + EL: ND Turbidity : Low	ND
109	PEPCK-βGal (50)	617	1004	0.3	CD: ND EL: ND Turbidity : None	-
109*	PEPCK-βGal (50)	1085	1174	0.88	CD: ND EL: ND Turbidity : Low	+++
109*	PEPCK-hFIX (50)	630	1063	0.8	CD: + EL: Condensed Turbidity : Low	+++
109	PEPCK-hFIX (50)	636	970	0.26	CD: ND EL: ND Turbidity : None	ND
109	PEPCK-hFIX (50)	750	1120	0.8	CD: ND EL: Relaxed Turbidity : None	++
109*	PEPCK-hFIX (50)	812	1098	0.7	CD: ND EL: Condensed Turbidity : Low	+++
109	PEPCK-hFIX (50)	812	1127	0.69	CD: ND EL: Relaxed Turbidity : None	++
109*	SV40-luc (80)	1091	1144	0.9	CD: ND EL: Condensed Turbidity : Low	+++

109*	SV40-luc (80)	1091	1144	0.9	CD: ND EL: Condensed Turbidity : Low	+++
109*	SV40-luc (80)	961	1140	0.88	CD: ND EL: ND Turbidity : Low	+++
109*	SV40-luc (80)	1091	1144	0.8	CD: ND EL: ND Turbidity : Low	+++
109	SV40-luc (80)	666	1000	0.19	CD: + EL: Relaxed Turbidity : None	ND
109*	SV40-luc (80)	961	1121	0.8	CD: ND EL: ND Turbidity : None	+++
109*	SV40-luc (80)	735	972	0.55	CD: ND EL: ND Turbidity : Low	+++
109*	Salmon sperm DNA (0)	900	1231	1	CD: ND EL: ND Turbidity : None	ND
109	PEPCK-OTC (50)	774	948	0.9	CD: ND EL: ND Turbidity : Low	ND
123	SV40-luc (100)	719	1044	0.95	CD: ND EL: Relaxed Turbidity : None	-
123	SV40-luc (100)	905	1086	1	CD: ND EL: Relaxed Turbidity : None	-
123	SV40-luc (100)	689	1019	0.95	CD: ND EL: ND Turbidity : None	-

123	SV40-luc (100)	783	978	0.5	CD: ND EL: ND Turbidity : None	-
123	SV40-luc (100)	905	1149	0.57	CD: ND EL: Relaxed Turbidity : None	-
123*	CMV-βGal (ND)	825	1020	0.76	CD: ND EL: ND Turbidity : None	ND
150*	CMV-βGal (ND)	886	1077	0.5	CD: ND EL: Condensed Turbidity : Low	+++
150*	SV40-luc (80)	800	972	0.36	CD: ND EL: ND Turbidity : Low	+++
150	SV40-luc (80)	821	868	0.3	CD: Psi DNA EL: Aggregated Turbidity : High	-
150*	SV40-luc (80)	821	968	0.3	CD: + EL: Condensed Turbidity : Low	+++
150	SV40-luc (80)	821	1071	0.3	CD: + EL: Relaxed Turbidity : None	-
240*	SV40-luc (80)	711	1125	1	CD: ND EL: Condensed Turbidity : Low	+++
240	SV40-luc (80)	711	1162	1	CD: ND EL: Relaxed Turbidity : Low	+

240	SV40-luc (80)	711	1280	1	CD: ND EL: Relaxed Turbidity : None	-
240	SV40-luc (80)	800	1007	1	CD: ND EL: Aggregated Turbidity : High	-
240	T7-T7 (90)	708	1187	0.9	CD: + EL: Condensed Turbidity : Low	ND
240	T7-T7 (90)	708	1250	0.9	CD: + EL: Relaxed Turbidity : None	-
240	PEPCK-hLDLR (100)	642	947	0.73	CD: Psi DNA EL: Aggregated Turbidity : None	-
240	PEPCK-OTC (50)	706	1174	0.35	CD: ND EL: ND Turbidity : None	ND
240	PEPCK-OTC (50)	898	1153	0.64	CD: ND EL: ND Turbidity : None	ND

＊表５を編集する際に使用。
ＮＤ＝測定なし
Turbity ＝濁度
Condensed ＝凝縮
Relaxed ＝弛緩
Aggregate ＝凝集
＊＊ポリカチオン結合後のＤＮＡコンプレックスの物理的状態

１．円偏光二色（ＣＤ）を測定するとき、その結果は次のようである：ＤＮＡのポリカチオン凝縮によるスペクトル変化は、ほんの僅か（＋）；多分子コンプレックスへの凝集によるＰｓｉ型ＤＮＡとなるポリカチオン凝縮（棒状またはトロイド状）（ＰｓｉＤＮＡ）；高い凝集状態で結合した異常スペクトルの出現（－）。

２．電子顕微鏡は次のように示される：ＤＮＡとポリカチオンの結合は寸法が増加したコンプレックスへの凝集となる（＞６０ｎｍ）（凝集）；凝縮から得られた構造は寸法が増加した棒状弛緩トロイドである（弛緩）；ポリカチオン結合は適当な凝縮となる（トロイド直径＜３０ｎｍ）（凝縮）。適当に凝縮した構造（トロイド）の数は電子顕微鏡フィールドに対して測定されなかった。ＤＮＡコンプレックスの異なる調製を用いるとＥＬでの

目視できるトロイドの数の約３倍の変化がある。
３．濁度の測定はＤＮＡコンプレックスの最終溶液の目視検査に基づく。
†　ＤＮＡコンプレックスを導入した後に導入した遺伝子の活性の相対的表示:
ｈＦＩＸ（ヒト因子ＩＸ）はラット血漿試料の機能的活性アッセイまたはウェスタンブロットハイブリッド形成によって測定する。
βＧａｌ（β－ガラクトシダーゼ）活性はそのまま固定細胞または組織切片の組織化学によって測定する。
ｌｕｃ（ルシフェラーゼ）活性は組織抽出物の特異的活性アッセイを使用して測定する。
ｈＬＤＬＲ（ヒトＬＤＬ受容体）はＬＤＬ受容体欠失用ラビットモデルの全血清コレステロールを測定後に直接測定した。
ｈＨＧ（ヒト生長ホルモン）活性はＤＮＡコンプレックスでトランスフェクションした動物の血清中のｈＨＧ水準の直接測定である。
活性は同じＤＮＡで行った実験全部に関係する。ＤＮＡコンプレックスの導入後の検出できない活性は「－」で示す。

表１０５

Final [NaCl]=-555.75 + [DNA] mg/ml*180.91 + log (lys length)*y18.32

退縮統計量

多重 R0.881909585

R スクウェア0.777764515

調整した R スクウェア 0.743574441

標準エラー 135.5087624

観察 16

分散量の分析

	df	スクウェアの合計	平均スクウェア	F	有意 F
退縮	2	835435.3166	417717.6583	22.748254	5.6792E-05
残余	13	238714.1209	18362.62469		
合計	15	1074149.438			

	係数	標準エラー	t 統計量	P－値	95%以下
隔膜	-555.757861	228.34416556	2.433887324	0.0279103	-1049.059922
〔ＤＮＡ〕mg/ml	180.9113279	125.4285365	1.442345841	0.1697596	-90.06049864
log (lys length)	718.3211054	117.7844848	6.098605488	2.037E-05	463.8632453

表１０６　凝縮ＤＮＡコンプレックスの概算および実験による寸法

ＤＮＡ	寸法（bp）	凝縮直径（nm±SD）		
		電子顕微鏡[a]	水和モデル（部分比容）[b]	水和モデル（Ｘ腺回折密度）[c]
PEPCK-hFIX	4,500	12.80±1.56	18	22
PEPCK-hOTC	5,300	18.00±1.83	20	23
SV40-luciferase	5,600	16.95±3.50	20	24
PEPCK-CAT	5,800	16.30±2.56	20	24
CMV-hLDLr	7,400	20.70±2.60	22	26
ϕ29[d]	18,000	38[e]	40	47

a　印刷写真（x24,000）での少なくとも10ＤＮＡコンプレックスでの測定直径

b　凝縮球体として計算した単一分子ＤＮＡコンプレックスの直径。Ｎａ－ＤＮＡの部分比容は 0.5ml/gであると考える。荷電比１：１でのガラクトシル化ポリ－Ｌ－リシンの寄与を加えた。ＤＮＡの分子量は 6,500ダルトン/10bp の平均分子量に基づき計算した。使用した式は:

ＤＮＡ分子量（ダルトン）／6.023 $\times 10^{23} \times 0.5$ (ml/g)＝Ｘ分子量のＤＮＡ分子によって占められたml。直径は球の容積の式から得た。

c　凝縮した球であると仮定して計算した単一分子ＤＮＡコンプレックスの直径。Ｘ腺回折で測定した 1.25 ±0.1 g/mlの水和密度として計算した。荷電比１：１でのガラクトシル化ポリ－Ｌ－リシンの寄与を加えた。ＤＮＡの分子量は 6,500ダルトン/10bp の平均分子量に基づき計算した。使用した式は:

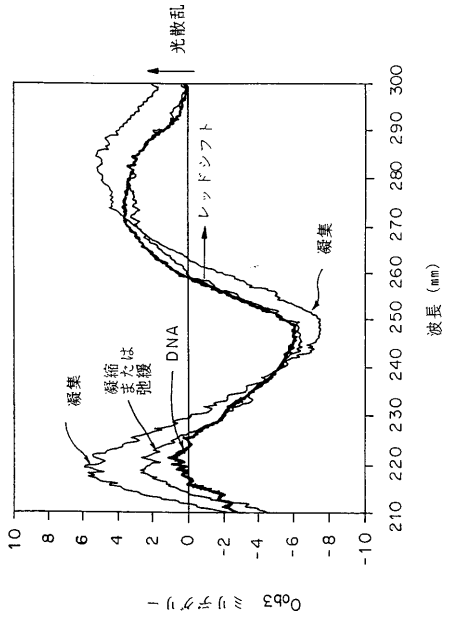
ＤＮＡ分子量（ダルトン）／6.023 $\times 10^{23} \times 1.25$ (ml/g) ＝Ｘ分子量のＤＮＡ分子によって占められたml。直径は球の容積の式から得た。

d　文献から

e　ファージプロ頭部に対する寸法は蛋白質アウトシェルを含む。

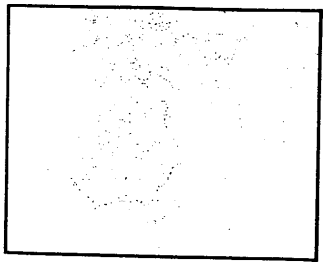
【図１Ａ】

FIG. 1A



【図１Ｂ】

FIG. 1B



【図１Ｃ】

FIG. 1C



【図１Ｄ】

FIG.1D

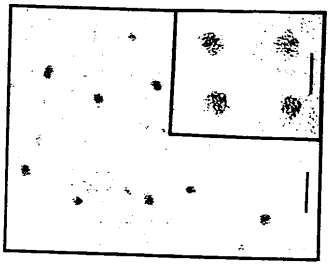


FIG.1E

【図１Ｅ】

FIG.1D

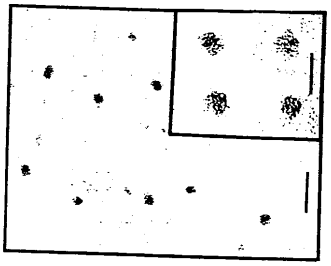
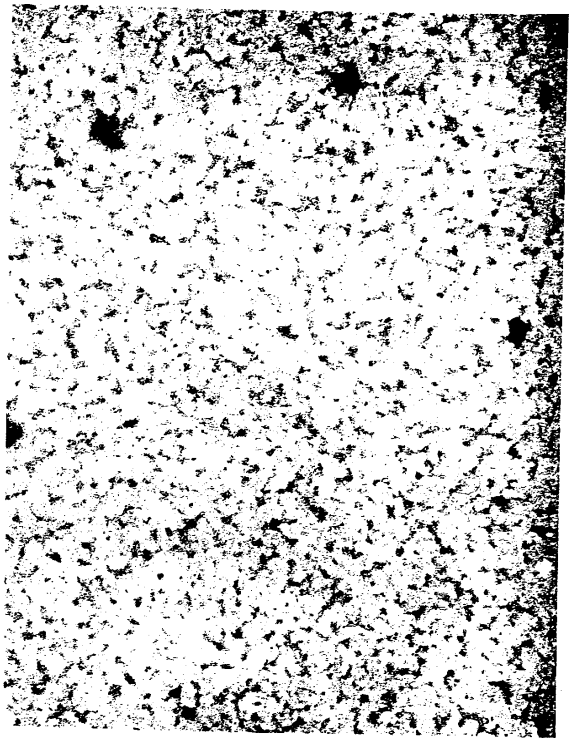


FIG.1E

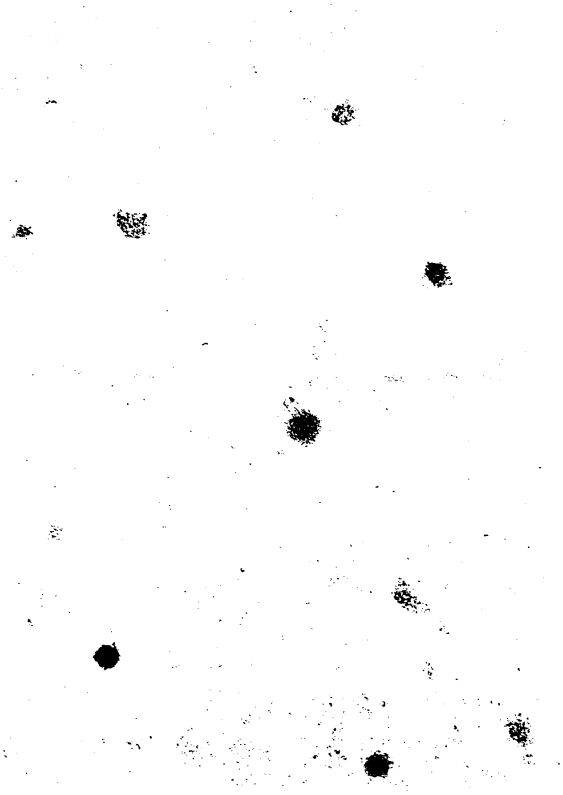
【図１Ｆ】

FIG. 1F



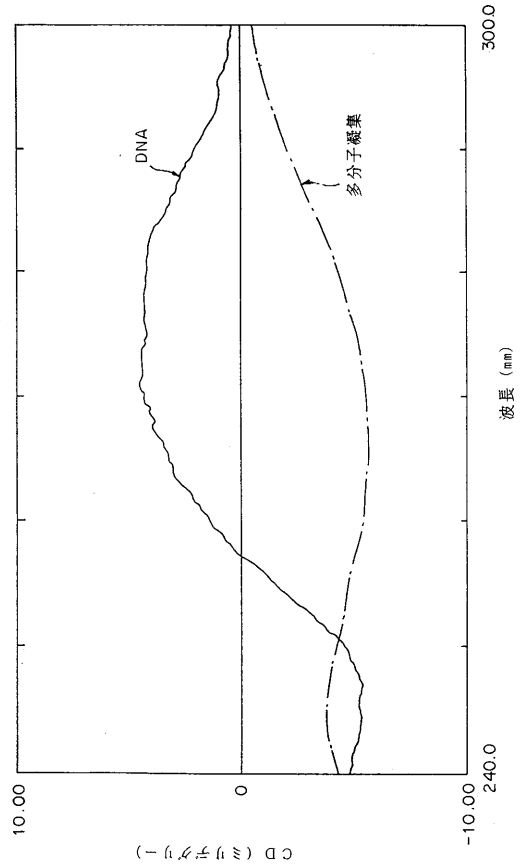
【図１Ｇ】

FIG.1G



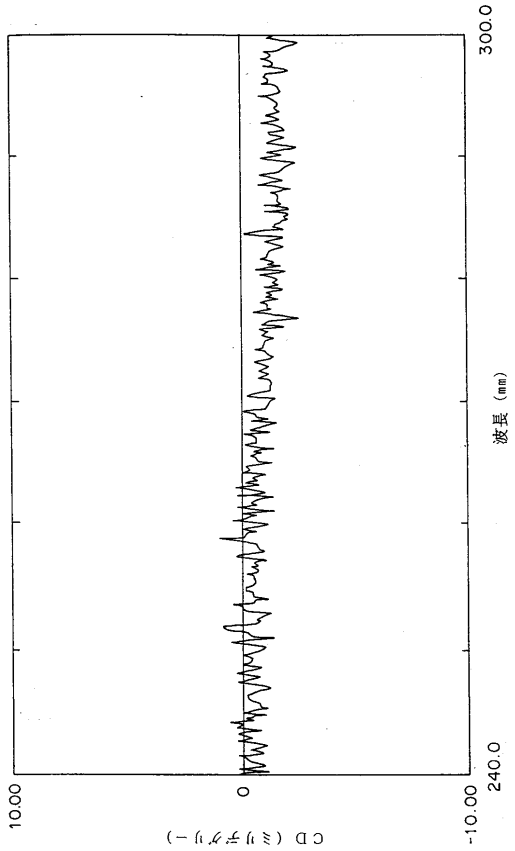
【図１Ｈ】

FIG. 1H



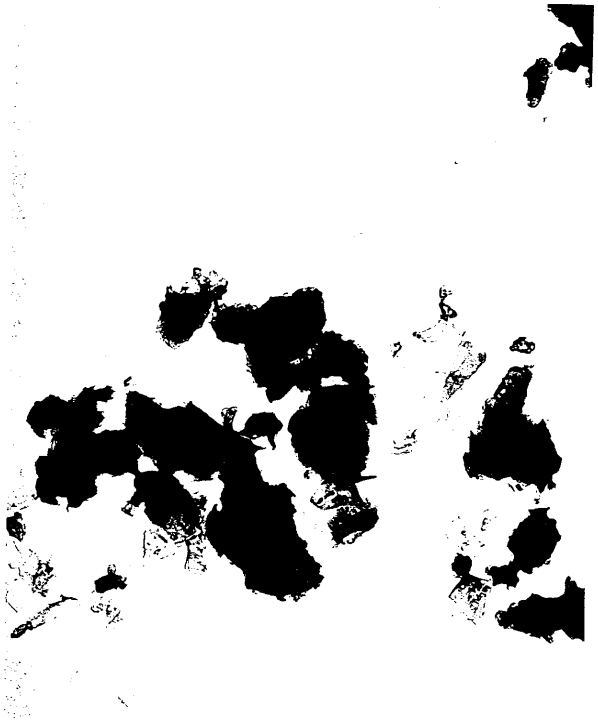
【図１Ｉ】

FIG.1I



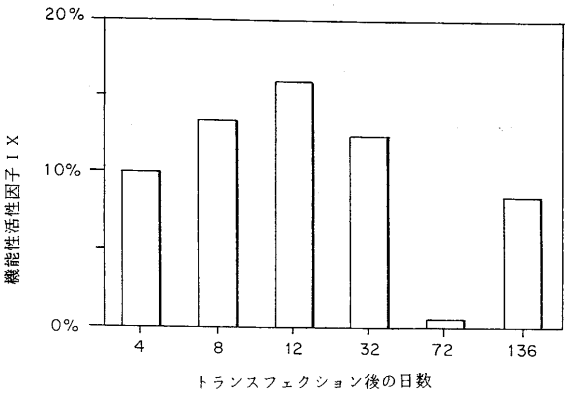
【図１Ｊ】

FIG. 1J



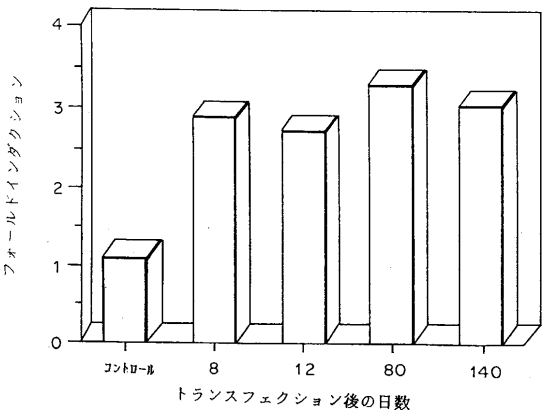
【図２Ａ】

FIG. 2A



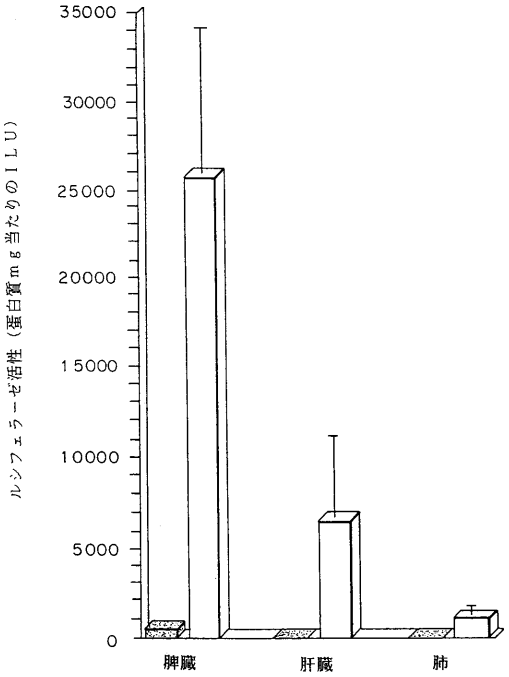
【図２Ｂ】

FIG.2B



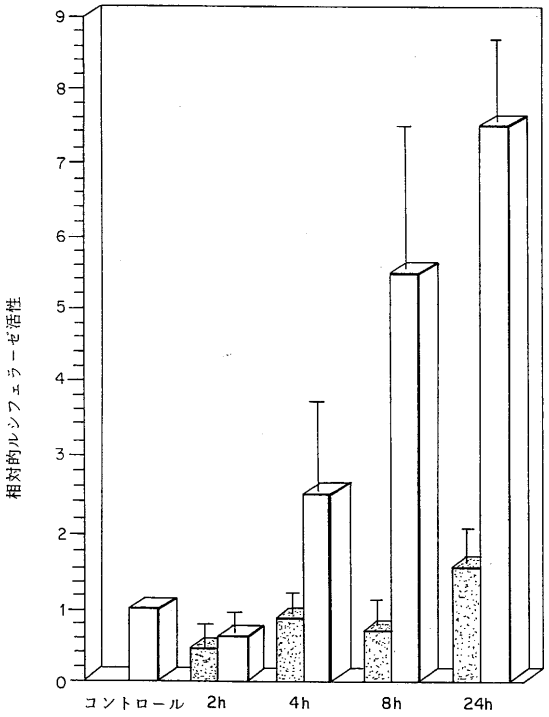
【図３】

FIG. 3



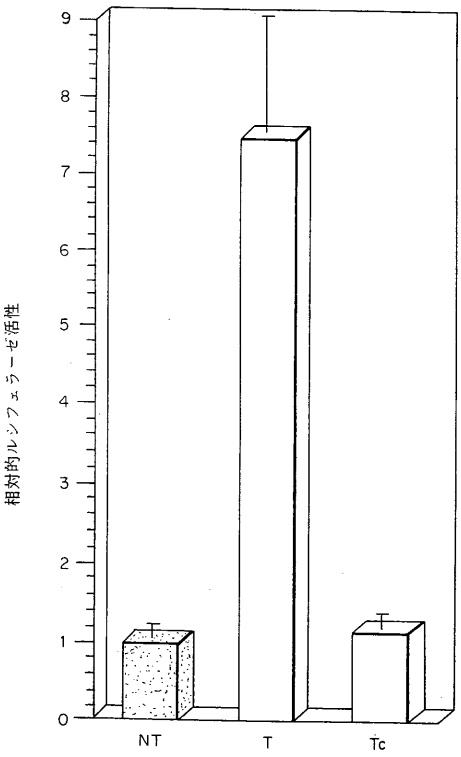
【図４】

FIG. 4



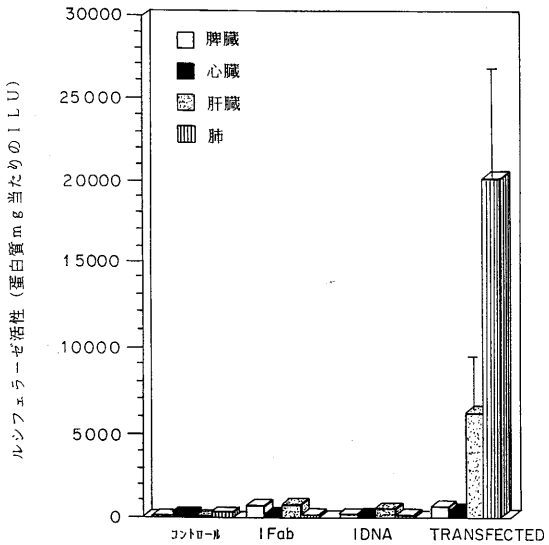
【図５】

FIG. 5



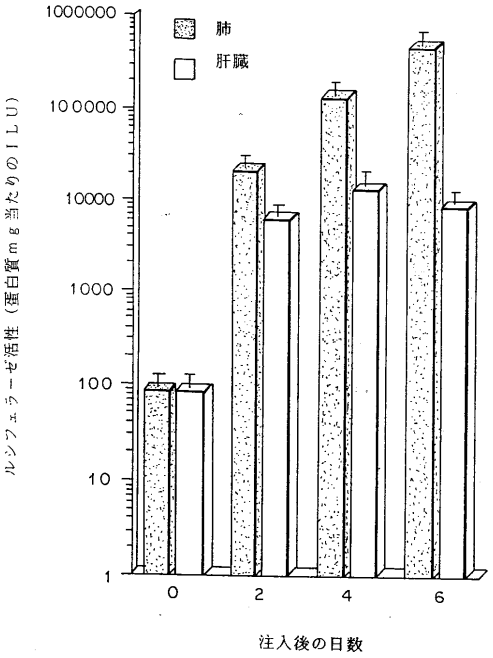
【図６】

FIG. 6



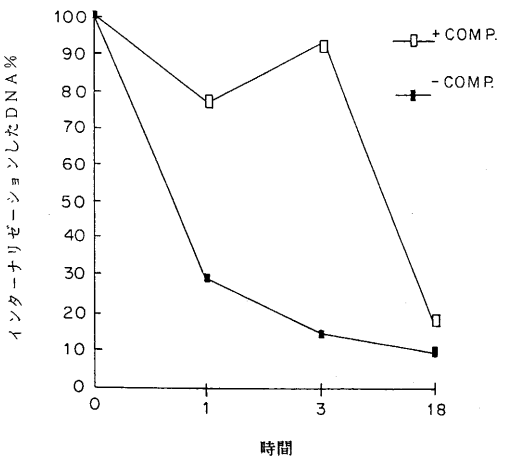
【図７】

FIG. 7



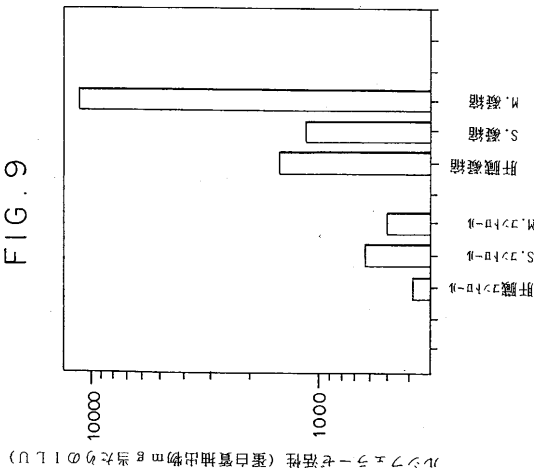
【図８】

FIG. 8



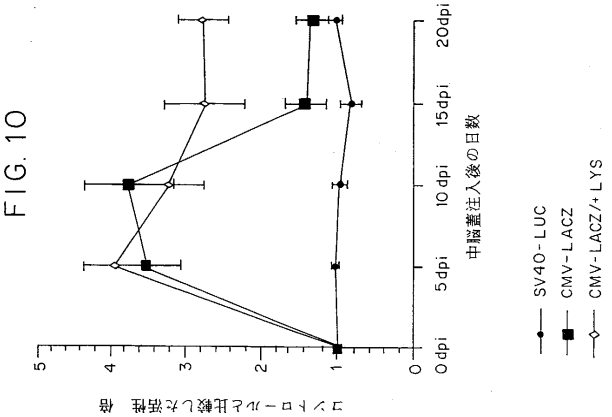
【図９】

FIG. 9



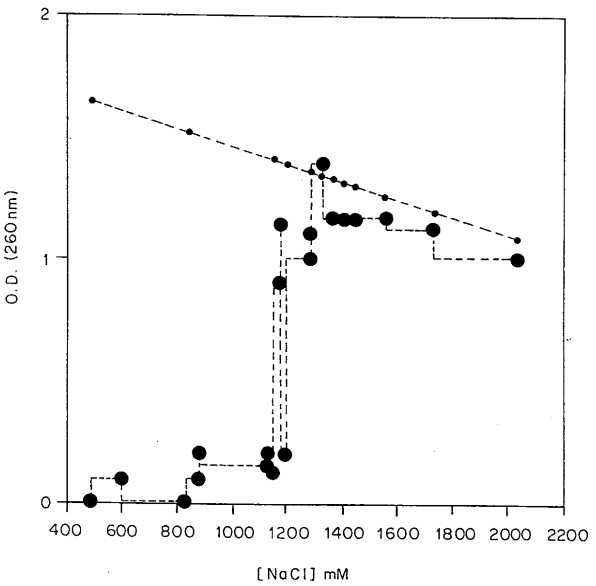
【図１０】

FIG. 10



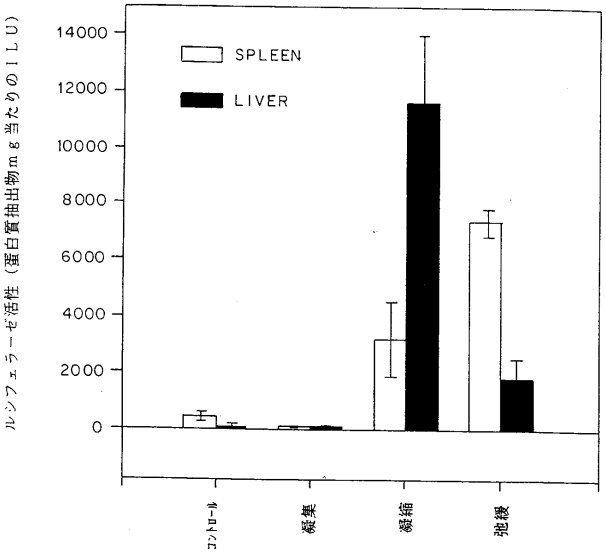
【図１１】

FIG. 11



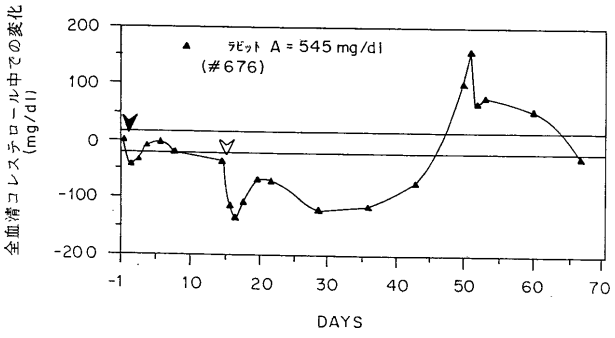
【図１２】

FIG.12



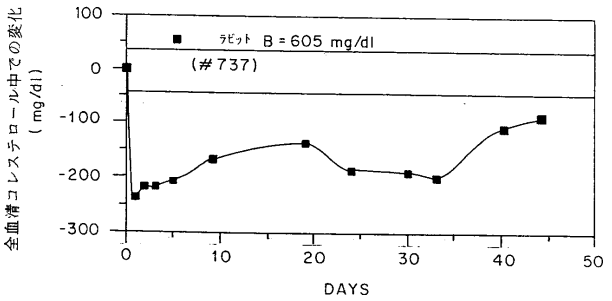
【図１３】

FIG.13



【図１４】

FIG.14



【図１５】

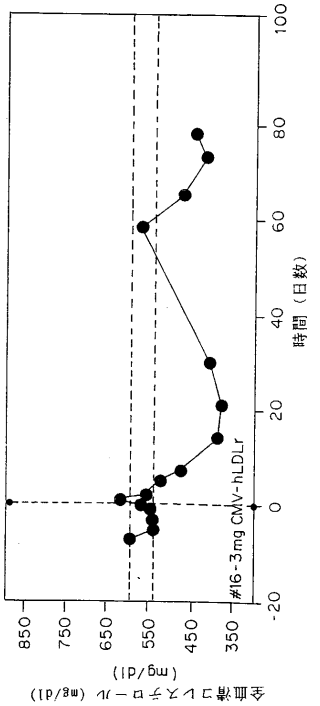


FIG.15

【図１６Ａ】

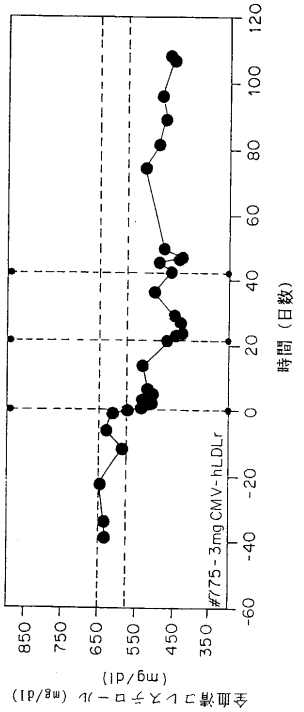


FIG.16A

【図１６Ｂ】

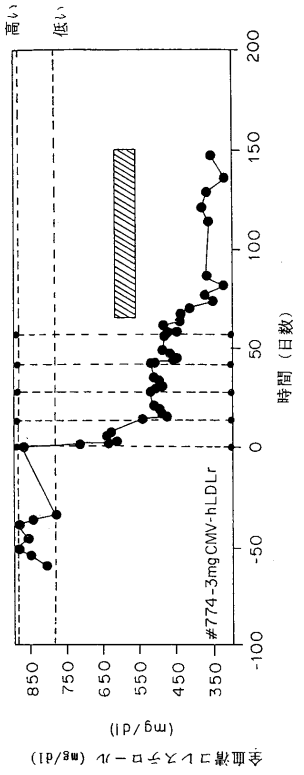


FIG.16B

【図１７】

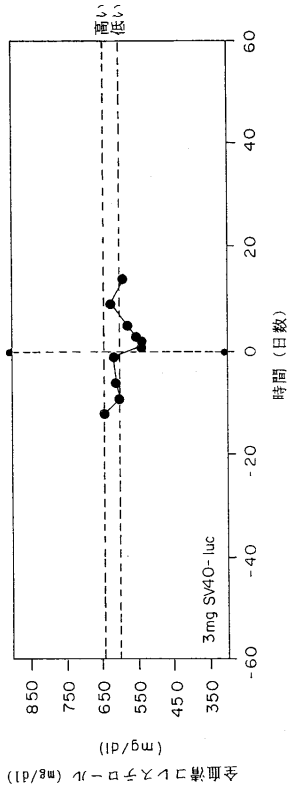


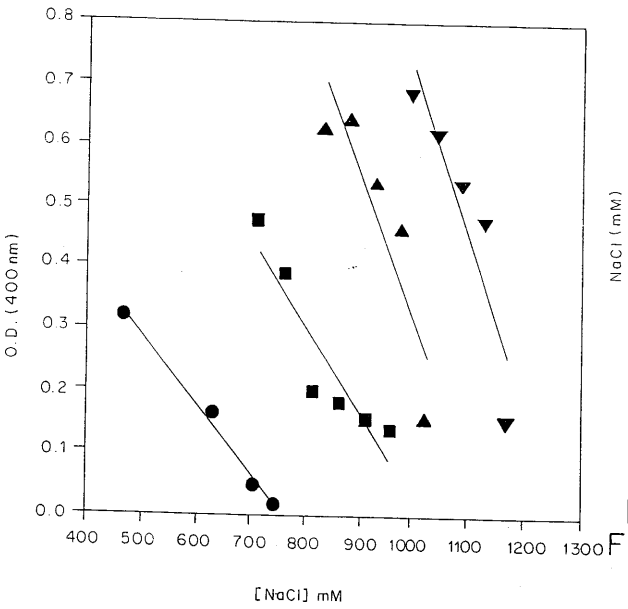
FIG.17

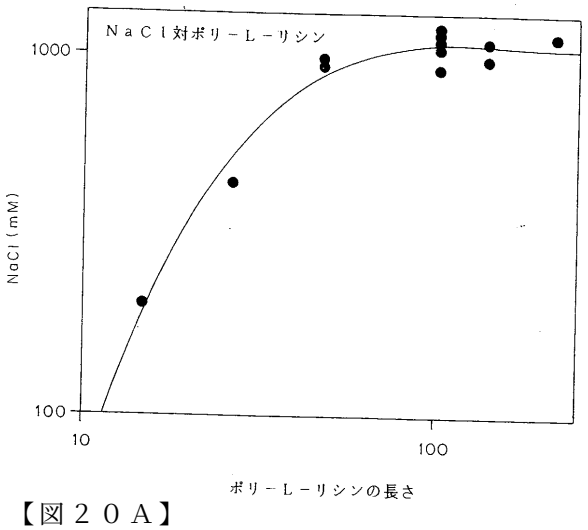
【図１８】

FIG.18

【図１９】

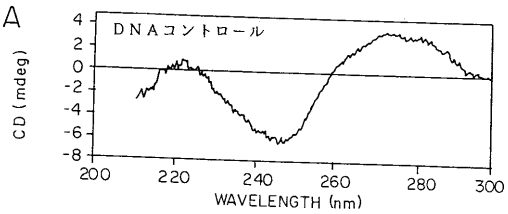
FIG.19



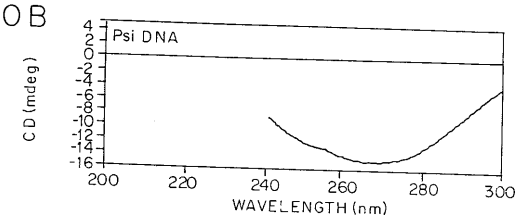


【図２０Ａ】

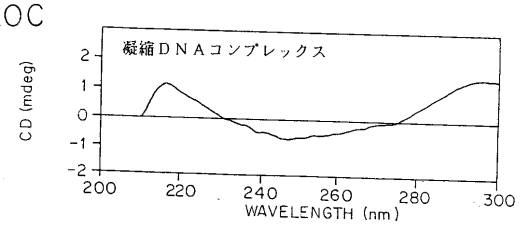
FIG.20A



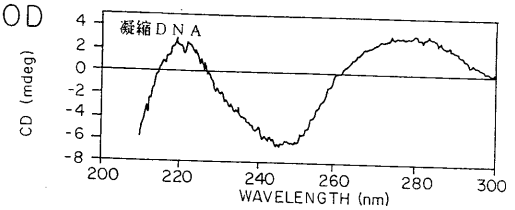
【図２０Ｂ】
FIG.20B



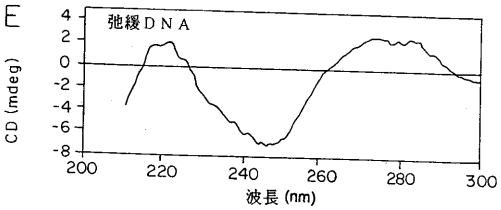
【図２０Ｃ】
FIG.20C



【図２０Ｄ】
FIG.20D



【図２０Ｅ】
FIG.20E



フロントページの続き

(72)発明者 ハンソン，リチャード，ダブリュ
アメリカ合衆国 オハイオ州 ４４１０６ クレベランド ハイツ，バークシャー ロード ２６８９
(72)発明者 ペラルス，ジョセフ，シー
アメリカ合衆国 オハイオ州 ４４１１８ クレベランド ハイツ，ミドルハースト ＃２０３１７２０
(72)発明者 フェルコル，トーマス，ダブリュ，ジュニア
アメリカ合衆国 オハイオ州 ４４１２３ ユークリド，イースト ２１０ス ストリート ２９６

合議体
審判長 鵜飼 健
審判官 平田 和男
審判官 鈴木 恵理子

(56)参考文献 国際公開第９４／０５６２４（WO，A1）
国際公開第９３／０７２８３（WO，A1）
Somatic Cell and Molecular Genetics，18（6），p559－569，1992
Biochemistry，32，p7143－7151，1993

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N1/00-C12N15/90