

機能性ペプチド融合による Interferon γ 時空間制御

安藤 満, 高橋有己, 西川元也, 高倉喜信*

Control of Spatiotemporal Distribution of Interferon γ
by Genetically Fusing Functional Peptides

Mitsuru Ando, Yuki Takahashi, Makiya Nishikawa, and Yoshinobu Takakura*

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University; 46-29 Yoshidashimoadachi-cho,
Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan.

(Received July 31, 2012)

Type II interferon (IFN γ) is a representative Th1 cytokine and it possesses a variety of functions, including immune regulation, antiviral and antitumor activity. Because of its multifunctional nature, IFN γ is expected to be applied to the treatment of autoimmune diseases, cancer and viral infection. Although IFN γ has therapeutic potential for such diseases, the clinical use of IFN γ has been limited due to its short *in vivo* half-life and serious adverse effects. In contrast, gene delivery of IFN γ is an alternative approach to increasing the retention time of IFN γ . To extend transgene expression after plasmid DNA (pDNA) gene transfer, we designed and developed pDNA with varying numbers of CpG motifs. CpG-reduced pDNA resulted in more durable transgene expression than its CpG replete counterpart in mice. Comparison of the effect of promoter/enhancer elements on transgene expression showed that ROSA26 promoter-mediated IFN γ expression was safe because of the lack of an initial surge after hydrodynamic gene transfer. We also designed an IFN γ -mouse serum albumin (MSA) fusion protein, IFN γ -MSA. Gene transfer of this fusion protein resulted in a sustained concentration of IFN γ fusion protein in mouse serum, and inhibited tumor metastasis in mice. These results provide experimental evidence that IFN γ gene therapy can be a useful treatment for a variety of diseases.

Key words—interferon γ (IFN γ); plasmid DNA (pDNA); fusion protein; gene therapy; hydrodynamic gene transfer

1. はじめに

インターフェロン (interferon; IFN) は、1954 年に長野、小島らによって報告されたウイルス増殖を非特異的に抑制するウイルス干渉因子である。現在 IFN は大きく 3 種類に分類される。II 型 IFN である IFN γ は、代表的な Th1 サイトカインであり、活性化された T 細胞や NK 細胞から産生され、ナイーブ T 細胞の Th1 細胞への分化促進と Th2 細胞への分化抑制、Th2 細胞からのサイトカイン産生を抑制する免疫調節作用に加え、¹⁾ 抗ウイルス作用、抗腫瘍作用を有する。このような多機能な生理活性を持つことから、自己免疫疾患²⁻⁵⁾やがん、ウイルス感染など⁶⁻⁹⁾の疾患への適用が期待されており、

培養細胞での検討に加えて前臨床試験、臨床試験においてもその有用性が証明されてきた。しかしながら、その適応対象は、腎がんや成人 T 細胞白血病に対する治療、また、慢性肉芽腫症に伴う重症感染の頻度と重症度の軽減に対する治療のみと、ごく一部の適用に限定されているのが現状である。その理由として、①他のサイトカインやホルモンなどの多くの生理活性物質と同様、IFN γ は低分子量のために消失半減期が非常に短く、¹⁰⁾ 繰り返し投与が必要であること、②強い生物活性のために治療標的部位以外での有害作用が懸念されること、^{11,12)} が挙げられる。こうした問題に対し、製剤学的な工夫¹³⁻¹⁵⁾や投与方法の最適化検討により¹⁶⁻¹⁸⁾ IFN γ の体内動態制御が試みられてきたが、問題解決に至っていないのが現状である。

IFN γ をコードする cDNA を利用する IFN γ 遺伝子治療は、タンパク質製剤よりも持続的に IFN γ を供給可能である。また、ポリエチレングリコール

The authors declare no conflict of interest.

京都大学大学院薬学研究科病態情報薬学分野 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29)

*e-mail: takakura@pharm.kyoto-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 132 年会シンポジウム S32 で発表したものを中心に記述したものである。

(polyethylene glycol; PEG) をタンパク質医薬品に化学修飾した PEG インターフェロンや PEG フィルグラスチムなどの PEG 化製剤は、修飾部位や修飾数がかならずしも同一ではないことから、構造的・機能的に不均一な製剤であるのに対し、^{19,20)} IFN γ に新たな機能を遺伝子工学的手法によって賦与した IFN γ 融合タンパク質を構築することで均質な誘導体のみが得られ、これにより再現性のよい体内動態制御が可能である。以上のことから、前述の 2 点の問題、すなわち消失半減期の短さと非特異的な全身性の有害作用、を克服可能なアプローチと考える。

本稿では、われわれの検討結果を中心に、*in vivo* 遺伝子導入後の転写過程の制御による IFN γ 遺伝子発現プロファイルの最適化検討に加えて、*in vivo* 遺伝子導入後の IFN γ の体内動態を機能性ペプチドを融合することで制御する試みについて紹介する。

2. *in vivo* 遺伝子導入法

遺伝子治療における遺伝子導入法は、ウイルスベクターと非ウイルスベクターに大別できる。現在、臨床試験において遺伝子導入法は、アデノウイルスベクター (23.3%)、レトロウイルスベクター (20%)、プラスミド DNA (18.5%) の順に用いられており、導入効率・遺伝子発現の高さ、遺伝子発現の持続性からウイルスベクターが全体の約 70% と多いのが現状である。²¹⁾ しかしながら、ウイルスベクターは、ウイルス本来の持つ毒性、抗原性、ウイルスが持つ固有の病気になり易いといった安全面での問題を孕んでいる。実際、これまでに、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療における白血病の発症などが報告されている。一方、ポリマーやリポソームなどの合成キャリア^{22,23)} とプラスミド DNA (plasmid DNA; pDNA) などの核酸分子との複合体である非ウイルスベクターはウイルスベクターと比較すると、安全性に優れ、大量かつ安価な産生が可能である。しかしながら、pDNA は高分子で、細胞膜と同じ負電荷に帯電しているため、細胞透過性が非常に小さい。そのため、遺伝子導入はエレクトロポレーションやソノポレーションなどの物理刺激、合成キャリアを用いて行うが、遺伝子導入、発現の効率が低いことが課題となっている。このような問題に対し、1999 年に Liu らによって開発され

たハイドロダイナミクス法は、大容量 pDNA 水溶液を急速に血管内投与することで、²⁴⁾ 肝臓においてウイルスベクターと同程度の遺伝子導入効率・発現が得られることから、*in vivo* における基礎研究に広く用いられている。また、カテーテルを用いることで治療標的局所へハイドロダイナミクス法を適用するといった改良方法も開発され、²³⁾ 非ウイルスベクターを臨床試験に用いる検討も行われている。ここでは、プラスミド DNA 骨格を設計することで導入遺伝子の転写過程の制御についてマウスを用いた検討を紹介する。

2-1. プラスミド DNA 中の CpG 配列が持続的な遺伝子発現に及ぼす影響 哺乳類のゲノム DNA 中のシトシン-グアニン配列 (CpG 配列) では、シトシンの 5 位の炭素がメチル化しており、その頻度は全 CpG 配列中 60–90% と高い。²⁵⁾ 一方で、大腸菌を用いて調製される pDNA 中の CpG 配列はメチル化を受けていない。このメチル化されていない CpG 配列は、CpG モチーフと呼ばれ大腸菌由来 DNA の特徴の 1 つである。哺乳類の免疫担当細胞には、Toll-like レセプター 9 という受容体が発現しており、CpG モチーフを認識することで免疫担当細胞から炎症性サイトカインが放出されることが知られている。^{26–28)} カチオニックリポソームを用いて pDNA を肺へ遺伝子導入した場合、CpG モチーフ依存的に初期免疫が誘導され、炎症性サイトカインが放出されることで遺伝子発現が抑制されることが報告されている。²⁹⁾ また、遺伝子の特異的な発現とその抑制は様々な機構により制御されており、CpG 配列のメチル化も遺伝子発現抑制機構の 1 つである。遺伝子のプロモータ領域に存在する CpG 配列がメチル化されることで、プロモータは不活性となり遺伝子発現が抑制される。^{30–32)} この現象は、哺乳類細胞に取り込まれた外来 DNA に対しても例外ではなく、DNA 中の CpG モチーフは、核内でメチル化を受ける。アデノウイルスベクターを筋肉内投与した検討において、遺伝子導入 7 日後にはエンハンサ、プロモータ上の約 70% もの CpG モチーフがメチル化され、遺伝子発現は 1/100 以下にまで低下することが報告されている。³³⁾

ハイドロダイナミクス法の開発により、遺伝子導入効率・発現量の問題は克服されたが、プラスミド DNA を用いた遺伝子導入では、遺伝子発現期間が

短いことが依然として問題であり、この問題は投与方法を改善するだけでは解決できない。われわれは前述した問題を踏まえ、持続的な遺伝子発現を可能とするプラスミド DNA 骨格を開発することを目的として、pDNA 中の CpG モチーフ数に着目した。すなわち、CpG モチーフが発現調節領域であるエンハンサ/プロモータに与える影響を、遺伝子発現調節領域そのものであるエンハンサ/プロモータ中の CpG モチーフが遺伝子発現に与える影響と、pDNA 骨格全体の CpG モチーフが遺伝子発現に与える影響を検証するために、Table 1 にまとめた CpG モチーフ数の異なる種々の pDNA を構築し、ハイドロダイナミクス法を用いてマウスへ遺伝子導入した後の遺伝子発現プロファイルについて評価した。pDNA 中のプロモータ領域中の CpG モチーフ数が遺伝子発現に与える影響を検討するために構築した天然由来の CMV プロモータ (pCMVnat ベクター)、あるいは、CpG モチーフを削除した合成 CMV プロモータを組み込んだ pDNA (pCMVsyn ベクター) からの遺伝子発現プロファイルを評価したところ、プロモータ領域における CpG モチーフ数が遺伝子発現に与える影響はその有無にかかわらずほとんど差がみられなかったものの、CpG モチーフを削除した合成 CMV プロモータからの遺伝子発現量の方が若干ではあるが多かった (Fig. 1).^{34,35)} また、pDNA 骨格全体に占める CpG モチーフ数の割合が遺伝子発現に与える影響を検討したところ、pDNA 全域に占める CpG モチーフ数の割合が大きくなるにつれて遺伝子発現が抑制される傾向にあり、pDNA への挿入遺伝子由来 CpG モチーフのみの pDNA では数ヵ月以上に渡って遺伝子発現が得られた。³⁵⁾ しかしながら、Chen らは肝臓に遺伝子導入した後の遺伝子発現抑制は pDNA 骨格中の CpG モチーフのメチル化には依存しないことを報告しており、³⁶⁾ 今回検討に用いた pDNA ではエンハンサ/プロモータ領域がそれぞれ異なっているため、得られた結果はエンハンサ/プロモータ領域の影響が濃く出ていると考えられる。このことから、ハイドロダイナミクス法を用いて持続的な遺伝子発現を達成するためには、pDNA に占める CpG モチーフ数はほとんど影響を与えず、エンハンサ/プロモータの組み合わせが重要であると考えられる。また、発現調節領域上の CpG モチーフの

Table 1. Properties of Plasmid DNA Used in This Study

Plasmid DNA	Size (kbp)	Number of CpG	Promoter	cDNA
p Δ CpG CMV _{enh/prom} -huIFN γ	3.5	24	Δ CpG CMV _{enh/prom}	huIFN γ
phCMV _{enh/prom} -huIFN γ	3.6	98	hCMV _{enh/prom}	huIFN γ
pCMV-Luc	7.1	846	hCMV _{enh/prom}	Luciferase
pGZB-Luc	4.5	282	Δ CpG CMV _{enh/prom}	Luciferase
pCpG-Luc	4.7	194	hEF-1	Luciferase

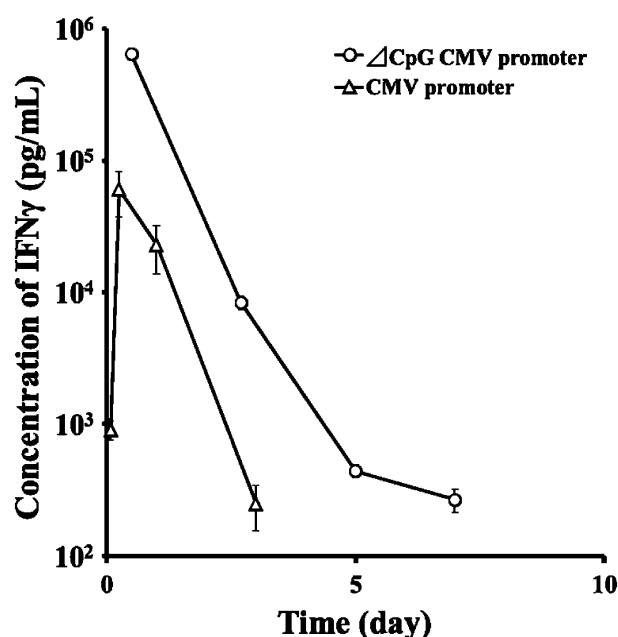


Fig. 1. Effect of CpG Motifs on the Enhancer and the Promoter

Time-courses of serum concentration of human IFN γ after hydrodynamic gene transfer of human IFN γ expressing plasmid DNA. p Δ CpG CMV_{enh/prom}-huIFN γ or phCMV_{enh/prom}-huIFN γ was injected into ICR mice. At indicated time, blood was collected from the tail vein. Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. ($n=4$).

割合がより小さい方が、より高い遺伝子発現効率を得るのに有効であることが示された。

さらに、IFN γ の発現を長期持続化させることで慢性疾患に対する治療効果の改善が可能であるか検証するために、アトピー性皮膚炎モデルマウス、肺転移モデルマウスを用いて検討を行ったところ、一過性の IFN γ 遺伝子発現では十分な治療効果が得られないのに対し、IFN γ を持続的に発現させることで優れた治療効果が得られることも明らかとしている。^{37,38)}

2-2. より安全な遺伝子発現プロファイルを示すプラスミド DNA の構築 前述の検討により持続的に IFN γ を発現させることで慢性疾患に対する有効な治療が得られることが明らかとなった。しかしながら、遺伝子導入直後に一時的ではあるものの定常状態と比べ約 10 倍以上の IFN γ 遺伝子発現が認められ、この高い IFN γ 濃度に起因する体重減少や致死的な作用などの有害事象の発現が観察された。より安全が確保された遺伝子治療を行う上では、投与初期にみられる高い遺伝子発現を抑え、遺伝子発現変動が小さい発現プロファイルが望ましいと考えられる。

従来用いられてきた pDNA には、遺伝子発現効率を上昇させることからウイルス由来である CMV エンハンサが組み込まれたものが多くみられる。実際、前述の検討で持続的な IFN γ 発現が得られた pDNA にも CMV エンハンサが組み込まれている。われわれはこれまでに、遺伝子導入にハイドロダイナミクス法を用いた場合に一過的ではあるが転写因子である nuclear factor- κ B (NF- κ B) 及び activator protein-1 (AP-1) の発現が亢進することを報告している。³⁹⁾ CMV エンハンサには NF- κ B 結合サイト、AP-1 結合サイトが含まれていることから、遺伝子導入直後の高い遺伝子発現はこれら転写因子の活性化によるものと考えられる。しかしながら、pDNA からの遺伝子発現は、pDNA 骨格中のエンハンサ、プロモータ領域によって規定されると考えられるため、単に pDNA からエンハンサを取り除くだけでは遺伝子発現変動が抑えられた pDNA を構築できても、治療効果が期待できるほどの遺伝子発現は得られないと考えられる。そこで、遺伝子発現変動が少なく、より安全な遺伝子治療を達成することを目的に、持続的な遺伝子発現を示す pDNA をプロトタイプベクターとしてエンハンサとプロモータの組み合わせを適宜変更した pDNA を 11 種類構築し、遺伝子発現プロファイルを評価した (Fig. 2)。その結果、エンハンサを除いたプロモータからの遺伝子発現は想定した通り、ウイルス由来 (SV40 プロモータ)、哺乳類由来 (hEF-1 プロモータ) にかかわらず遺伝子発現効率が低く、一過性の遺伝子発現を示したことに對し、CMV エンハンサを挿入することでこれら 2 つのプロモータからの遺伝子発現効率は飛躍的に上昇し、持続的な

遺伝子発現を示したが遺伝子発現変動は大きかった [Figs. 2(b) and (c)]。また、hEF-1 プロモータとは異なる哺乳類由来プロモータである hROSA26 プロモータを組み込んだ pDNA からはエンハンサの有無にかかわらず遺伝子導入直後にみられる一過性の非常に高い遺伝子発現は認められず、実験期間中遺伝子発現変動の少ない安定した遺伝子発現が得られることが明らかとなった [Fig. 2(d)]。³⁵⁾ さらにこの hROSA26 プロモータを組み込んだ IFN γ 発現 pDNA を用いることで、プロトタイプベクターで認められたような遺伝子導入直後の高い IFN γ 濃度に起因する体重減少などの有害作用を回避しつつ、抗ウイルス作用が期待できるレベルの IFN γ を持続的に発現させることが実証できた。hROSA26 プロモータには、転写因子 Sp1 の結合サイトが非常に多く含まれており、Sp1 によって遺伝子発現が誘導されることが知られている。加えて、推定上ではあるが NF- κ B 結合サイト、AP-1 結合サイトがプロモータに占める割合は、CMV プロモータに比べ非常に少ないことから、遺伝子導入後に一過的に発現が亢進する転写因子 NF- κ B や AP-1 による影響が少なく、一定レベルの遺伝子発現が得られたと考えられる。以上のことから、ハイドロダイナミクス法を用いた遺伝子導入において一定レベルで持続的な遺伝子発現を得るためには、エンハンサ/プロモータに結合する転写因子の重要性が示された。

3. 機能性タンパク質融合化による遺伝子発現後の体内動態制御

薬物治療において、その治療効果を最大限に発揮するためには薬物の体内動態を制御し、効率よく薬物を治療標的組織へと送達することが重要と考えられる。遺伝子治療においても例外ではなく、これまでもドラッグデリバリーシステム (drug delivery system; DDS) 技術が広く用いられ、その技術は改良されてきた。例えば、カチオニックリポソームを始めとする様々な非ウイルスベクターが開発され、pDNA の体内動態制御の可能性が数多くの論文で報告されている。しかしながら、遺伝子治療における活性本体は、遺伝子導入後に産生されるタンパク質であり、pDNA の動態制御だけでは活性本体であるタンパク質の体内動態制御が達成されとは限らない。IFN γ を始めとする分泌タンパク質は、遺伝子導入細胞において転写・翻訳された後、細胞外

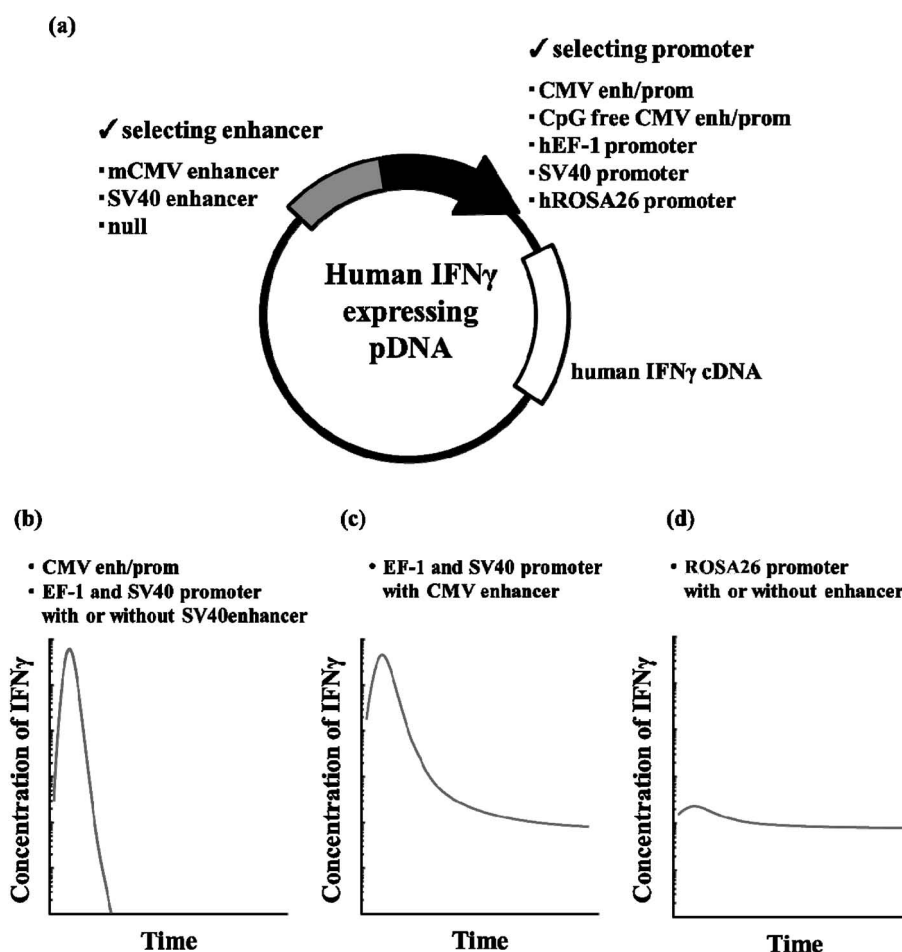


Fig. 2. Schematic Image of Plasmid DNA Used in This Study and Summarized Transgene Expression Profile

(a) Each plasmid DNA was constructed by combination of the enhancer and the promoter. (b) Transient transgene-expression. (c) Sustained transgene-expression with initial surge. (d) Stable transgene-expression without initial surge.

へ分泌され血流を介し体循環へと移行する。そのため、より有効な遺伝子治療を達成するには pDNA だけでなく、発現タンパク質の体内動態をも考慮する必要がある。しかしながら、活性本体であるタンパク質の体内動態制御を試みる報告は、pDNA の動態制御に比べると圧倒的に少ない。

IFN γ は単量体の分子量が 17000–20000 であり、活性本体であるホモ二量体でも約 35000 と比較的小さく、腎臓で糸球体濾過を受けるために消失半減期が短い。この糸球体濾過の過程は、分子サイズに依存することから、IFN γ のサイズを大きくする融合タンパク質を新たにデザインすることで、糸球体濾過による IFN γ の速やかな消失を回避できると考えられる。そこでわれわれは、IFN γ の血中滞留性の改善を目的に、高分子量の血漿タンパク質で、生物活性をほとんど示さないマウス血清アルブミン (mouse serum albumin; MSA) を選択し、⁴⁰⁾ IFN γ と

MSA との融合タンパク質を新たにデザインすることで IFN γ タンパク質の構造修飾による血中滞留化を試みた。培養細胞を用いた IFN γ -MSA 融合タンパク質の生物活性の評価からは、IFN γ -MSA 融合タンパク質の生物活性は天然型 IFN γ と比較して 1 % 以下まで減少することが明らかとなった (Fig. 3)。しかしながら、マウスに IFN γ -MSA 融合タンパク質を静脈内投与したところ、血中濃度時間曲線下面積 (AUC) は天然型 IFN γ の約 10 倍大きい値となり、MSA 融合化により IFN γ の血中滞留性が改善できることが実証された (Fig. 4)。⁴¹⁾ この生物活性の低下は MSA を融合することで生じる立体障害により、IFN γ -MSA 融合タンパク質中の IFN γ 部位と IFN γ 受容体との相互作用が低下するためと考えられる。また、以上の結果は IFN γ 融合タンパク質を設計する上で、目的とする機能と IFN γ 生物活性を両立することの重要性を示していると考えられ

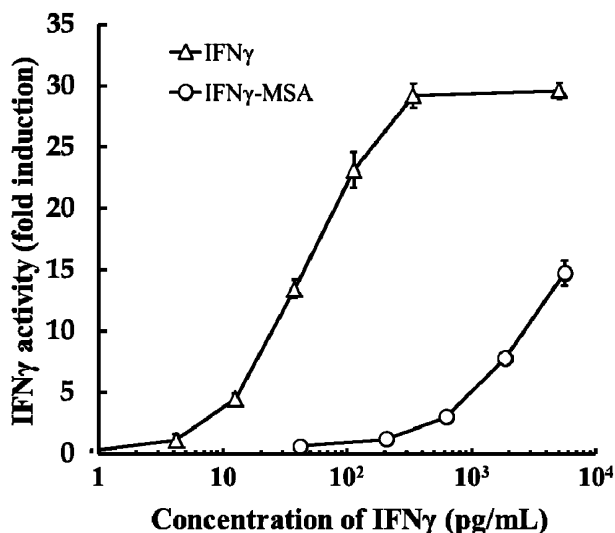


Fig. 3 Biological Activity of IFN γ -MSA Fusion Protein
B16-BL6 cells transfected with pGAS-Luc (reporter) and phRL-TK (indicator) were incubated with serial dilutions of IFN γ and IFN γ -MSA for a further 24 h. Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M ($n=4$).

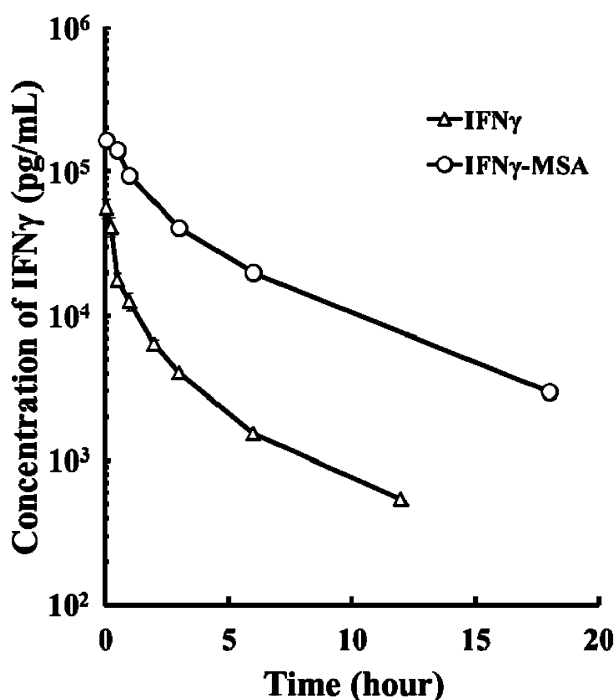


Fig. 4. Blood Clearance of IFN γ and IFN γ -MSA Proteins after Intravenous Injection into Mice
The concentration of IFN γ and IFN γ -MSA was measured by ELISA. Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. ($n=4$).

る。

腫瘍組織では、血管透過性が亢進しており、血中滞留性を示す高分子は enhanced permeability and retention 効果により腫瘍組織に集積することが報告されている。したがって、高い血中滞留性を示し

た IFN γ -MSA 融合タンパク質も IFN γ と比較して腫瘍組織に集積し易いと考えられる。そこで、各 pDNA を肺転移モデルマウスに投与したところ、IFN γ -MSA 融合タンパク質発現 pDNA は、天然型 IFN γ 発現 pDNA と同程度のがん転移抑制効果を示した。⁴¹⁾ 以上の結果は、融合タンパク質をデザインすることで遺伝子発現後の IFN γ の体内動態を制御することが可能であり、IFN γ 遺伝子治療を増強できる有用な方法論になり得ることが示された。受容体との相互作用に影響を与えないような誘導体化を実現することで、活性を保持した血中滞留型 IFN γ 融合タンパク質が開発できるものとする。

4. おわりに

本稿では、プラスミド DNA をデザインすることで遺伝子発現プロファイルの制御、また、遺伝子発現後の発現タンパク質の動態制御が可能であることを示した。しかしながら、治療上有効な遺伝子治療を達成するには、DDS 技術の改良、遺伝子発現量・遺伝子発現期間の確保、発現タンパク質の動態制御など解決すべき問題が山積である。これらの問題を解決するには、薬学、医学、理学、工学と多分野にわたる技術連携が必要であり、これら多岐にわたる技術を融合することで遺伝子導入から遺伝子発現に至る一連の過程について時空間分布を制御することでより有効な遺伝子治療が実現できるものと期待する。

REFERENCES

- 1) Grassegger A., Höpfl R., *Clin. Exp. Dermatol.*, **29**, 584–588 (2004).
- 2) Ellis C. N., Stevens S. R., Blok B. K., Taylor R. S., Cooper K. D., *Clin. Immunol.*, **92**, 49–55 (1999).
- 3) Jang I. G., Yang J. K., Lee H. J., Yi J. Y., Kim H. O., Kim C. W., Kim T. Y., *J. Am. Acad. Dermatol.*, **42**, 1033–1040 (2000).
- 4) Stevens S. R., Hanifin J. M., Hamilton T., Tofte S. J., Cooper K. D., *Arch. Dermatol.*, **134**, 799–804 (1998).
- 5) Noh G. W., Lee K. Y., *Allergy*, **53**, 1202–1207 (1998).
- 6) Dumortier J., Schöning K., Oberwinkler H., Löw R., Giese T., Bujard H., Schirmacher P., Protzer U., *Gene Ther.*, **12**, 668–677 (2005).
- 7) Frese M., Schwärzle V., Barth K., Krieger N.,

- Lohmann V., Mihm S., Haller O., Barten-schlager R., *Hepatology*, **35**, 694–703 (2002).
- 8) Soza A., Heller T., Ghany M., Lutchman G., Jake L. T., Germain J., Hsu H. H., Park Y., Hoofnagle J. H., *J. Hepatol.*, **43**, 67–71 (2005).
- 9) Yang P. L., Althage A., Chung J., Chisari F. V., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 13825–13830 (2002).
- 10) Foon K. A., Sherwin S. A., Abrams P. G., Stevenson H. C., Holmes P., Maluish A. E., Oldham R. K., Herberman R. B., *Cancer Immunol. Immunother.*, **20**, 193–197 (1985).
- 11) Sonnenblick M., Rosin A., *Chest*, **99**, 557–561 (1985).
- 12) Sriskandan K., Garner P., Watkinson J., Pettingale K. W., Brinkley D., Calman F. M., Tee D. E., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **18**, 63–68 (1986).
- 13) Ishihara H., Hara T., Aramaki Y., Tsuchiya S., Hosoi K., *Pharm. Res.*, **7**, 542–546 (1990).
- 14) Yu H., Grainger D. W., *J. Control. Release*, **34**, 117–127 (1995).
- 15) Yang J., Cleland J. L., *J. Pharm. Sci.*, **86**, 908–914 (1997).
- 16) Stone R. M., Spriggs D. R., Arthur K. A., Mayer R. J., Griffin J., Kufe D. W., *Am. J. Clin. Oncol.*, **16**, 159–163 (1993).
- 17) Thom A. K., Fraker D. L., Taubenberger J. K., Norton J. A., *Surg. Oncol.*, **1**, 291–298 (1992).
- 18) Mani S., Poo W. J., *Am. J. Clin. Oncol.*, **19**, 149–153 (1996).
- 19) Jain A., Jain S. K., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **25**, 403–447 (2008).
- 20) Harris J. M., Chess R. B., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2**, 214–221 (2003).
- 21) John Wiley and Sons Ltd. Journal of Gene Medicine. “Gene Therapy Clinical Trials Worldwide.”: (<http://www.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical/>), cited 16 October, 2012.
- 22) Kawakami S., Higuchi Y., Hashida M., *J. Pharm. Sci.*, **97**, 726–745 (2008).
- 23) Li S., Huang L., *J. Control. Release*, **123**, 181–183 (2007).
- 24) Liu F., Song Y., Liu D., *Gene Ther.*, **6**, 1258–1266 (1999).
- 25) Ehrlich M., Gama-Sosa M. A., Huang L. H., Midgett R. M., Kuo K. C., McCune R. A., Gehrke C., *Nucleic Acids Res.*, **10**, 2709–2721 (1982).
- 26) Klinman D. M., Yi A. K., Beaucage S. L., Conover J., Krieg A. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 2879–2883 (1996).
- 27) Sparwasser T., Miethke T., Lipford G., Erdmann A., Häcker H., Heeg K., Wagner H., *Eur. J. Immunol.*, **27**, 1671–1679 (1997).
- 28) Kumagai Y., Takeuchi O., Akira S., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 795–804 (2008).
- 29) Hyde S. C., Pringle I. A., Abdullah S., Lawton A. E., Davies L. A., Varathalingam A., Nunez-Alonso G., Green A. M., Bazzani R. P., Sumner-Jones S. G., Chan M., Li H., Yew N. S., Cheng S. H., Boyd A. C., Davies J. C., Griesenbach U., Porteous D. J., Sheppard D. N., Munkonge F. M., Alton E. W., Gill D. R., *Nat. Biotechnol.*, **26**, 549–551 (2008).
- 30) Stirzaker C., Song J. Z., Davidson B., Clark S. J., *Cancer Res*, **64**, 3871–3877 (2004).
- 31) Mutskov V., Felsenfeld G., *EMBO J.*, **23**, 138–149 (2004).
- 32) Clark S. J., Melki J., *Oncogene*, **21**, 5380–5387 (2002).
- 33) Brooks A. R., Harkins R. N., Wang P., Qian H. S., Liu P., Rubanyi G. M., *J. Gene Med.*, **6**, 395–404 (2004).
- 34) Ando M., Takahashi Y., Nishikawa M., Watanabe Y., Takakura Y., *J. Gene Med.*, **14**, 288–295 (2012).
- 35) Mitsui M., Nishikawa M., Zang L., Ando M., Hattori K., Takahashi Y., Watanabe Y., Takakura Y., *J. Gene Med.*, **11**, 435–443 (2009).
- 36) Chen Z. Y., Riu E., He C. Y., Xu H., Kay M. A., *Mol. Ther.*, **16**, 548–556 (2008).
- 37) Kawano H., Nishikawa M., Mitsui M., Takahashi Y., Kako K., Yamaoka K., Watanabe Y., Takakura Y., *Int. J. Cancer*, **121**, 401–406 (2007).
- 38) Hattori K., Nishikawa M., Watcharanurak K., Ikoma A., Kabashima K., Toyota H., Takahashi Y., Takahashi R., Watanabe Y., Takakura Y., *J. Immunol.*, **184**, 2729–2735 (2010).
- 39) Nishikawa M., Nakayama A., Takahashi Y., Fukuhara Y., Takakura Y., *Hum. Gene Ther.*, **19**, 1009–1020 (2008).

-
- 40) Peters T., “All about Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications,” Academic Press, 1996.
- 41) Miyakawa N., Nishikawa M., Takahashi Y., Ando M., Misaka M., Watanabe Y., Takakura Y., *J. Pharm. Sci.*, **100**, 2350–2357 (2011).