

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610097858.X

[51] Int. Cl.

C08F 126/02 (2006.01)

C08J 3/24 (2006.01)

C08K 5/10 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年10月14日

[11] 授权公告号 CN 100549044C

[22] 申请日 2006.11.16

[21] 申请号 200610097858.X

[73] 专利权人 南京慧基生物技术有限公司

地址 210000 江苏省南京市鼓楼区定淮门
12号世界之窗科技软件园15号楼

[72] 发明人 董伟 魏云珍

[56] 参考文献

WO2006/041617 A 2006.4.20

审查员 肖刚

[74] 专利代理机构 南京知识律师事务所

代理人 卢亚丽

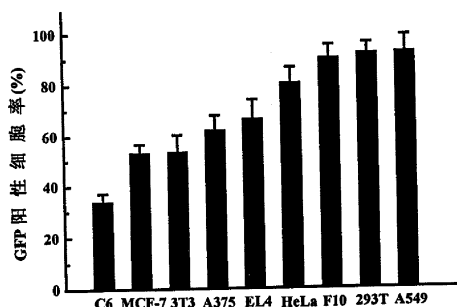
权利要求书1页 说明书16页 附图6页

[54] 发明名称

可生物降解的交联聚乙烯亚胺及其应用

[57] 摘要

本发明公开了用于输送药物和其他生物活性剂的可在生理条件下降解的交联聚乙烯亚胺及其制备方法和应用。具体为：以各种二酸的缩水甘油酯、丙烯酸/甲基丙烯酸缩水甘油酯或各种多元醇或多元缩醇的丙烯酸/甲基丙烯酸的多元酯中的一种或上述几种的复合物为交联剂在适当条件下与各种分子量的线型或分枝状聚乙烯亚胺发生交联反应合成出对各种细胞和生物体组织具有基因转染功能的非病毒基因转染载体。本发明提供的生物活性剂的传输载体可以用于药物，特别是核酸或阴离子型的生物活性物质的传递，使用本发明制备的载体可以在体外实现对各种细胞的高效，低毒性的转染，在体内可实施高效，低毒性的局部或系统给药。



1. 一种可生物降解的交联聚乙烯亚胺，是由分子量为 200-100000 Da 的线性或分枝状的聚乙烯亚胺与分子量为 50-50000 Da 的含有在生理条件下可降解酯键的交联剂反应而合成，其中聚乙烯亚胺与交联剂的摩尔比是 0.1:1-5:1；所说的交联剂是各种二酸的缩水甘油酯、丙烯酸/甲基丙烯酸缩水甘油酯或各种多元醇或多元缩醇的丙烯酸/甲基丙烯酸多元酯中的一种或几种的复合物。

2. 如权利要求 1 所述的交联聚乙烯亚胺，进一步偶联各种靶向分子，从而获得各种靶向交联聚乙烯亚胺；所说的靶向分子为：转铁蛋白，脱唾液酸糖蛋白，抗体/抗体片段，低密度脂蛋白，白细胞介素，GM-CSF，G-CSF，M-CSF，干细胞生长因子，促红细胞生成素，表皮生长因子，胰岛素，叶酸，乳糖，半乳糖，脱唾液酸血清类粘蛋白，甘露糖，甘露糖-6-磷酸，N-乙酰基乳糖胺，凝血调节蛋白，融合剂，血凝素 HA2 或核定位信号。

3. 如权利要求 1 所述的交联聚乙烯亚胺，进一步地被糖基化、聚乙二醇化、酰基化或烷基化，从而获得各种交联聚乙烯亚胺的衍生物。

4. 如权利要求 1 所述的交联聚乙烯亚胺，进一步地被糖基化、聚乙二醇化、酰基化或烷基化后，再进一步偶联各种靶向分子，从而获得各种靶向交联聚乙烯亚胺；所说的靶向分子为：转铁蛋白，脱唾液酸糖蛋白，抗体/抗体片段，低密度脂蛋白，白细胞介素，GM-CSF，G-CSF，M-CSF，干细胞生长因子，促红细胞生成素，表皮生长因子，胰岛素，叶酸，乳糖，半乳糖，脱唾液酸血清类粘蛋白，甘露糖，甘露糖-6-磷酸，N-乙酰基乳糖胺，凝血调节蛋白，融合剂，血凝素 HA2 或核定位信号。

5. 如权利要求 1-4 之一所述的交联聚乙烯亚胺，在体外用于基因转染试剂，以及用做生物活性剂的传输载体。

6. 一种组合物，它含有权利要求 1 所说交联聚乙烯亚胺和核酸。

7. 如权利要求 6 所说的组合物，其中所述的核酸是指 DNA、治疗基因、RNA、催化活性核酸、反义寡核苷酸或修饰的核酸。

8. 一种组合物，它含有权利要求 2 或 4 所说的靶向交联聚乙烯亚胺和核酸。

9. 一种用核酸转染体外细胞的方法，它包括使体外细胞与权利要求 1 所说的交联聚乙烯亚胺与核酸构成的组合物接触的步骤。

10. 一种试剂盒，它含有权利要求 1 所说的交联聚乙烯亚胺和指导将上述物质和核酸结合用于核酸转染细胞的说明。

可生物降解的交联聚乙烯亚胺及其应用

技术领域

本发明属于生物技术领域，具体地说，涉及一类可用于体外各种细胞和体内组织或器官的生物活性物的传输载体和实施方式，是将各种药物，蛋白，多肽，特别是 DNA，RNA，及编码治疗基因的表达质粒转入细胞或组织和器官。本发明还涉及此传输载体的制备和用途。本发明的另一个目的是提供一种基因递送的组合物及方法，其中基因载体是可生物降解的和生物相容的。

技术背景

基因治疗是指将外源基因转入细胞内部，通过恢复或增添基因表达以纠正人自身基因结构或功能上的错乱，阻止病变的发展，杀灭病变的细胞，或抑制外源病原体遗传物质的复制，从而达到治病的目的。目前基因治疗被认为是一个非常具有前景的治疗方法，它不仅能够治疗遗传缺陷性疾病，而且可以发展出治疗或防止慢性病，例如癌症，心血管病和类风湿性关节炎等的方法。基因治疗包括三个重要的环节，即目的基因，转基因载体和靶细胞。安全高效的基因传递系统是成功进行基因治疗的技术核心。基因治疗的载体主要有病毒载体和非病毒载体，尽管病毒载体转染效率高，但由于病毒载体有一些严重的缺点，例如包装容量有限，制备复杂，有免疫原性(体内不能反复使用)和潜在的安全危险。人工合成的非病毒载体受到了极大的关注[1]，非病毒载体具有安全性高，免疫原性低，易于对DNA进行操作等优点，所以近来人们越来越重视人工合成的非病毒载体的研究[2]。目前已经合成了多种非病毒载体，其中聚合物基因载体占有重要的地位。研究较多的聚合物基因治疗体系主要有阳离子多聚物型载体、非缩聚型聚合物体系、可生物降解的聚合物体系、多复合脂质体体系、热敏感聚合物体系及聚合型胶束体系等。尽管在非病毒载体研究的早期，人们的主要兴趣放在脂质体上，但是近年来的研究发现，阳离子型的脂质体基因载体，在重复的使用中被发现有很高的细胞毒性，并且在体内有潜在的抗炎性表现，和淋巴细胞在体内长期培养，脂质体会产生很高的毒性。最近也有研究表明它也有一些结构上的缺点。比如：脂质体的疏水基团决定了它的形状，大小，在水相的稳定性以及同其他脂质体、细胞膜、DNA等的相互作用。这最终就影响了脂质体聚合物的转染效率[3, 4]。正因为控制脂质体的大小比较困难而使它的性质随着时间的变化而变得不稳定[5]。还有脂质体的复合物在应用时，为了提高其转染效率，常常需要一些辅助物[6]。总之，脂质体作为基因转导媒介，从整体上看，在人体中转导效率低，缺乏有效的染色体整合机制。脂质体特别是阳离子脂质体作为基

因载体具有一定潜力,但基因表达效率低,体内不稳定一直是困扰医学界的难题。由于病毒载体以及阳离子脂质体所存在的局限性,因而,人们对阳离子聚合物作为基因载体的兴趣越来越高。研究得比较多的阳离子型转基因载体有聚赖氨酸(PLL)、聚乙烯亚胺(PEI)以及以乙二胺为核的聚酰胺-胺树枝状高分子(EDA-PAMAM),其中树枝状高分子和聚乙烯亚胺(PEI)的应用尤其受到重视。富含胺基的树枝状高分子(Dendrimer)和分枝状聚乙烯亚胺(PEI)是近年来引起重视的高分子材料,在正常生理环境下,由于胺基质子化从而带上正电荷会与带负电的DNA相互作用,形成纳米尺寸的超分子复合物,而树枝状和分枝状的独特结构,使得它们与DNA形成的复合物极易进入细胞,从而将基因转入。如果对它们进行修饰,如连接特定蛋白、受体,携带磁性等,便可以使基因转移具有靶向性。实验中通过控制它们与DNA相互作用的配比,控制其与DNA复合物的大小,引入对细胞膜有亲和性的基团,调整它们的亲水亲油平衡值,均可显著提高基因转移效率。然而,树枝状复合物合成方法相对复杂,每步反应需要准确控制,合成中随着分子量的增加,每一代样品的分离和纯化都会变得越来越困难。而PEI有多种结构和分子量的产品可供选择,各种线性,分枝状和超高分枝状的PEI的合成技术和工艺成熟,因此以PEI为结构基础可以很方便地设计并合成出一系列新型的基因载体。

以往的基因载体与病毒载体相比其转染效率较低,同时一般都有较大的细胞毒性,部分原因可能是其缺少生物降解性,因此近年来人们开始致力于研究生物可降解性载体[7-12],理想的基因载体应该是在其高效转染的使用剂量下是低毒性或无毒性,同时为了能避免在体内应用时产生毒副作用,生物可降解性是非常重要的。但目前研究的可降解阳离子聚合物只取得了有限的成功[13-15]。聚乙烯亚胺是迄今为止转染效率最高的非病毒载体之一,其转染效率在一些细胞上可以与病毒载体媲美,因此目前经常被用来做为新的基因转染载体评价物,将新设计与新开发的基因转染载体与之比较。但它的高转染效率往往伴随着较大的细胞毒性。一般来说2000Da以下的聚乙烯亚胺无细胞毒性,但也没有转染效率[16,17],25kDa聚乙烯亚胺有较高的转染效率,但有较大的细胞毒性[18]。因此许多研究集中于对其进行化学修饰使其偶联各种糖基,环糊精等,从而降低细胞毒性。近来许多研究采用各种交联剂对无毒副作用小分子聚乙烯亚胺进行交联,从而获得高效低毒性的可生物降解的聚乙烯亚胺[9,10,15]。但是与大多数阳离子聚合物及聚乙烯亚胺相似,这些交联的聚乙烯亚胺在生理条件下与DNA形成复合物后容易聚集为较大的颗粒[19-22]。Daniel G. [23]将各种双丙烯酸酯与各种小分子胺类化合物进行交联合成了上千种聚合物,研究发现含有羟基的胺类单体与憎水性双丙烯酸酯交联剂交联所得到的产品具有最高的转染效率。Zhong Z的研究发现在聚合物中增加疏水片段能够加强其与细胞膜的疏水相互作用,从而提高其对细胞膜的亲和性,但这种与细胞膜的疏水相互作用同时也对细胞膜有损害[24]。因此合理地调控所合成的聚合物的亲水亲油平衡值是非常重要的。

发明内容

我们分析后,认为细胞膜表面有许多糖基受体,糖分子中有许多羟基,与之相似在聚合物中引入羟基可能增加了其对细胞膜的亲和性,而交联剂的憎水性也促进了聚合物与细胞膜的疏水相互作用,所以提高了转染效率。我们采用 200-100000Da 的线性,分枝状和超高分枝状聚乙烯亚胺和各种二酸的缩水甘油酯,丙烯酸/甲基丙烯酸缩水甘油酯进行交联,由于交联剂中的环氧基在交联反应时生成羟基,交联剂中的脂肪链具有憎水性,双键与环氧键的反应条件相似,所以可以在分枝状聚乙烯亚胺中同时引入羟基和憎水性的脂肪链从而改善聚乙烯亚胺在生理条件下溶解性。由于小分子聚乙烯亚胺富含各种胺基,所以与 Daniel G.的研究工作相比,这种交联更容易提高产物的转染效率。将以上交联方法与各种多元醇(多元缩醇)的丙烯酸/甲基丙烯酸的多元酯复合使用可以调节所合成的聚合物的亲水亲油平衡值从而制备高效低毒的基因载体。由于所合成的这些高效低毒的基因载体含有羟基和胺基,所以可以非常容易地将各种靶向分子偶联上,这些研究目前尚未见报道。

因此,本发明的目的是提供一种生物可降解的交联聚乙烯亚胺,及其合成方法和使用方案。

所说的可生物降解的交联聚乙烯亚胺,是由线性或分枝状的聚乙烯亚胺与交联剂反应而合成,聚乙烯亚胺与交联剂的摩尔比是 0.1:1-5:1;所说的聚乙烯亚胺的分子量是 200-100000 Da,优选 600-20000 Da;所说的交联剂含有在生理条件下可降解的酯键,分子量是 50-50000 Da,优选 100-20000 Da。

这种交联聚乙烯亚胺可以将药物或各种生物活性物例如各种蛋白,多肽,特别是 DNA, RNA, 及编码治疗基因的表达质粒转入体外各种细胞和体内各种组织或器官。尽管小分子(200-2000Da)的聚乙烯亚胺对细胞或组织器官没有毒性,但同时也基本上没有转染性能。采用各种含有生物可降解键的交联剂交联这些富含各种胺基的小分子聚乙烯亚胺从而获得较高分子量的聚乙烯亚胺。这种合成产物由于具有聚乙烯亚胺的结构和合适的分子量,所以具有高效的基因传递性能,同时由于其本身无细胞毒性以及进入细胞后在生理条件下可以降解为无细胞毒性的小分子聚乙烯亚胺,所以在其使用中毒性很小。

上述所说的含有在生理条件下可降解酯键的交联剂,包括各种二酸的缩水甘油酯、丙烯酸/甲基丙烯酸缩水甘油酯或各种多元醇或多元缩醇的丙烯酸/甲基丙烯酸的多元酯中的一种或几种的复合物。

小分子量(200-20000Da)的线性或分枝状聚乙烯亚胺与各种二酸的缩水甘油酯或烯酸缩水甘油酯交联可以在聚乙烯亚胺结构中引入羟基,从而改善其生理条件下的溶解性和提高对细胞膜的亲和性。小分子量(200-20000Da)的线性或分枝状聚乙烯亚胺与各种多元醇或多元缩醇的丙烯酸/甲

基丙烯酸多元酯交联可以在聚乙烯亚胺结构中引入适当的疏水/亲水结构，从而改善交联产物对细胞膜的疏水相互作用。如果将聚乙烯亚胺与多元醇的丙烯酸/甲基丙烯酸的多元酯（例如季戊四醇三丙烯酸酯或季戊四醇四丙烯酸酯）反应可以增加交联产物的枝化度，从而调节降解速率，实现药物或生物活性物质的控制释放。将聚乙烯亚胺与以上三种交联剂的复合物反应可以进一步地调节产物的亲水亲油平衡值、枝化度，从而合成出各种结构的基因转染载体。

以上所述的多元醇或多元缩醇的丙烯酸/甲基丙烯酸的多元酯包括：乙氧基化 1,6-己二醇二丙烯酸酯 (EO-HDDA)，二缩三丙二醇二丙烯酸酯 (TPGDA)，二丙二醇二丙烯酸酯 (DPGDA)，丙二醇二丙烯酸酯 (PGDA)，新戊二醇二丙烯酸酯 (NPGDA)，丙氧基化(2)新戊二醇二丙烯酸酯 (PO-NPGDA)，乙二醇双丙烯酸酯 (EGDA)，二乙二醇双丙烯酸酯 (DEGDA)，三乙二醇双丙烯酸酯 (TEGDA)，四乙二醇双丙烯酸酯 (TEGDA)，1,6-己二醇二丙烯酸酯 (HDDA)，1,4-丁二醇二丙烯酸酯 (BDDA)，季戊四醇四丙烯酸酯，季戊四醇三丙烯酸酯，双季戊四醇五丙烯酸酯，聚乙二醇(200)双丙烯酸酯 [PEG(200)DA]，聚乙二醇(400)双丙烯酸酯 [PEG(400)DA]，新戊二醇二甲基丙烯酸酯 (NPGDMA)，三羟甲基丙烷三甲基丙烯酸酯 (TMPTMA)，二缩三丙二醇二甲基丙烯酸酯 (TPGDMA)，二丙二醇二甲基丙烯酸酯 (DPGDMA)，丙二醇二甲基丙烯酸酯 (PGDMA)，二甲基丙烯酸乙二醇酯 (GDMA)，二乙二醇二甲基丙烯酸酯 (DEGDMA)，三乙二醇双甲基丙烯酸酯 (TRGDMA)，四乙二醇双甲基丙烯酸酯 (TEGDMA)，季戊四醇三甲基丙烯酸酯 (PETMA)，季戊四醇四甲基丙烯酸酯，1,6-己二醇二甲基丙烯酸酯 (HDDMA)，1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯，甲基丙烯酸缩水甘油酯 (GMA)，丙烯酸缩水甘油酯 (GA)，聚乙二醇(200)二甲基丙烯酸酯，聚乙二醇(400)二甲基丙烯酸酯，1,3-丁二醇二甲基丙烯酸酯，邻苯二甲酸二甘醇二丙烯酸酯。

本发明还提供了上述生物可降解的交联聚乙烯亚胺的衍生物，是将可生物降解的交联聚乙烯亚胺，进一步地被糖基化、聚己二醇化、酰基化或烷基化，从而获得各种交联聚乙烯亚胺的衍生物。

本发明还公开了基于上述生物可降解的交联聚乙烯亚胺及其衍生物的各种靶向交联聚乙烯亚胺。

基于高分子材料的非病毒基因载体不仅安全，而且具有大量的活性官能基团易于被修饰的特性，可以通过特定的修饰反应，赋予基因载体细胞间靶向传递的能力。由于合成的产品中含有胺基和羟基，所以这些基团可以直接的或经适当的连接臂与靶向配体偶联，这些连接分子是聚乙二醇(PEG)链、聚琥珀酸、聚癸二酸(PSA)、聚-L-谷氨酸、寡糖、氨基酸链、或其他任何适合的连接物。在特定的聚合物或聚合反应中，可以有多种类型的连接物。优选表示由碳与氧构成的线性或支化的聚合物，其中适当也可含有环状的，星型的或树状的结构，例如象线性 PEG 残基，多侧枝的接枝 PEG，星型 PEG，但优选线性及多侧枝的接枝及星型 PEG。后者可从 Aldrich, Fluka, Sigma 及

Nectar (shearwater) 商业途径得到。

靶向分子可为一种针对特定的相互作用并吸收进入目标器官组织或细胞的配体，例如转铁蛋白，脱唾液酸糖蛋白(ASGP)，抗体/抗体片段，低密度脂蛋白，白细胞介素，GM-CSF，G-CSF，M-CSF，干细胞生长因子，促红细胞生成素(EPO)，表皮生长因子(EGF)，胰岛素，叶酸，乳糖，半乳糖，脱唾液酸血清类粘蛋白，甘露糖，甘露糖-6-磷酸，N-乙酰基乳糖胺，凝血调节蛋白，融合剂，血凝素 HA2 和核定位信号(nucleus localization signals NLS)。

本发明的交联聚乙烯亚胺能够通过肝细胞表面上的半乳糖基受体介导所选择的核酸通过胞吞有效地传递肝细胞或肝脏组织。靶向其他组织的基因传递可以通过偶联相应的靶向分子实施，例如甘露糖-6-磷酸(定向单核细胞)、甘露糖(定向巨噬细胞和某些 B-细胞)、N-乙酰基乳糖胺(定向 T-细胞)、半乳糖(定向黑色素瘤细胞)、葡萄糖(定向结肠癌细胞)和凝血调节蛋白(定向小鼠肺内皮细胞)等。

在基因传递系统中，颗粒大小的优化是非常关键的，因为颗粒大小经常控制体内的转染效率、细胞毒性和组织定向。参见 Haensler, J. and Szoka, F. C., Jr. *Bioconjugate Chem.* 1993, 4, 372-379。通常，基因递送颗粒的尺寸不应超过病毒的大小，从而使得基因递送颗粒能够有效地渗透到组织中。本发明中，通过使用交联剂与聚合物的不同组合可以容易地改变颗粒的大小。单个聚合物的尺寸和结构决定聚集数—即聚集形成胶束的单个共聚物的数目。因此，尺寸和结构部分控制聚合物与核酸形成的复合物—即胶束的颗粒大小。而颗粒大小又可以进一步由制备颗粒的条件和方法控制。通过改变所合成的阳离子聚合物的化学组成和结构、分子量和电荷密度，可以容易地控制聚合物与核酸形成的复合物的颗粒大小和电荷密度。本发明的优势在于所合成的基因载体与 DNA 形成的复合物的粒径，电荷密度易于控制。由于转染复合物的粒径大小对转染效率，细胞毒性及复合物体内分布和组织靶向性有较大的影响，所以为了能有效进入细胞或穿透组织，一般转染复合物的粒径要小于病毒颗粒的大小。本发明通过采用各种交联剂组合交联小分子 PEI，控制合成聚合物的亲水亲油平衡值，从而调节复合物的粒径的尺寸。具体为优化所合成的基因载体组成及其与 DNA 形成复合物的比例后，所形成的复合物的粒径范围是 20—200 纳米。据悉不同大小的粒子被注射到体内时会在体内不同的器官里积聚。例如小于 150 纳米的粒子经系统给药后，能够透过肝脏内皮的窦状小管的薄膜开口，停留在脾，骨髓及肿瘤等组织中。利用本发明所生产的新型阳离子多聚物与各种质粒或寡核苷酸作用，其所形成的微颗粒粒径大小是完全可控的，具有极好的分散度，从而具有良好的组织或器官靶向性。业内普遍认为：微粒、纳米球和微球在被注射到体内之后，它们在不同器官的相对分布比率取决于其颗粒大小。例如，对于粒径低于 150 nm 大小的微粒，系统注射后，它可以透过肝脏内皮的窦状小管的薄膜开口，进而可以到达胰脏、骨髓及肿瘤组织。对于粒径在 100 nm—200 nm

之间的微粒，静脉、动脉或者腹腔注射后，通常容易被血流中来自于网状内皮组织的巨噬细胞吞噬。

本发明所说的交联聚乙烯亚胺，在体外用于基因转染试剂和体内用于基因治疗的药物传输系统，以及用做药物、蛋白、多肽等生物活性剂的传输载体。

一种组合物，它含有上述所说交联聚乙烯亚胺和核酸。所述的核酸是指 DNA、治疗基因、RNA、催化活性核酸、反义寡核苷酸或修饰的核酸。

一种组合物，它含有上述所说的靶向交联聚乙烯亚胺和核酸。

一种用核酸转染细胞的方法，它包括使细胞与上述所说的交联聚乙烯亚胺与核酸构成的组合物接触的步骤。

一种试剂盒，它含有上述所说的交联聚乙烯亚胺和指导将上述物质和核酸结合用于核酸转染细胞的说明。

根据本发明得到的可生物降解的生物相容性的交联聚乙烯亚胺及其衍生物，是无免疫原性和无毒的。本文公开的优选聚合物降解成为可由肾排泄的无毒小分子，该聚合物在所要求的基因表达期间是惰性的。通过简单的水解反应进行降解。当聚合物主链包含酯键时，以简单水解进行的降解作用占主导地位的。通过使用不同种类和分子量的交联剂，可以改变降解期的长短。因此，可以用生物降解性聚合物进行基因传递，以解决聚阳离子基因载体相关的毒性问题。众所周知，大多数聚阳离子基因载体具有严重的细胞毒性，如果在体内长期存在会引起严重后果。因此，优选的基因载体应在完成作用之后能够降解成为无毒产物。本发明使用可生物降解的含有酯键的交联聚乙烯亚胺，所述的这些聚合物具有安全的、可生物相容的降解途径。这样的聚合物有利于制备注射用的可以持久和连续释放的包裹药物的配方。本发明的高度支链化的分子结构可以进一步降低细胞毒性，因为诸如树枝状的聚酰胺型胺类的分支聚阳离子的细胞毒性比线性聚阳离子的细胞毒性低。参见 Haensler, J. and Szoka, F. C., Jr. *Bioconjugate Chem.* 1993, 4, 372-379。因而，由于降低了细胞毒性，本发明的聚合物的有利组分和结构将是人们所期待的。

附图说明

图1 是交联PEI 在PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4) 中的降解情况。将合成的交联PEI溶解于PBS中，在37℃下放置一段时间，采用毛细管粘度方法测定分子量并将聚合物的分子量与时间作图。

图2 是交联PEI/DNA 复合物的琼脂糖凝胶电泳，结果表明所合成的交联PEI与PEI 25 kDa有一致的结合DNA的能力。Lane 1: DNA only; from lane 2 to 7, the polymer:DNA ratio (w/w) is 0.1:1 (lane 2), 0.2:1 (lane 3), 0.3:1 (lane 4), 0.35:1 (lane 5), 0.4:1 (lane 6) and 0.45:1 (lane 7). (A) Cross-linked PEI (B) 25 kDa PEI.

图3 表明，当交联 PEI 与 DNA 在 PBS 中形成的复合物用含血清的完全培养基稀释后，能够稳定该复合物对抗盐诱导的聚集。

图4 是交联 PEI 与 25 kDa PEI 对细胞的毒性的对比，结果表明所合成的交联 PEI 的细胞毒性明显地小于 25 kDa PEI。

图5 是各种转染试剂在最佳转染条件下进行基因转染后，HEK293 细胞存活百分率对比

图6 是交联 PEI 介导 GFP 质粒在各种细胞中转染 24 小时后的荧光照片、白光照片和二者叠加照片。

图7 是所合成的交联 PEI 对不同细胞转染 24 小时后用流式细胞仪分析其转染效率。

图 8 是 CLPEI 和 Gal-PEI 对不同细胞的转染效率的比较。

图 9 是 CLPEI 和 FOL-PEI 对不同细胞的转染效率的比较。

图 10 是在各自优化的转染条件下, 交联的 PEI 与各种商业化的转染试剂及 25kDa PEI 分别介导 GFP 在 NIH 3T3 细胞中的转染效率比较。

图 11 RT-PCR 分析交联 PEI 介导 EGFR 的 RNA 干扰质粒影响 EGFR 的 mRNA 水平情况。

其中 1: PBS/PBS; 2: CLPEI/PBS; 3: CLPEI/干扰质粒; 4: CLPEI/对照干扰质粒

图 12 Western blotting 分析交联 PEI 介导 Erk 的 RNA 干扰质粒影响 Erk 蛋白表达情况。

其中 1: A549; 2: A549 + siRNA; 3: HeLa; 4: HeLa + siRNA

图 13 Western blotting 分析交联 PEI 介导 PTEN 的 RNA 干扰片段影响 PTEN 蛋白表达情况

其中 1: CLPEI/化学合成的干扰片段对照; 2: CLPEI/化学合成的干扰片段 3: CLPEI/化学合成的干扰片段对照; 4: CLPEI/化学合成的干扰片段。其中 1 和 2 为 A549 细胞, 3 和 4 为 HeLa 细胞。

图 14 是交联 PEI 介导 GFP 在 C57 小鼠肌肉部位转染三天后的荧光照片、白光照片和二者叠加照片。

图 15 是交联 PEI 介导 GFP 在 C57 小鼠 B16F10 肿瘤部位转染三天后的荧光照片和白光照片。

具体实施方式

现在对本发明进行一般性的描述, 结合下面的实施例可以更容易的理解本发明, 这些实施例只是用来解释本发明的特定方面和实施方案, 而不是用来限制本发明。

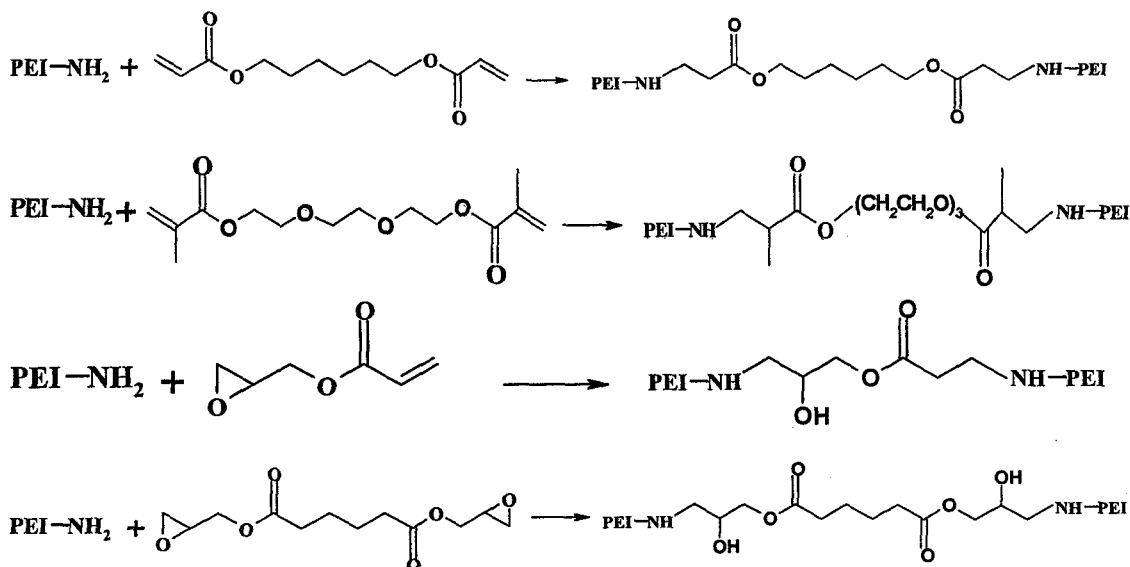
聚乙烯亚胺可根据自己的需要采用广为人知的方式来制备或从商业途径得到, 从 BASF 商品名称为 Lupasol 或以聚乙烯亚胺或乙烯亚胺聚合物为名称, 以不同的分子量从 200 到 2 000 00 克 / 摩尔 (从 Aldrich, sigma, Fluka, Polysciences 或直接从 BASF)。优选具有分子量为 400 到 20000 克 / 摩尔的聚乙烯亚胺, 特别优选 400 到 5 000 克 / 摩尔的聚乙烯亚胺为原料。

各类交联剂可根据自己的需要从商业途径得到 (从 Aldrich, sigma, Fluka, 或直接从生产厂家), 如果需要, 有些交联剂也可以采用文献的方法来制备, 例如己二酸二缩水甘油酯 (DA) 可以采用文献方法合成 (Zondler, H. Helv. Chim. Acta 1977, 60, 1845-1860)

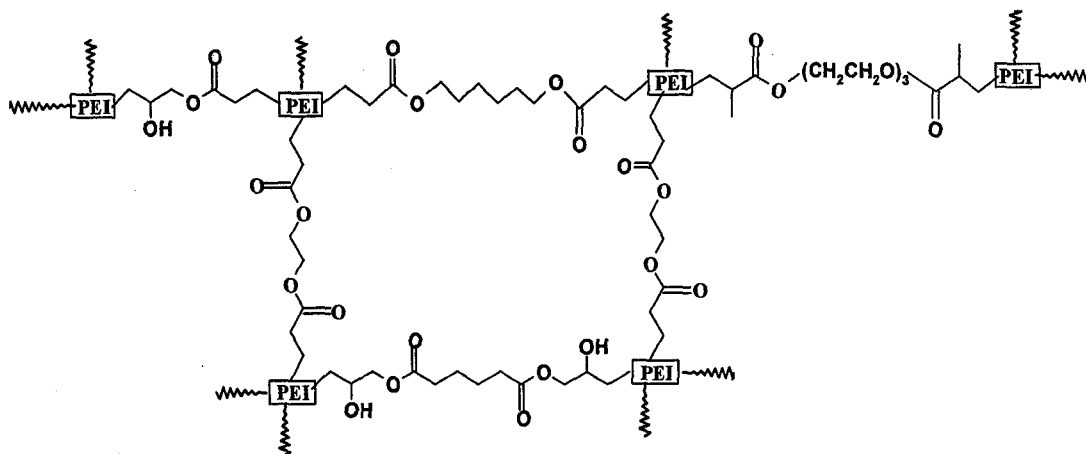
实施例一 交联 PEI 的合成及性质

1 克 PEI (Mw: 2000 Daltons) 溶于 3 ml 新蒸馏的二氯甲烷中, 然后加入合适比例的己二酸二缩水甘油酯和己二醇双丙烯酸酯, 在 40°C 下, 反应适当时间后, 溶液逐渐变黄。然后将溶液转移到 spectra / Por Mwco 10, 000 膜中, 在 4°C 下, 用双蒸水透析 4 天。然后冻干去水, 得到浅色的固

体 (CLPEI)。存放于 -70°C 。采用不同的交联剂和 PEI 组合可以得到各种交联的 PEI 聚合物 (表 1), 反应组合示意于式 1, 所得到的聚合物结构示意于式 2。产物进行 HNMR (varian 300 MHz, D_2O) 分析, 结果发现产物中不存在原料中的双键氢 ($5.5\text{--}6.0\text{ ppm CH}_2=\text{CH-}$) 的吸收峰, 但有 3.4 ppm (HO-CH_2), 2.95 ppm (PEI-NH-CH_2) 和 2.69 ppm ($-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$) 的吸收峰。



式 1. 可能发生的交联反应



式 2. 交联的聚乙烯亚胺的可能结构

交联 PEI (CLPEI) 的分子量的测定和降解性实验

将已知分子量的 PEI 标准品或合成的交联 PEI 样品配成一系列浓度的 PBS 溶液, pH 调为 7.4。记录每个样品的溶液在大气压下流过毛细管粘度计的时间, 溶液的特性粘度 (inherent viscosity) $\eta_{\text{inh}} = \ln \eta_{\text{rel}} / c$, 这里 η_{rel} 相对粘度 (relative viscosity) $\eta_{\text{rel}} = t_{\text{solution}} / t_{\text{solvent}}$, 聚合物溶液流出毛细管的时

间与溶剂流出毛细管的时间的比值, c 是聚合物的浓度。合成的聚合物的分子量由下面的公式计算得到, $\eta_{inh} = KM^a$, 这里 M 是分子量, K and a 是 Mark-Houwink 参数, K and a 的数值可由已知分子量的 PEI 标准品采用上述公式计算得到。将合成的交联 PEI 溶解于 PBS 中, 在 37°C 下放置一段时间, 按上述方法测定分子量并将聚合物的分子量与时间作图。所得聚合物的分子量和其降解性结果如图 1 所示, 结果表明聚合物的分子量为 13000, 约 50 小时后降解为分子量为 2000 的小分子原料。

表1 各种合成的交联聚乙烯亚胺性质

PEI	原料 交联剂	产物性质	
		水溶性	HEK 293 (GFP%)
PEI 600	乙二醇双丙烯酸酯(EGDA)	溶解	40
	1,4-丁二醇二丙烯酸酯(BDDA)	溶解	30
	季戊四醇三丙烯酸酯	溶解	<10
	二甲基丙烯酸乙二醇酯(GDMA)	溶解	55
	三乙二醇双甲基丙烯酸酯(TRGDMA)	溶解	<10
	聚乙二醇(400)二甲基丙烯酸酯[PEG(400)DMA]	溶解	<10
	己二酸二缩水甘油酯(DA)	溶解	<10
	甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)	溶解	10
	GDMA and GMA	溶解	<10
	HDDA and GMA	溶解	<10
	BDDA and GMA	溶解	<10
PEI 2000	乙二醇双丙烯酸酯(EGDA)	溶解	40
	丙二醇二丙烯酸酯 (PGDA)	溶解	40
	1,4-丁二醇二丙烯酸酯(BDDA)	溶解	50
	1,6-己二醇二丙烯酸酯(HDDA)	微溶	40
	二乙二醇双丙烯酸酯(DEGDA)	溶解	40
	季戊四醇三丙烯酸酯	溶解	30
	二乙二醇二甲基丙烯酸酯(DEGDMA)	溶解	40
	三乙二醇双甲基丙烯酸酯(TRGDMA)	溶解	60
	聚乙二醇(400)二甲基丙烯酸酯[PEG(400)DMA]	溶解	40

	己二酸二缩水甘油酯(DA)	溶解	30
	甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)	溶解	50
	EGDA and GMA	溶解	60
	HDDA and GMA	微溶	—
	BDDA and GMA	微溶	—
PEI 3000	乙二醇双丙烯酸酯(EGDA)	溶解	40
	丙二醇二丙烯酸酯 (PGDA)	溶解	40
	1,4-丁二醇二丙烯酸酯(BDDA)	微溶	60
	1,6-己二醇二丙烯酸酯(HDDA)	不溶	—
	二乙二醇双丙烯酸酯(DEGDA)	溶解	40
	季戊四醇三丙烯酸酯	溶解	30
	二乙二醇二甲基丙烯酸酯(DEGDMA)	溶解	50
	三乙二醇二甲基丙烯酸酯(TRGDMA)	溶解	70
	聚乙二醇(400)二甲基丙烯酸酯[PEG(400)DMA]	溶解	40
	己二酸二缩水甘油酯(DA)	溶解	40
	甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)	溶解	60
	EGDA and GMA	溶解	80
	HDDA and GMA	难溶	—
	BDDA and GMA	难溶	—

实施例二 交联 PEI 的乳糖酸和叶酸修饰

交联 PEI 通过 EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide) 活化氨基与乳糖酸以酰胺键相连接。200 mg 例一中所合成的交联 PEI 溶于 6 ml 10 mM TEMED/HCl 缓冲液中。然后加入 180 mg EDC, 25°C 下搅拌 24 小时。然后加入适量的乳糖酸, 25°C 下搅拌 72 小时。最后所得产物用双蒸水透析 4 天, 冻干去水, 即得到半乳糖基修饰的交联 PEI (Gal-PEI)。

10 mg 叶酸和适当量 DCC 溶于新蒸馏的二甲亚砜 DMSO 中低温反应一段时间, 然后加入 200 mg 例一中所合成的 PEI。搅拌下反应 12 小时后, 在 4°C 下, 用双蒸水透析 4 天。然后冻干去水, 即得到叶酸修饰的交联 PEI (Fol-PEI)。

实施例三 交联 PEI 与 pEGFP-C1 复合物的制备及表征

复合物的制备

将实施例一中所合成的可生物降解的交联 PEI 或 PEI 25kDa 分别溶于 PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4) 中, 配成 1mg/ml 的储备液。将质粒 DNA 用 ddH₂O 稀释为 1mg/ml 储备液。按一定的 PEI/DNA (质量比) 配制交联 PEI 或 PEI 25kDa 的 PEI 与 DNA 的复合物, 例如配制交联 PEI/DNA=2:1 的复合物, 具体过程如下: 取 1 μ l 质粒 DNA 的溶液 (1mg/ml) 溶于 50 μ l PBS 中, 轻轻混匀, 再取 2 μ l 交联 PEI 溶于 50 μ l PBS 中, 轻轻混匀, 然后将二者混合, 振荡 10 秒钟, 室温静置 10—15 分钟, 即可用于表征其性能和细胞转染的实验。

电泳阻滞实验

以一系列交联 PEI 与 DNA 的质量比 (0:1, 0.1:1, 0.2:1, 0.3:1, 0.35:1, 0.4:1, 0.45:1) 配制交联 PEI 及 PEI 25 kDa 与 DNA 复合物, 每份含 2.5 μ g (0.1 μ g/ μ l) 的质粒 DNA (pEGFP-C1) 和一定量的交联聚合物的 PBS 溶液, 总体积 50 μ l, 这个溶液室温下放置 10—15 分钟。取其中 10 μ l 与 2 μ l 上样缓冲液混合, 然后加入 0.8% 琼脂糖 (含 0.5 μ g/ml 溴乙锭) 凝胶中, 电压 5 V/cm 进行电泳实验。结果如图 2 所示, 交联 PEI 与 PEI 25 kDa 有同样的结合 DNA 能力, 它们都在 PEI/DNA=0.35:1 时完全包裹 DNA 分子, 从而使 DNA 分子在电泳中无法迁移。

复合物的粒径分析

复合物的粒径用光散射法在 25 $^{\circ}$ C 下测定, 所用的仪器为 Brookhaven 90 PLUS particle size analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY, USA)。波长 660 nm, 恒定角 90 $^{\circ}$, 在基于重量分析的基础上, 假设交联 PEI/DNA 复合物是对数正态分布时, 其尺寸表示为有效直径。复合物的制备方法同上, 只是复合物的总体积可以等比例地增加至 1 ml。具体为: 10 μ g DNA 溶于 500 μ l 的 PBS 中, 适当量 (依据 PEI/DNA 质量比要求) 的交联 PEI 溶于 500 μ l PBS 中, 然后将二者混合, 室温下振荡 10 秒钟, 静置 45 分钟后, 进行光散射实验。结果表示为平均粒径 \pm SD, n = 3。为了研究血清对复合物稳定性的影响, 其对比实验为: 1 μ l 质粒 DNA 的溶液 (1mg/ml) 溶于 50 μ l PBS 中, 再取适当量 (依据 PEI/DNA 质量比要求) 的交联 PEI 溶于 50 μ l PBS 中, 然后将二者混合, 振荡 10 秒钟, 室温静置 10—15 分钟后, 加入 0.9 ml 的含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养液, 30 分钟后进行光散射实验。结果表示为平均粒径 \pm SD, n = 3。如图 3 所示, 没有加入含有血清的完全培养基的交联 PEI 与 DNA 的复合物 45 分钟后已经发生了聚集, 粒径达到 400 nm 左右, 而加入完全培养基后能明显地抑制交联 PEI 与 DNA 所形成的复合物的聚集, 同样条件下其粒径仅为 150 nm 以下, 且能维持数小时。

细胞毒性实验

交联聚合物的细胞毒性通过四唑盐 (MTT) 比色法测定, 并与 PEI 25 kDa 比较。3T3 和 293T 细

胞培养在含10%新生牛血清的DMEM培养液（含100 U/ml青霉素和100 µg/ml链霉素）中，并放置于37°C，5% CO₂ 的孵箱中生长。取处于对数生长期的 3T3 和 293T 细胞，用含 0.02% EDTA 和 0.25% 胰蛋白酶消化液消化后以每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔板，每孔体积为100 µl。将培养板移入37°C，5% CO₂ 的孵箱中培养过夜。除去培液，用 1 × PBS 洗，每孔加入不同剂量的合成聚合物或 PEI 25 kDa 及无血清培液，培养 5 小时。除去培液，1 × PBS 洗，每孔加入100 µl 完全培液继续培养 24 小时。接着每孔加入 20 µl (5 mg/ml) MTT 溶液，37°C 反应 4 小时。小心吸弃孔内培养上清液，每孔加入100 µl 二甲亚砜 (DMSO)，室温温育 30 分钟。振荡后通过酶标仪 (Bio-RAD, Microplate Reader3550) 测定各孔在570 nm的光吸收值。

$$\text{细胞存活率 (\%)} = (\text{OD}_{570} \text{ 样品} / \text{OD}_{570} \text{ 对照}) \times 100$$

结果如图4 和 图5 所示，图4 表明对293T和3T3二个细胞系，所合成的交联PEI比25 kDa PEI 细胞毒性小许多，而且在最佳转染条件下 (2 µg/ml)，交联PEI的细胞毒性很小，细胞存活率均达到95%以上。图5表明与其他商业化的转染试剂比较，所合成的交联PEI细胞毒性也较小。

实施例四 交联 PEI 转染性能的测定

细胞转染实验

各种细胞培养在含10%新生牛血清的DMEM或RPMI1640培养液（含100 U/ml 青霉素和100 µg/ml链霉素）中，并放置37°C，5% CO₂的孵箱中生长。交联PEI或PEI 25kDa与DNA的复合物转染细胞实验具体步骤如下：转染前24小时，取处于对数生长期的细胞，用含0.02% EDTA 和 0.25%胰蛋白酶消化液消化后以每孔 1×10^5 个细胞接种于24孔板，每孔加0.5 ml完全培养液，将培养板移入孵箱，培养24小时。当细胞汇合度达到70-80%时，除去培液，采用前述方法制备转染复合物，具体为：取1µl 质粒DNA的溶液 (1mg/ml) 溶于50 µl PBS中，轻轻混匀，再取2 µl交联PEI溶于50µl PBS中，轻轻混匀，然后将二者混合，振荡10秒钟，室温静置10—15分钟，然后加入900 µl含10%新生牛血清的DMEM培养液，混匀后得到共计1000 µl的转染液，然后加入一个孔中。37°C下，培养24小时，在荧光显微镜下观察并拍照。结果如图6所示，所合成的交联PEI对293T，A549和B16F10三个细胞系均有较高的转染效率，其中对293T和B16F10二个细胞系的转染效率高达90%以上，对A549细胞转染效率近70%。

EGFP的表达及流式细胞仪分析

前述的转染后已经培养24小时的转染表达体系，采用流式细胞仪(FACS Calibur)分析其EGFP的表达情况。具体为：使用氩激光器，在 488 nm 进行分析，将未进行转染的细胞做为背景，进行转染实验的细胞用含 0.02% EDTA 和 0.25% 胰蛋白酶消化液消化后离心并重新悬浮于PBS中，然后

进行流式细胞仪分析。随机收集10000个细胞，计算其中的EGFP表达的细胞所占的比例，数据采用CellQuest (Becton Dickinson) 处理，CLPEI对各种细胞系的转染结果如图7所示，对所选择的9种细胞，除C6细胞系的转染效率仅有30%左右，其他的细胞系均达到50%以上。

为了观察 Gal-PEI 对肝脏来源的细胞膜上带有脱唾液酸糖蛋白(ASGP)细胞系的选择性，将 Gal-PEI 和 CLPEI 分别用来转染带有ASGR 的SMMC-7721 肝癌细胞系和不带此受体的 Hela 细胞系。结果表明所合成的CLPEI经半乳糖基修饰后所获的 Gal-PEI 对带有ASGR 受体的细胞系有一定的选择性，而且在低的交联PEI与DNA重量比条件下，这种选择性更明显（图8）。

为了观察 Fol-PEI 对细胞膜上带有的叶酸受体的细胞的选择性，将Fol-PEI 和 CLPEI 分别用来转染过表达叶酸受体的 KB 细胞和不带此受体的 A549 细胞。结果表明所合成的CLPEI 经叶酸修饰后所获的 Fol-PEI 对带有叶酸受体的细胞系有一定的选择性，而且在低的交联PEI与DNA重量比条件下，这种选择性更明显（图9）。

为了比较各种商业化的转染试剂与我们合成的交联PEI对NIH 3T3细胞的转染效率，将各种转染试剂在各自的最佳转染条件下分别转pEGFP-C1质粒到NIH 3T3细胞中，然后用流式细胞仪分析转染效率，结果如图10所示，所合成的交联PEI对3T3细胞系的转染效率明显高于其他几个商业化的转染试剂。

实施例五 交联聚乙烯亚胺（CLPEI）介导的 RNAi 干扰实验

1. 交联PEI介导表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor, EGFR）的 RNAi 研究

B16F10 细胞培养在含10%新生牛血清的DMEM培养液（含100 U/ml 青霉素和100 μg/ml链霉素）中，并放置37℃，5% CO₂的孵箱中生长。将成功构建的鼠EGFR干扰载体pBSU6-EGFR按照实例四中相同的方法转染细胞。48小时后收集细胞并且用Trizol（Invitrogen 公司）抽提总 mRNA，RT-PCR分析干扰作用后EGFR的mRNA水平的变化，设GAPDH 为内参。结果如图11所示，所合成的交联PEI能成功地介导EGFR干扰质粒进入细胞导致EGFR的mRNA水平明显地下调。

2. 交联PEI介导胞外信号调节的激酶（extracellular-signal regulated kinase, Erk）的RNAi 研究

A549和Hela细胞培养在含10%新生牛血清的DMEM培养液（含100 U/ml 青霉素和100 μg/ml链霉素）中，并放置37℃，5% CO₂的孵箱中生长。将成功构建的Erk干扰载体pBSU6-ERK1/2 按照实例四中相同的方法转染细胞。48小时后收集细胞并抽提细胞总蛋白，利用Western-blot 分析干扰作用后Erk 的蛋白水平的变化，设Tubulin 为内参。结果如图12所示，所合成的交联PEI能成功地介导Erk 干扰质粒进入细胞导致Erk的蛋白水平明显地下调。

3. 交联PEI介导的PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten) RNAi 研究

A549和Hela细胞培养在含10%新生牛血清的DMEM培养液(含100 U/ml 青霉素和100 µg/ml链霉素)中,并放置37°C,5% CO₂的孵箱中生长。将化学合成的小干扰 RNAs 混合物(siRNA/siAB™ Assay Kit, Upstate Catalog # 60-036)按照实例四中相似的方法转染细胞。48小时后收集细胞并抽提细胞总蛋白,利用Western-blot分析干扰作用后PTEN的蛋白水平的变化,设Beta-actin为内参。结果如图13所示,所合成的交联PEI能成功地介导PTEN干扰片段进入细胞导致PTEN的蛋白水平明显地下调。

实施例六 交联PEI的体内转染实验

EGFP在C57小鼠肌肉中的表达

10 µg pEGFP-C1 DNA (Clontech) 的 ddH₂O 溶液 (1mg/ml)与交联PEI的PBS溶液(1mg/ml)按1:2混合均匀,配成总体积 50 µl 的转染复合物,室温下静置15分钟,八周龄的C57小鼠(上海实验动物中心)在左右后腿上剪去腿毛,每只的左右后腿上分别注射 50 µl PBS 和 50 µl上述转染复合物。设置四组每组6只小鼠,分别在给药后的第一天,第三天,第五天,第七天将其杀死,然后制作冰冻切片,在荧光显微镜下观察其EGFP的表达情况。其结果如图14所示,白光与荧光叠加表明转染效率达到90%。

EGFP在C57小鼠肿瘤中的表达

C57BL/6J 小鼠(6至8周)背部皮下接种 B16F10 细胞 5×10^5 个/50µl,待肿瘤直径达 50 mm³左右时将动物随机分组。转染组和空白对照组分别于肿瘤内注射交联 PEI-质粒复合物 50 µl (注射质粒量为 10 µg/50µl),对照组于瘤内注射等体积 0.9%的生理盐水,第三天牺牲小鼠,取出皮下肿瘤,放在冷冻切片机内冷冻,然后冷冻切片。在荧光显微镜下观察其 EGFP 的表达情况。其结果如图 15 所示,表明转染效率达到近 90%。

以 PEI20000、PEI10000 为原料,重复上述实施例的实验,结果表明同样能实现本发明的目的,应理解,在阅读了本发明的上述内容之后,本领域的普通技术人员可以对本发明作各种改动和修改,这些等价形式同样落入本申请权利要求书所限定的范围。

本发明涉及的参考文献:

1. Luo D. and Saltzman W. M. Synthetic DNA delivery system. *Nat. Biotechnol.* 2000; 18: 33–37.
2. Kataoka K. Gene delivery systems: viral vs. non-viral vectors. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001; 52 (3): 151–151(1)
3. Smisterova J., Wagenaar A. and Stuart M.C.A. *et al.* Molecular shape of the cationic lipid controls the structure of cationic lipid/dioleoylphosphatidylethanolamine-DNA complexes and the efficiency of gene delivery. *J Biol Chem.* 2001; 276: 47615 – 47622
4. Zuhorn I.S., Oberle V., Visser W.H. *et al.* Phase behavior of cationic amphiphiles and their mixtures with helper lipid influences lipoplex shape, DNA translocation, and transfection efficiency. *Biophys J.* 2002; 83: 2096 – 2108
5. Simberg D., Danino D. and Talmon Y. *et al.* Phase behavior, DNA ordering, and size instability of cationic lipoplexes: relevance to optimal transfection activity. *J Biol Chem.* 2001; 276: 47453 – 47459
6. Hui S.W., Langner M. and Zhao Y-L *et al.* The role of helper lipids in cationic liposome mediated gene transfer. *Biophys J.* 1996; 71: 590 – 599
7. Anderson D. G., Lynn D. M. and Langer R. Semi-automated synthesis and screening of a large library of degradable cationic polymers for gene delivery. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 2003; 42: 3153–3158
8. Akinc A, Lynn D. M., Anderson D. G. *et al.* Parallel synthesis and biophysical characterization of a degradable polymer library for gene delivery. *J. Am. Chem. Soc.* 2003; 125: 5316 –5323.
9. Thomas M., Ge Q., Lu J. J., *et al.* Cross-linked small polyethylenimines: while still nontoxic, deliver DNA efficiently to mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *Pharmaceutical Research* 2005; 22: 373 –380.
10. Ahn C. H., Chae S. Y., and Bae Y. H., *et al.* Biodegradable poly(ethylenimine) for plasmid DNA delivery *J. Controlled Release* 2002; 80: 273–282.
11. Jon S., Anderson D. G. and Langer R. Degradable poly(amino alcohol esters) as potential DNA vectors with low cytotoxicity *Biomacromolecules* 2003; 4: 1759 –1762.
12. Anderson D. G., Peng W. and Akinc A. *et al.* A polymer library approach to suicide gene therapy for cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004; 101: 16028 –16033.
13. Thomas M., Ge Q., Lu J. J., *et al.* Cross-linked small polyethylenimines: while still nontoxic, deliver DNA efficiently to mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *Pharmaceutical Research* 2005; 22: 373–380.
14. Lim Y.-B., Kim S.-M., Suh H. and Park J.-S. Biodegradable, endosome disruptive, and cationic network-type polymer as a highly efficient and non-toxic gene delivery carrier. *Bioconjug. Chem.* 2002; 13:

952–957.

15. Forrest M. L., Koerber J. T., and Pack D. W. A Degradable Polyethylenimine Derivative with Low Toxicity for Highly Efficient Gene Delivery *Bioconjugate Chem.* 2003; 14: 934–940

16. Gosselin M A, Guo W, Lee R J. Efficient gene transfer using reversibly cross-linked low molecular weight polyethylenimine. *Bioconjugate Chem.* 2001, 12: 989–994

17. Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. Size matters: molecular weight affects the efficiency of polyethylenimine as a gene delivery vehicle. *Proceed. Int. Symp. Control. Relat. Bioact. Mater.* 1997, 25: 230–231

18. Thomas M. and Klibanov A. M. Enhancing polyethylenimine's delivery of plasmid DNA into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 14640–14645.

19. Kabanov AV and Kabanov VA DNA complexes with polycations for the delivery of genetic material into cells. *Bioconjugate Chemistry* 1995; 6 (1): 7–20.

20. Cheol-Hee Ahn, Su Young Chae, You Han Bae, Sung Wan Kim Biodegradable poly(ethylenimine) for plasmid DNA delivery *Journal of Controlled Release* 2002; 80: 273–282

21. Zhiyuan Zhong , Yan Song, Johan F.J. Engbersen, Martin C. Lok, Wim E. Hennink, Jan Feijen A versatile family of degradable non-viral gene carriers based on hyperbranched poly(ester amine)s *Journal of Controlled Release* 2005; 109: 317–329

22. Sharma Vikas K., Thomas mini, Klibanov A. M. Mechanistic studies on aggregation of polyethylenimine-DNA complexes and its prevention *Biotechnology and Bioengineering* 2005; 90 (5): 614–620

23. Daniel G. Anderson, Akin Akinc, Naushad Hossain, and Robert Langer Structure/Property Studies of Polymeric Gene Delivery Using a Library of Poly(B-amino esters) *Mol Ther.* 2005; 11: 426 – 434

24. Zhiyuan Zhong, Yan Song, Johan F. J. Engbersen *et al.* A versatile family of degradable non-viral gene carriers based on hyperbranched poly(ester amine)s *J. Controlled Release* 2005; 109: 317–329.

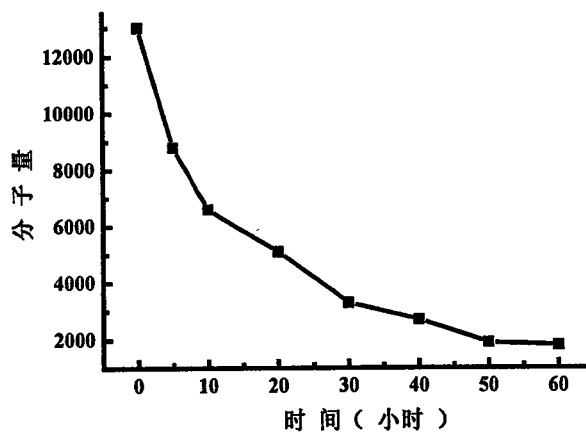


图 1

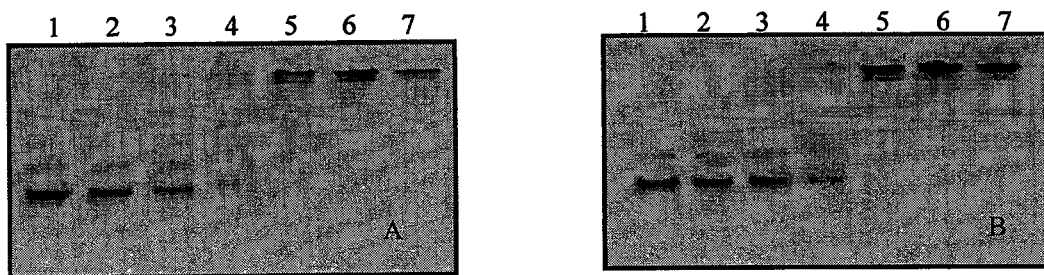


图2

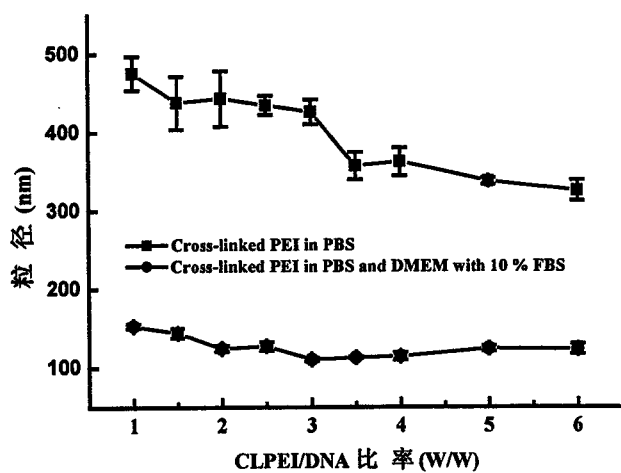


图 3

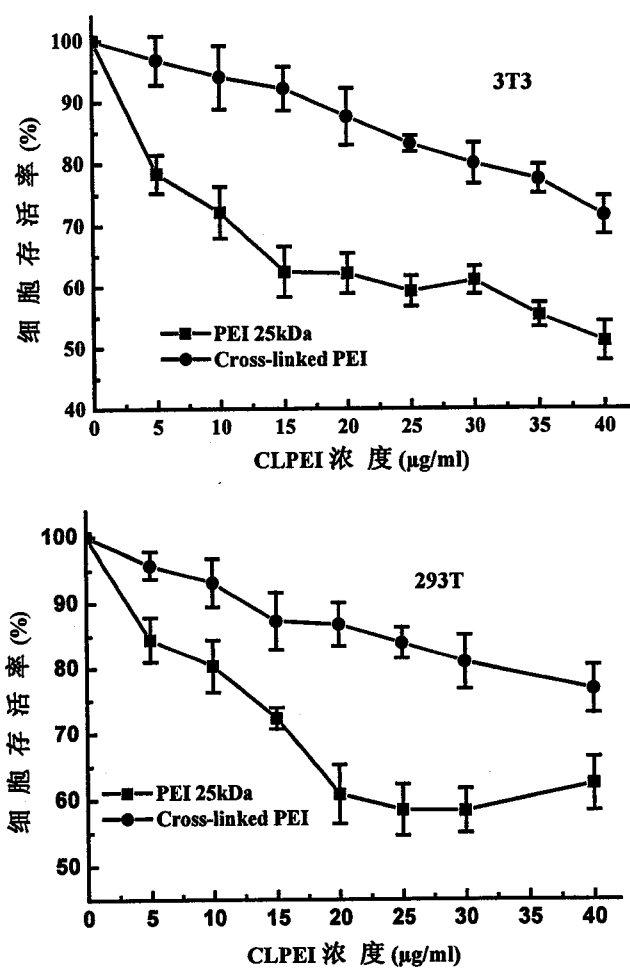


图4

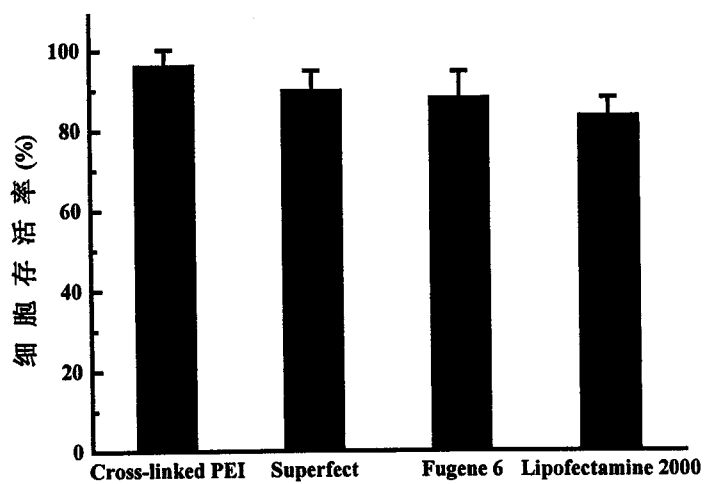


图5

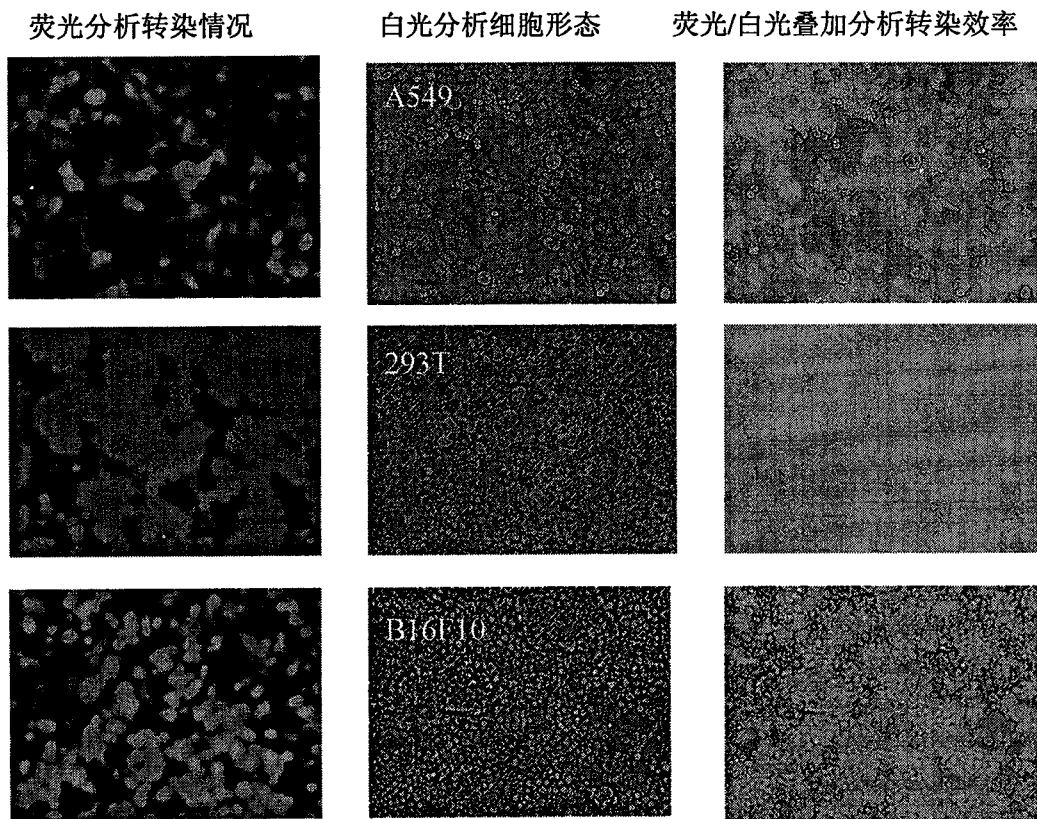


图 6

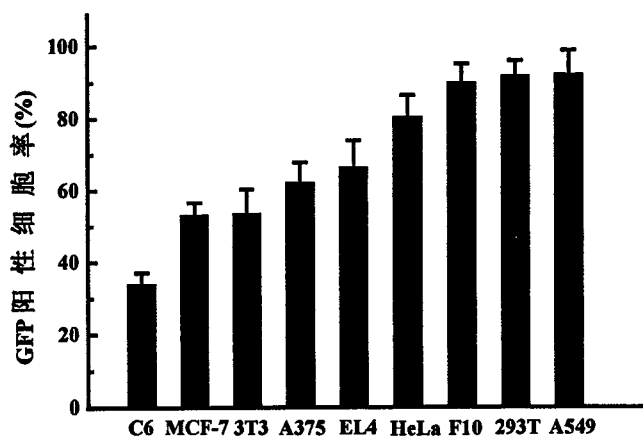


图 7

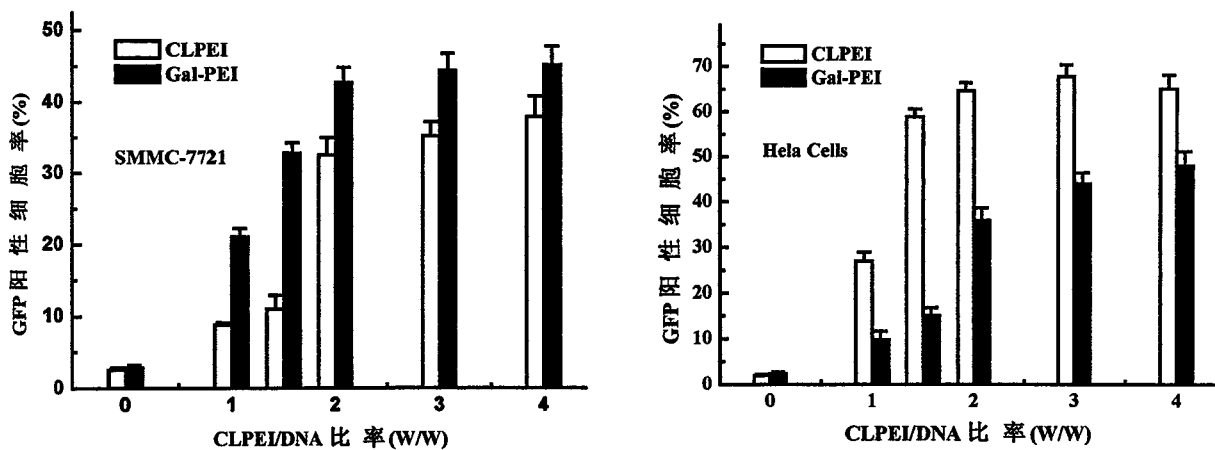


图 8

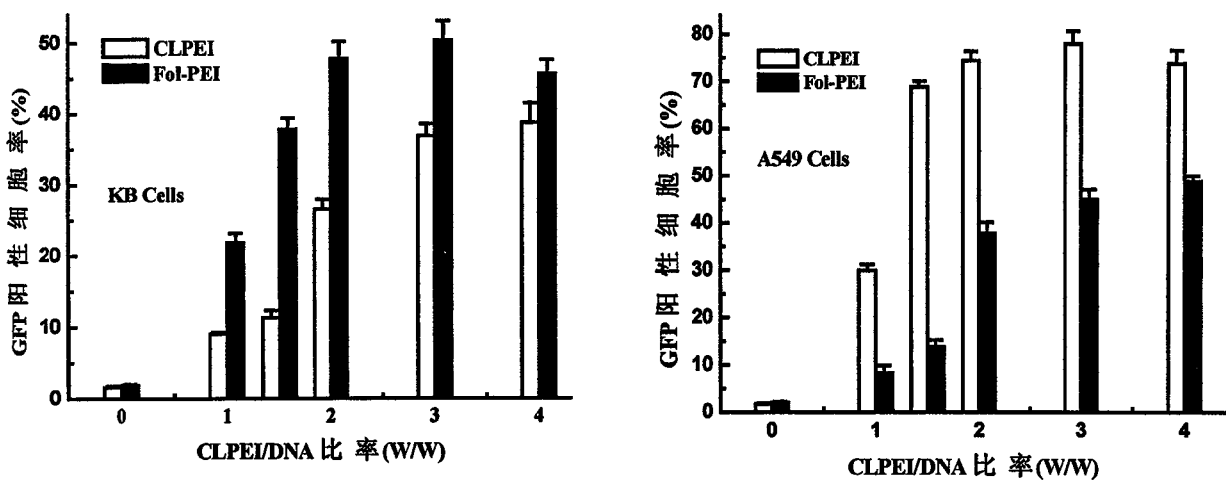


图 9

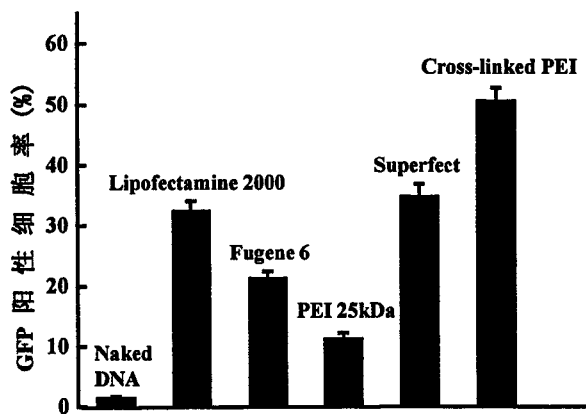


图 10

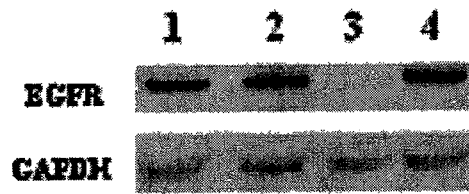


图 11

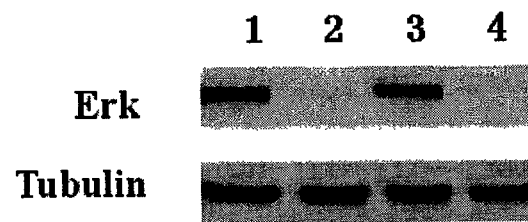


图 12

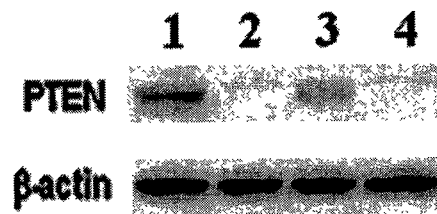


图 13

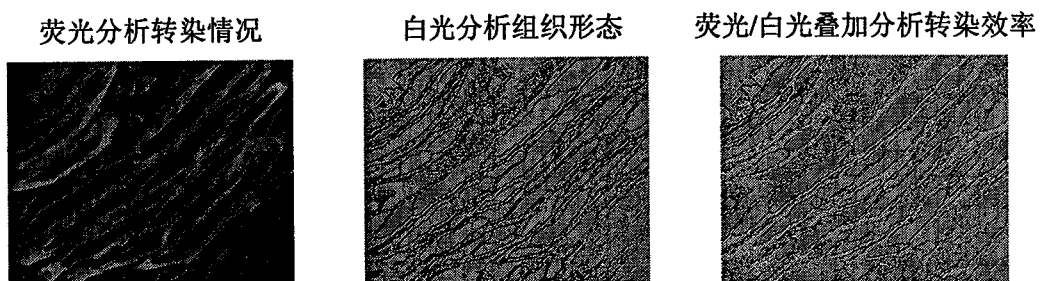
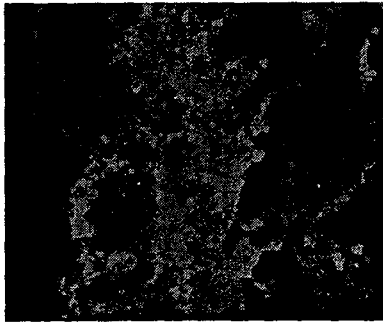


图14

荧光分析转染情况



白光分析组织形态

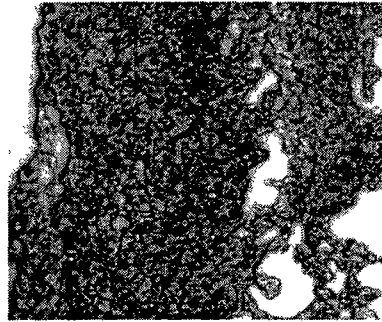


图15