



论文

阳离子基因载体的pH敏感遮蔽体系的制备及表征

夏加亮^{①②}, 陈杰^①, 田华雨^①, 陈学思^{①*}¹ 中国科学院长春应用化学研究所, 生态环境高分子材料重点实验室, 长春 130022;² 中国科学院研究生院, 北京 100049* 通讯作者, E-mail: xschen@ciac.jl.cn

收稿日期: 2009-12-03; 接受日期: 2009-12-27

摘要 合成了一种 pH 敏感的遮蔽体系-谷氨酸苄酯/谷氨酸共聚物(PBLG-co-PGA), 用于对 DNA/阳离子基因载体复合物颗粒表面正电荷的遮蔽, 以提高其在体内的稳定性. 研究表明, PBLG-co-PGA (PGA(x), x 为 PGA 占共聚物中摩尔百分数)具有 pH 敏感性. 并以 pH 敏感点接近生理 pH 值的 PGA(60)为遮蔽体系进行研究. PGA(60)能够对 DNA/PEI(1:1)复合物颗粒表面正电荷进行有效遮蔽. 凝胶阻滞电泳显示, 用 PGA(60)对 DNA/PEI 复合物进行不同比例遮蔽, 没有发生与 DNA 的链交换作用. MTT 细胞毒性测试表明, PGA(60)和三元复合物 DNA/PEI/PGA(60) 在测试范围内几乎没有细胞毒性. 荧光素酶转染实验表明, 部分遮蔽后转染效率有所提高; 用 PGA(60)对 DNA/PEI 复合物完全遮蔽为负电后, 由于同细胞表面的电荷排斥作用, 三元复合物不易被细胞内吞, 导致不发生细胞转染. 因其合适的 pH 响应性, PGA(60)将可能成为一种能随 pH 值的变化, 实现对聚阳离子基因载体进行电荷遮蔽/智能释放的遮蔽材料.

关键词
基因传递
遮蔽体系
pH 敏感
聚谷氨酸

1 引言

近二十年来, 在治疗基因疾病的领域里, 基因治疗的方法取得了很大的进步^[1, 2]. 基因治疗的瓶颈问题在于如何将基因药物安全有效地传输到人体的病灶部位. 人工合成的阳离子聚合物由于其无免疫原性, 结构和尺寸设计可多样化而被广泛研究^[3-6]. 其中聚乙烯亚胺(PEI)由于其独特的“质子海绵效应”而倍受关注, PEI-25k 已经成为被大家认可的阳离子聚合物基因载体性能评价参照.

由于阳离子聚合物基因载体与 DNA 形成的复合物颗粒表面多呈现较强的正电性, 体液中带负电的细胞外基质通常会与复合物颗粒相互作用, 导致复合物颗粒凝聚或者解体, 从而阻碍复合物颗粒有效的将 DNA 运载至目标组织. 因此研究者们考虑引入遮蔽体系来掩盖复合物表面多余的正电荷. 通过稳定

的共价键直接将聚乙二醇(PEG)^[7-9]或者生物大分子^[10, 11]连接在载体上, 可以屏蔽复合物颗粒表面的部分正电荷, 一定程度上避免载体的自身凝聚. Walker 等人^[12, 13]利用 pH 敏感的化学键将 PEG 接到载体上, 使起遮蔽作用的 PEG 在肿瘤组织周围能够离去, 利于细胞对阳离子载体/DNA 复合物颗粒的吞噬. Gu 等人^[14]的研究发现, 阴离子聚聚合物对阳离子载体/DNA 复合物进行遮蔽后, 会出现阴离子聚合物与 DNA 的链交换作用, 置换出 DNA, 并提出用壳交联的方法来避免这种链交换作用. Bae^[15]和 Kataoka 等人^[16, 17]开发了独立的 pH 敏感的遮蔽体系, 通过静电作用, 对阳离子载体/DNA 复合物颗粒的表面正电荷进行遮蔽. 遮蔽体系与阳离子载体/DNA 复合物颗粒通过静电结合, 在正常的体液中稳定, 防止颗粒团聚或解体. 如果到了 pH 较低的肿瘤组织, 遮蔽体系从复合物颗粒表面脱离, 将带正电的核心载体体

系暴露, 有利于细胞对载体的吞噬. 这种设计思路充分考虑到载体体系在体内传输过程中的正电荷遮蔽以及到达肿瘤组织后遮蔽体系的解离、正电荷恢复等问题, 更利于载体的体内循环和在病灶位置的被吞噬.

本文通过反应时间控制, 合成了一定分子量的谷氨酸苄酯/谷氨酸共聚物 PGA(x). 选择 pH 转变点接近生理 pH 值的 PGA(60)作为遮蔽体系, 对其理化性质和生物性能进行评价. PGA(60)对 DNA/PEI 复合物有良好的遮蔽性能, 且不发生链交换反应. 通过用 PGA(60)对 DNA/PEI 进行不同程度的遮蔽, 得到了截然不同的转染效果. 结合 PGA(60)的 pH 敏感性, 推测 PGA(60)遮蔽后的复合物将能实现在正常细胞不转染, 在 pH 更低的肿瘤组织, DNA/PEI 将被释放, 实现转染.

2 实验部分

2.1 试剂

超支化聚乙烯亚胺(PEI-25k)(Sigma, $M_w=25000$); 正己胺(Sigma); γ -谷氨酸苄酯-NCA(BLG-NCA)按照文献[18]方法合成; 三氟乙酸(吉尔生化); 33%(V/V)溴化氢的醋酸溶液(ACROS); 小牛胸腺 DNA(Sigma); 荧光素酶质粒(pGL3-control)、细胞裂解液、荧光素酶检测试剂盒(Promega); 噻唑蓝(MTT, Sigma); BCA 法蛋白检测试剂盒(Pierce); 溴化乙锭(EB, Sigma); 透析袋(MWCO3500, 上海绿鸟); 氯仿, 用 CaH_2 干燥处理, 常压蒸馏收集; 其他试剂和溶剂均为分析纯, 使用时未经进一步提纯.

2.2 仪器

Zeta 电位及粒度分析仪(ZetaPALS 型, 美国布鲁克海文); 核磁共振仪(Bruker AV300 NMR); 紫外可见分光光度计(UV-2401PC, 日本岛津); 酶标仪(Bio-Rad, 美国); 光度计(GloMaxTM20/20, Promega); 凝胶成像系统(UVP Inc., Upland, 美国).

2.3 聚谷氨酸苄酯(PBLG)的合成

将 BLG-NCA 7.15g(27.19 mmol)置于干燥的反应安瓶中, 加入 130 mL 无水氯仿溶解; 将 5%(V/V)正己胺的氯仿溶液 1.1 mL(0.379 mmol)加入到 BLG-NCA 的氯仿溶液中, 于 30℃油浴中反应 72 h. 反应完毕后

适当浓缩, 用 800 mL 乙醚进行沉降两遍. 滤取白色沉淀, 真空干燥.

2.4 谷氨酸苄酯/谷氨酸共聚物(PGA(x))的合成

称取 0.20 g PBLG 于反应安瓶中, 用 2 mL 二氯乙酸溶解后, 加入 0.6 mL 溴化氢的醋酸溶液用于脱除苄酯保护基, 获得谷氨酸苄酯/谷氨酸共聚物 PBLG-co-PGA (PGA(x), 其中 x 为 PGA 占共聚物中摩尔百分数). 室温反应到确定时间后, 反应液置入到大量乙醚中沉降. 沉淀经真空干燥 10 h 后, 加适量 DMF 溶解, 用截留分子量 3500 的透析袋透析 2 天, 冷冻干燥得白色固体.

2.5 遮蔽体系的 pH 敏感性能表征

将 PGA(35)、PGA(60)、PGA(70)、PGA(80)和 PGA(95)分别用 0.1 mol/L NaOH 配制成 0.1 g/mL 的溶液, 并用 0.1 mol/L HCl 滴定, 用紫外可见分光光度计监测溶液的透过率.

2.6 DNA/PEI/PGA(60)三元复合物的制备

PEI-25k, DNA 分别用二次水配制 0.1 mg/mL 的溶液; PGA(60)配成 0.1 mg/mL 和 1.0 mg/mL 水溶液. PEI-25k 和 DNA 以质量比 1:1 的比例混合, 搅拌均匀后静置 30 min, 制得 DNA/PEI 复合物颗粒, 其中 DNA 浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$. 向 DNA/PEI 复合物颗粒中加入确定量的 PGA(60), 混合均匀后静置 30 min, 制得 DNA/PEI/PGA(60)三元复合物颗粒. 文中所提到的所有复合物中, DNA/PEI 的质量比都为 1:1.

2.7 三元复合物颗粒的粒径与表面电位表征

制备用不同质量 PGA(60)遮蔽 DNA/PEI(1:1)的三元复合物颗粒, 粒径大小与表面电位通过采用 Zeta 电位及粒度分析仪进行测定.

2.8 细胞毒性实验

材料的细胞毒性采用 MTT 方法, 以两种形式进行评价. HeLa 细胞接种于 96 孔细胞培养板, 细胞密度为 1×10^4 个/孔, DMEM 培养液中含 10%FBS, 100 units/mL 青霉素, 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素, 在 37℃, 5%CO₂ 孵箱中培养 24 h.

方法一: 配制不同浓度 PGA(x)的 DEME 溶液. 每孔中加入 200 μL 的聚合物溶液, 继续培养 24 h;

方法二: 更换新的培养液 180 μL , 分别加入不同 PGA(60)比例的三元复合物溶液 20 μL , 继续培养 48 h;

每孔加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL, 溶解于 PBS 中, 过滤除菌). 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 4 h, 小心弃去培养液, 每孔加入 200 μL DMSO, 振荡 10 min. 然后用酶标仪检测光吸收, 测试波长选用 492 nm. 细胞存活率按下面公式计算:

$$\text{Cell viability}(\%) = (A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}) \times 100$$

A_{sample} 是与阴离子聚合物溶液或三元复合物颗粒作用的细胞样品孔的吸收; A_{control} 空白细胞作为阴性对照, 每组实验做四个平行对照, 重复三次.

2.9 凝胶阻滞电泳

配制不同 PGA(x)比例的三元复合物溶液, 室温下孵育 20 min, 用 1%的琼脂糖跑电泳, 100 V 电压 45 min, EB 溶液(0.06 $\mu\text{g/mL}$)染色 20 min 后用凝胶成像系统分析. 本项实验中以荧光素酶质粒 DNA (pGL3-control)为模型 DNA.

2.10 细胞转染实验

细胞转染研究选用人宫颈癌细胞(HeLa 细胞)进行, 选用荧光素酶质粒 DNA(pGL3-control plasmid)为报告基因. 具体操作步骤如下: 转染前 24 h 将细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 细胞密度约为 1×10^4 个/孔, 加入 DMEM 培养液培养 24 h 后使细胞汇合度达到 80%左右. 转染前, 更新 DMEM 培养液 180 μL /孔, 配制不同 PGA(x)质量比的三元复合物, 孵育 30 min 后加入 96 孔板中, 20 μL /孔. 继续培养 48 h 后, 小心移去培养液, 使用 PBS 缓冲液冲洗两次, 完全吸除 PBS 后, 每孔加入 50 μL 细胞裂解液, 吹打均匀后放入 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冻存 1 h. 取 20 μL 裂解液用于荧光素酶分析系统检测. 另取 20 μL 裂解液用于 BCA 法检测, 测定裂解液中的总蛋白含量, 最终结果的荧光素酶活性表示为每毫克蛋白的相对光单位(RLU).

3 结果与讨论

3.1 遮蔽体系的合成与表征

遮蔽体系 PGA(x)的合成路线见示意图 1. 用正己胺做引发剂的 BLG-NCA 开环聚合, 可以通过投料比控制聚合物分子量. 根据投料比, 设计的 PBLG 分

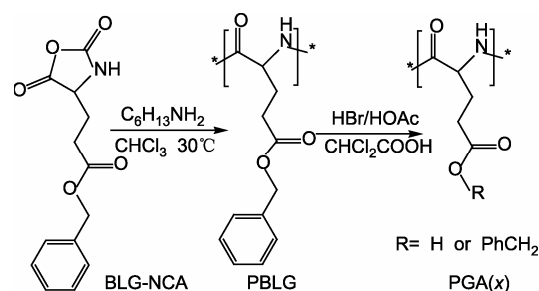


图1 谷氨酸苄酯/谷氨酸共聚物 PGA(x)的合成路线

子量为 15.5 k, 通过核磁结果计算, PBLG 分子量为 14.2 k, 与设计分子量相当.

在室温下用溴化氢对 PBLG 进行脱保护, 分别反应 5、10、20、30 和 40 min. 沉降后的固体溶解于 DMF 后进行透析, 除尽溴化氢、二氯乙酸等杂质, 冻干后得到不同比例的谷氨酸苄酯/谷氨酸共聚物. 对得到的一系列产物进行 ^1H NMR 表征. 如图 2, 核磁谱图上, $\delta = 7.14$ ppm(e)和 $\delta = 5.02$ ppm(d)分别为苄基的苯环和 $-\text{CH}_2-$ 的特征峰, 随着反应时间的增加, 苄基的特征峰逐渐消失.

图 3 为共聚物中谷氨酸含量随反应时间增加的变化趋势, 其谷氨酸含量是通过核磁谱图中苄基上 $-\text{CH}_2-$ 与主链上 $\delta = 4.62$ ppm(a)的 $\alpha\text{-C-H}$ 的积分面积比的变化计算而得. 通过计算得终产物分别为 PGA(35)、PGA(60)、PGA(70)、PGA(80)和 PGA(95). 由图 3 可见, 共聚物中谷氨酸的含量可以通过反应时间来控制, 而且核磁结果表明, 脱保护反应过程中不存在断

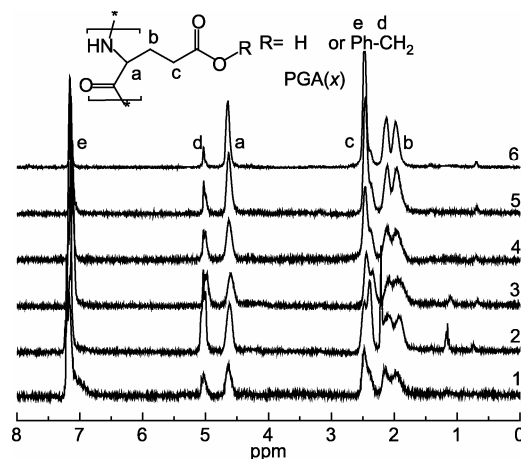


图2 PBLG 及 PGA(x)的 ^1H NMR 谱图. 1~6 分别为 PBLG, PGA(35), PGA(60), PGA(70), PGA(80)和 PGA(95), 所有测试均以氘代三氟乙酸(TFA-d)为溶剂

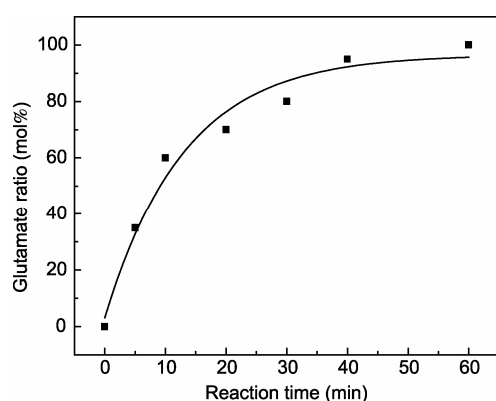


图3 共聚物中谷氨酸含量随反应时间增加的变化趋势

链反应. 反应时间达到 1 h 后, 脱保护率达到 100%.

将 PGA(35)、PGA(60)、PGA(70)、PGA(80)和 PGA(95)用 0.1 mol/L 的 NaOH 配成 0.1 g/mL 的溶液, 再用 0.1 mol/L HCl 进行滴定, 同时用狭缝为 3 mm 的比色皿监测溶液的透过率, 以 pH 值对透过率($T\%$)作图. 如图 4 所示, 随着 pH 的降低, 溶液从透明变为浑浊, 透过率降低到 15% 左右. 聚合物中电离的羧基为亲水基团, 未电离的羧基及残留的苄基为疏水基团, 亲水/疏水基团比例随着 pH 值的变化而变化, 溶液出现从透明到浑浊的转变. 因聚合物残留的苄酯基的含量不同, PGA(x)的 pH 相转变点随谷氨酸含量的增大而降低. PGA(95)的羧基含量很高, 因为羧基跟水有很强的氢键作用, 所以 PGA(95)滴定到最后, 透过率仍然在 40% 左右.

由图 4 中可得, PGA(35)、PGA(60)、PGA(70)、PGA(80)、PGA(95)的相转变 pH 点分别为 3.6, 4.7, 5.4, 6.0 和 8.0. 因 PGA(60)的转变点 pH 值处于肿瘤组织 pH 值(5.5)与生理 pH 值(7.4)之间, 用此聚合物作遮

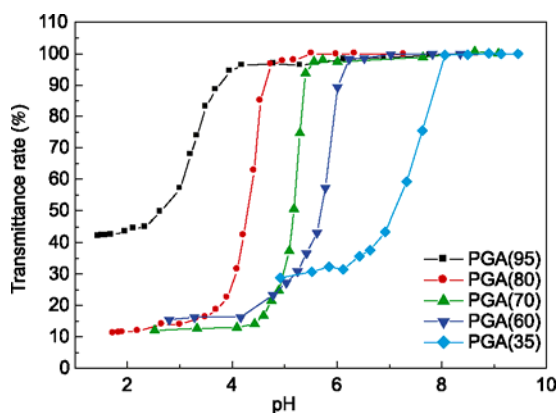


图4 PGA(x)的透过率随 pH 的变化趋势

蔽, 更有利于实现遮蔽体系“在体液中遮蔽, 到肿瘤出释放”的要求, 所以选择 PGA(60)作为遮蔽材料, 进行进一步的表征.

3.2 复合物的粒径与表面电位

遮蔽体系与基因载体及 DNA 通过静电复合形成纳米颗粒, 其粒径大小、结构致密与否以及表面电荷密度都将为影响基因传递效果的影响因素. 通过图 5(a)的表面电位结果并结合图 5(b)的粒径测试结果, 可以得出如下结论: 单纯的 DNA/PEI 复合物颗粒粒径在 260 nm 左右, 电位在 +18 mV 左右. 随着遮蔽材料 PGA(60)投入质量的增加, 三元复合物的表面电位逐渐向电负性转变, 在 DNA/PEI/PGA(60) 质量比为 1:1:5.0 的时候变为负值; 粒径会随着 PGA(60)量的增加而逐步增大. 结合表面电位数据分析, 2、3 号样品粒径变化不明显, 主要由于三元复合物表面仍有较多的正电荷而比较稳定; 4、5 号样粒径增大很多, 主要是由于三元复合物表面接近电中性, 结构松散; 6~9 号样品粒径很大, 主要是随着遮蔽体系比例增大, 三元复合物质量浓度增大造成的.

3.3 细胞毒性

本文采用 MTT 的方法分别测试材料本身及三元复合物的细胞毒性, 本项实验选用 HeLa 细胞. 如图

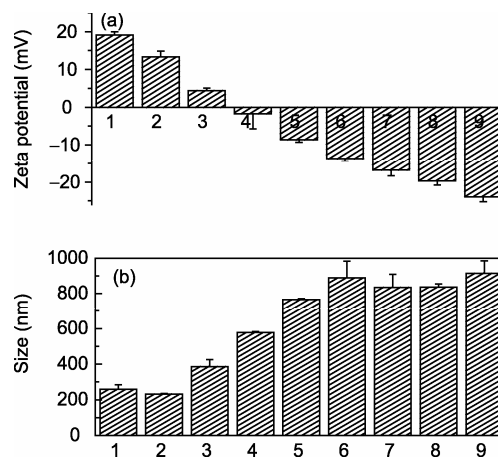


图5 PGA(60)遮蔽 DNA/PEI(1:1)后的电位与粒径. (a)图为电位, (b)图为粒径; 从左到右, 1 为 DNA/PEI(1:1), 2~9 为 DNA/PEI/PGA(60), PGA(60)的比例分别为 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 15 和 20. 粒径测试条件: 25℃, 测 3 个平行样品取平均值, 每个样品测 3 min; 表面电位测试条件: 25℃, 测 3 个平行样品取平均值, 每个样品测 30 个循环

6(a)图为在不同浓度 PGA(x)系列材料培养 24 h 后的细胞存活率. 6(b)图为 PGA(60)跟 DNA/PEI 复合转染 48 h 后的细胞存活率. 可见在测试浓度范围内, 无论是遮蔽材料本身, 还是对 DNA/PEI 进行遮蔽后的三元复合物, 都没有明显细胞毒性. 这主要是因为这类聚氨基酸材料的良好生物相容性以及 PGA 材料的电负性.

3.4 凝胶阻滞电泳

通过凝胶阻滞实验来考察加入遮蔽材料后对 DNA/PEI 复合物的影响. 如图 7, DNA/PEI(1:1)对 DNA 能够完全阻滞(2). 用不同比例的 PGA(60)对 DNA/PEI(1:1)进行遮蔽(3~8), 加入 PGA(60)后, 在 PGA(60)分子中残留的苄酯和未电离的羧基等疏水基团的压缩作用下, 并没有破坏 DNA/PEI 的结合情况, 所以没有出现 PGA(60)与 DNA 的交换, 没有发现 DNA 被释放的现象.

3.5 细胞荧光素酶转染

本部分选用荧光素酶质粒 DNA(pGL3-control)作为报告基因进行 HeLa 细胞转染实验来评价 PGA(60)

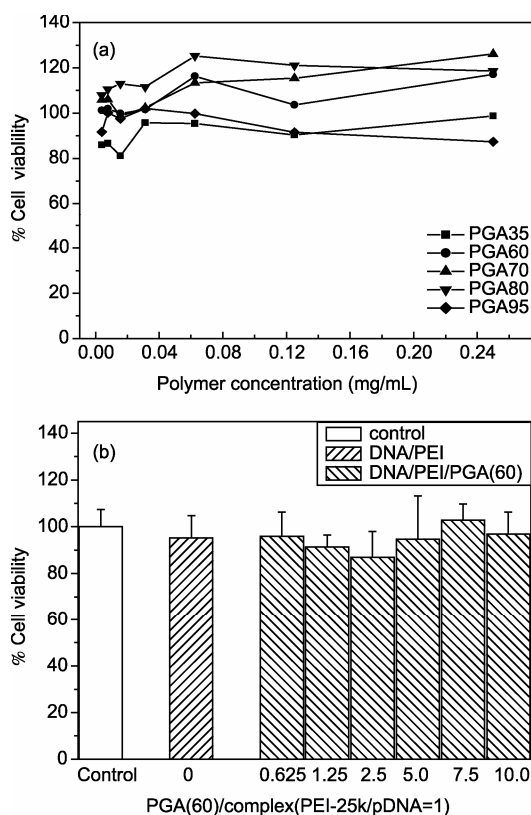


图 6 PGA(x)系列材料的细胞毒性

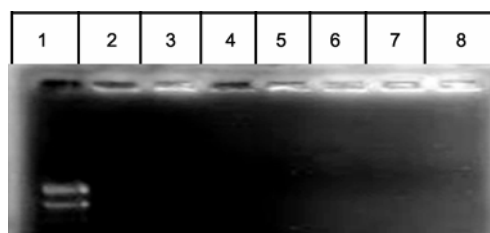


图 7 DNA/PEI/PGA(60)三元复合物的凝胶阻滞电泳. 1 为裸 DNA; 2 为 DNA/PEI(1:1); 3~8 为不同比例的 PGA(60)对 DNA/PEI(1:1)进行遮蔽, PGA(60)比例分别为 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0

对 DNA/PEI 进行遮蔽后的转染情况. 如图 8, 结合表面电位结果分析, 对 DNA/PEI 进行部分遮蔽后, 转染效率有所提高, 随着遮蔽比例的增加, 当 PGA(60)对 DNA/PEI 表面正电荷完全遮蔽后, 几乎没有转染. 由此推测, 在 DNA/PEI/PGA(60)这个体系的转染中, 复合物表面的正电荷, 是复合物被细胞吞噬并实现转染的一个重要条件. 同时可以推测, 在体内环境下, 三元复合物抵达肿瘤组织后, 由于 pH 值的变化, PGA(60)因不带电而脱离 DNA/PEI 复合物, 被释放出的表面带正电的 DNA/PEI 复合物的转染效果将因此而得到恢复. 此部分推断的实验, 正在进行中.

4 结论

本文通过对反应时间的控制合成并表征了不同谷氨酸含量的具有 pH 敏感性的谷氨酸苄酯-谷氨酸共聚物(PGA(x)s). 并选择 pH 敏感区间接近生理 pH 的 PGA(60)作为阳离子基因载体遮蔽体系进行研究. PGA(60)能对 DNA/PEI 复合物表面正电荷进行不同程度的稳定的遮蔽, 且没有遮蔽材料与 DNA 的链交

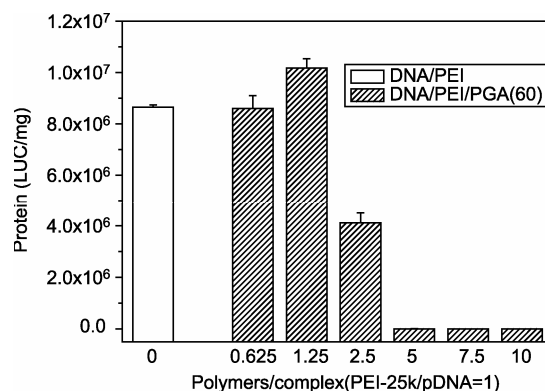


图 8 不同比例三元复合物 HeLa 细胞中的荧光素酶转染

换而置换出 DNA 的反应发生, 有利于载体体系在体内的稳定. 用 PGA(60)对 DNA/PEI 进行部分遮蔽后, 能有效的提高转染效率, 完全遮蔽后没有转染效果. 推测可能是因为完全遮蔽后, 带有 DNA 的三元复合

物表面变为负电, 不利于被细胞吞噬. 这样更利于载体体系的靶向传输: 只有当体系抵达低 pH 值(如肿瘤)组织, 因 PGA(60)的 pH 敏感性而使体系表面恢复正电荷, 然后后被内吞而实现转染.

致谢 本工作得到国家自然科学基金(批准号: 20604028, 50873102, 50733003, A3 项目 20621140369)和科技部国际合作项目(2007DFR5020)资助, 特此一并致谢.

参考文献

- 1 Meredith A. Mintzer, Eric E. Simanek. Nonviral vectors for gene delivery. *Chem Rev*, 2009, 109(2), 259—302[DOI]
- 2 韩泽广, 肝癌基因组学研究进展. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2008, 38(10): 907—912
- 3 Shuai XT, Merdan T, Unger F, Kissel T. Supramolecular gene delivery vectors showing enhanced transgene expression and good biocompatibility. *Bioconj Chem*, 2005, 16 (2), 322—329[DOI]
- 4 Tian HY, Xiong W, Wei JZ, Wang Y, Chen XS, Jing XB, Zhu QY. Gene transfection of hyperbranched PEI grafted by hydrophobic amino acid segment PBLG. *Biomaterials*, 2007, 28(18): 2899—2907[DOI]
- 5 Lin C, Blaauboer C-J, Timoneda MM, Lok MC, van Steenberg M, Hennink WE, Zhong ZY, Feijen J, Engbersen JFJ. Bioreducible poly(amido amine)s with oligoamine side chains: synthesis, characterization, and structural effects on gene delivery. *J Contr Rel*, 2008, 126(2) 166—174[DOI]
- 6 Peng Q, Zhong ZL, Zhuo RX. Disulfide cross-linked polyethylenimines (PEI) prepared via thiolation of low molecular weight PEI as highly efficient gene vectors. *Bioconj Chem*, 2008, 19 (2), 499—506[DOI]
- 7 Zhang X, Pan SR, Hu HM, Wu GF, Feng M, Zhang W, Luo X. Poly(ethylene glycol)-*block*-poly ethylenimine copolymers as carriers for gene delivery: effects of PEG molecular weight and PEGylation degree. *J Biomed Mater Res Part A*, 2008, 84(3): 795—804
- 8 Petersen H, Fechner PM, Fischer D, Kissel T. Synthesis, characterization, and biocompatibility of polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) block copolymers. *Macromolecules*, 2002, 35(18): 6867—6874[DOI]
- 9 Chen L, Tian HY, Chen XS, Park TG, Maruyama A., Jing XB. Synthesis and characterization of a crosslinking polyethylenimine as smart gene carrier and effects of PEGylation degree. *Acta Polymer Sin*, 2009, 6, 499—504[DOI]
- 10 Maruyama K, Iwasaki F, Takizawa T, Yanagie H, Niidome T, Yamada E, Ito T, Koyama Y. Novel receptor-mediated gene delivery system comprising plasmid/protamine/sugar-containing polyanion ternary complex. *Biomaterials*, 2004, 25(16): 3267—3273[DOI]
- 11 Tomoko I, Naoko I-T, Koji K, Kenichi Y, Yoshiyuki K. Spermine-grafted hyaluronic acid as multifunctional coating of the plasmid/polycation complex for protection, targeting, and transcriptional activation. *Mol Ther*, 2005, 11, s87—s88
- 12 Walker GF, Ogris M, Wagner E. Amine-reactive pyridylhydrazine-based PEG reagents for pH-reversible PEI polyplex shielding carolin fella. *Eur J Pharm Sci*, 2008, 34(4-5), 309—320[DOI]
- 13 Knorr V, Allmendinger L, Walker GF, Paintner FF, Wagner E. An acetal-based pegylation reagent for ph-sensitive shielding of DNA polyplexes. *Bioconj Chem*, 2007, 18 (4): 1218—1225[DOI]
- 14 Gu ZX, Yuan Y, He JL, Zhang MZ, Ni PH, Facile approach for DNA encapsulation in functional polyion complex for triggered intracellular gene delivery—Design, synthesis, and mechanism. *Langmuir*, 2009, 25 (9), 5199—5208[DOI]
- 15 Sethuraman VA, Na K, Bae YH. pH-Responsive sulfonamide/PEI system for tumor specific gene delivery: an *in vitro* study. *Biomacromol*, 2006, 7(1), 64—70[DOI]
- 16 Lee Y, Fukushima S, Bae YS, Hiki S, Ishii T, Kataoka K. A protein nanocarrier from charge-conversion polymer in response to endosomal pH. *J Am Chem Soc*, 2007, 129(17), 5362—5363[DOI]
- 17 Lee Y, Miyata K, Oba M, Ishii T, Fukushima S, Han M, Koyama H, Nishiyama N, Kataoka K. Charge-conversion ternary polyplex with endosome disruption moiety: a technique for efficient and safe gene delivery. *Angew Chem Int Ed*, 2008, 47(28), 5163—5166[DOI]
- 18 Poche DS, Moore MJ, Bowles JL. An unconventional method for purifying the *N*-carboxyanhydride derivatives of gamma-alkyl-L-glutamates. *Synth Commun*, 1999, 29 (5): 843—854[DOI]

Synthesis and characterization of a pH-sensitive shielding system for polycation gene carriers

XIA JiaLiang^{1,2}, CHEN Jie¹, TIAN HuaYu¹ & CHEN XueSi¹

1 Key Laboratory of Polymer Ecomaterials, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Science, Changchun 130022, China;

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: To increase the *in vivo* stability of polycation gene carriers, a pH-sensitive shielding system, γ -benzyl l-glutamate-co-glutamate acid polymer (PGA(60) (60 means the mol ratio of glutamate acid in the polymer)), was synthesized and characterized. PGA(60) shows pH sensitivity at about pH 6.0. PGA(60) could efficiently shield the positive charge of DNA/PEI (1:1) complexes. Gel retardation assay showed that no DNA-strand exchange with PGA(60) occurred after adding PGA(60) to DNA/PEI complexes in different proportions. MTT cytotoxicity test demonstrated that both PGA(60) and DNA/PEI/PGA(60) ternary complexes had no cytotoxicity within the test concentration. The transfection efficiency was improved when the positive charge was partly shielded by PGA(60). Because of the charge repulsion between the surface of cells and ternary complex particles, there was almost no transfection efficiency when the zeta potential of ternary complexes turned to negative. Because of the suitable pH sensitive range, PGA(60) may be a potential shielding system for polycation gene carriers to be used *in vivo*.

Keywords gene delivery, shielding system, pH-sensitive, polyglutamate