

阳离子聚合物在基因传递系统中的应用

陈建海*

(第一军医大学南方医院药学部, 广东 广州 510515)

关键词: 基因传递系统; 基因载体; 非病毒类载体; 阳离子聚合物

中图分类号: R943.42; R915.2 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2003)04 - 0316 - 05

Application of cationic polymer vector for gene delivery systems

CHEN Jian-hai*

(Department of Pharmaceutical Science, Nanfang Hospital, First Medical University of PLA, Guangzhou 510515, China)

Key words: gene delivery systems; gene vector; non-virus carriers; cationic polymer

随着近代生物技术的发展与人类基因库的不断完善,各种与人类疾病相关基因逐步被揭晓,使人类从分子水平上认识某些疾病根源已逐步成为可能,为基因治疗提供了理论基础。

基因治疗即 DNA 给药系统,属于靶向给药系统,它不同于一般靶向药物作用于机体的某器官或某组织,它是细胞与分子水平上的靶向作用。基因治疗从 1980 年第 1 篇哺乳类基因转移公开报告^[1]到 1994 年 300 余人接受临床基因治疗试验,整整花了 15 年时间,1994 年美国重组 DNA 咨询委员会 (RAC) 批准了人基因治疗方案。此后,许多分子疾病 (molecular disease) 和代谢缺陷病 (errors of the metabolism) 如恶性肿瘤、心血管疾病、糖尿病、高血压等开展了基因治疗。

目前,基因治疗的 DNA 给药系统主要面临两个重大问题需要解决:一是安全性,即治疗基因(或称目的基因)进入受体细胞后,能否得到正常的表达,产生人们期望的治疗蛋白质,而不产生其他异常蛋白质;二是高效性,即目的基因能顺利通过细胞膜不受破坏,进入受体细胞核,经过转录,翻译成治疗蛋白质,并达到可接受的基因表达水平,即具有较高的基因转染效率 (transfection efficiency) 和转化效率 (transformation efficiency)。

要解决上述两大问题,选择适宜基因载体尤为重要。目前,基因载体可归纳为两大类:一类是病毒类载体,主要是重组腺病毒 (recombinant adenovirus, Ad) 与重组逆转病毒 (retrovirus, Rt); 另一类是非病毒类载体,主要是脂质体与阳离子聚合物。病毒类载体是临床与实验中最常用的一种,其优点是转染效率高,但近年来临床实验报道,有诱发癌症与感染的危险,特别是 1999 年出现首例因使用腺病毒载体而致病人死亡的事件发生后^[2],美国许多科研机构已停止使用病毒类载体,重点转向非病毒类载体研究。

非病毒类载体按目前文献报道主要分为以下两大类:

1 脂质体介导的 DNA 传递系统 (liposome mediated DNA delivery systems)

脂质体介导 DNA 主要依赖于组成脂质体的磷脂成分能促进细胞膜的融合,加速 DNA 的转移,它的主要优点是:① 脂质体与基因复合过程容易,便于生产;② 脂质体是非病毒性载体,与细胞膜融合后将目的基因导入细胞,本身降解,无毒、无免疫原性;③ DNA 可得到保护,不被灭活或被核酸酶降解。

目前用于该系统的脂质体种类主要是大单室 (large unilamellar vesicles, LUV) 脂质体、pH 敏感脂质体、免疫脂质体、融合脂质体与阳离子脂质体。这些脂质体各有优缺点,如 pH 敏感脂质体虽提高了 DNA 的转染效率,但在血浆、血清中不稳定,将胆固醇或神经节苷脂等物质加入脂质体可提高稳定性,但在酸性介质中与细胞膜结合力却大大降低。免疫

收稿日期: 2002-04-09.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970876)。

* 通讯作者 Tel: 86 - 20 - 85142173,

E-mail: jhchen@fimmu.edu.cn

脂质体是将抗体偶联在磷脂上,提高了识别靶细胞能力,但该脂质体易被溶酶破坏,此外,它具有免疫原性,会降低它在循环系统中的半衰期。融合脂质体,主要是模拟某些病毒(如 HIV 或 Sendai 病毒)与细胞膜的合并方式,在制备脂质体时加入融合剂,如聚乙二醇、甘油、聚乙烯醇或重组病毒细胞膜等。提高了系统对细胞的渗透性,但由于免疫原性太强,制备复杂,细胞专属性及血浆中稳定性差,临床应用受限制。

从整体上讲,阳离子脂质体比其他类型脂质体具有更多优点,其主要优点有:①阳离子脂质体对 DNA、多肽、蛋白类大分子等这些聚阴离子或阴离子型聚电解质敏感,有比较高的转运能力,能转运 RNA、核糖体、带负电荷分子与两性大分子物质进入细胞,且转染效率比其他类型脂质体高几个数量级;②阳离子脂质体与其他脂质体不同,不必将基因包裹于脂质双分子层中,直接混合,靠静电形成复合物,因而不受基因体积大小限制^[3],但复合物的转染效率与制备时脂质体、基因加入的前后顺序关系很大;③阳离子聚电解质(多熔素、聚组氨酸等)能使原来 DNA 螺旋结构的庞大空间体积缩合至原有体积百万分之一以下,加强了系统穿透能力,使得基因-阳离子脂质体复合物成为多种结构混合体^[4]。

Conary 等^[5],先将合成信号肽与质粒 DNA 连接,然后再与阳离子脂质体形成复合物,体外实验表明,合成信号肽的加入大大增加了细胞摄取和转基因(transgene)表达。

Ross 等^[6]认为阳离子脂质体/DNA 复合物(脂质聚簇物 lipoplexes)作为基因载体主要障碍,是血浆抑制作用,而聚簇物的大小是转染效率的主要决定因素。随着聚簇物增大,转染效率与 CHO 细胞捕捉聚簇物机率增加,聚簇物中阳离子脂质与 DNA 比值、脂质体类型以及在含有聚阴离子介质中孵化时间,都是通过它的大小来影响转染效率,特别是应用多层脂质体的大聚簇物,血浆的抑制作用可被克服。

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(chromosomal integration)机制。

2 聚电解质复合物在基因传递系统中应用

由于重组病毒与脂质体在基因介导中存在安全性与低转染率等问题,限制了它们在基因治疗中应用。近年来国外更大量研究已转向应用水溶性生物可降解的阳离子聚合物作为基因载体^[7]。由于水溶性阳离子聚合物与基因能形成稳定的聚电解质复合

物^[8],并能模拟病毒结构^[9]穿透受体细胞膜,内化(internalization)到胞浆质(endosomal)中,随后胞浆化的 DNA 被移植入细胞核,而阳离子聚合物载体降解并被吞噬。它的优点是不会产生象病毒载体那样导致癌变危险性,但几乎没有用聚阴离子为载体的报道^[10]。

目前国外文献报道大量用于基因载体的阳离子聚合物,按结构可分为以下几大类:

2.1 赖氨酸阳离子聚合物类

聚赖氨酸(poly-L-lysine, PLL)是一种多肽类聚合物,单独使用 PLL 作为载体,当 PLL/DNA 进入血浆后易产生聚集,不稳定。Harada 等^[11]用嵌段聚乙二醇(PEG)共聚 PLL 阳离子与 PEG 嵌段共聚的聚天冬氨酸阴离子(PEG polyaspartic acid)在溶液中自发形成稳定单分散的聚电解质复合物纳米粒,内层为聚阳离子/聚阴离子通过静电形成的复合物疏水内核,外层为 PEG 亲水链段,被称为聚离子复合物胶束^[12]。该离子复合物胶束可做为基因载体。与 PLL/DNA 复合物相比,PLL-*b*-PEG/DNA 复合物更稳定,也更易在细胞中溶解,同时可大大降低对细胞的毒性作用,提高基因的转染率^[13]。Kataoka 等^[14]用反义核苷酸代替聚天冬氨酸与阳离子嵌段共聚物形成阴离子复合物胶束,得到类似结果。最近 Kim 等^[15]报道用硬脂酰化聚赖氨酸,低密度脂蛋白(LDL)和基因形成三元复合物,¹H NMR 谱揭示 PLL 分子链上硬脂酰基团与 LDL 间存在很强的疏水作用。用琼脂凝胶电泳测试表明硬脂酰化聚赖氨酸的加入使三元复合物表面正净电荷明显增加。Zaumer 等^[16]试验两种类型非病毒类载体:一种是阳离子脂质化(lipofection)为载体(lipofectamine),另一种聚阳离子为载体以 PLL 为基础并用甘油强化的转铁蛋白(transferrinfection),测试两种载体在人成纤维细胞中转染率。试验证明用质粒 DNA/PLL 复合物注射入成纤维细胞的浆中,比单独注射质粒 DNA 产生更多数量的细胞表达,很好地解释了聚赖氨酸在细胞核转运过程中更高水平的转染率。

2.2 带有季铵盐结构的聚阳离子类

近年来国外文献^[17]报道带有季铵盐结构的聚阳离子作为基因载体,具有很高的基因转染率,如精胺(spermine)、精脒(spermidine)、丙二胺(propanediamine)、聚乙烯基亚胺(polyetheneimine, PEI)与其他聚合物,如甲基丙烯酸酯类形成可溶性衍生物,都可得到较高的基因表达效率。

某些聚阳离子,如脂质聚酰胺(lipopolyamines)和

聚氨基酰胺 (polyamidoamine) 在低于生理 pH 下具有相当的缓冲能力, 试验证明它不需要添加任何细胞靶向剂或细胞膜突破剂 (disruption agents), 即可作为有效的细胞转染剂, 1995 年 Boussif 等^[18] 试用 PEI 阳离子聚合物作为基因载体, 分析了 PEI 结构, 认为 PEI 聚合物链中每相隔 3 个原子, 即每“第 3 原子” (every third atom) 都是质子化的氨基氮原子, 使得聚合物网络在任何 pH 下都能充当有效的“质子海绵” (proton sponge) 体。这种聚阳离子能将萤火虫素酶 (luciferase) 报告基因, 转入各种种属细胞, 其效果不亚于, 甚至好于脂质聚酰胺, 它的细胞毒性低, 只要高于一定浓度, 便可得到最佳的转染效率。用荧光素探针跟踪, 用 PEI 载体将寡核苷酸传递入胚胎神经元 (embryonic neurons), 所有神经元都显示细胞核标记, 无任何毒性反应。在体内基因转染中, 最佳复合物结构即 PEI 阳离子与 DNA 阴离子比率, 应使复合物略带阳性电荷。实验证明, PEI 是非常有希望的基因治疗载体。在设计更复杂的基因载体中, PEI 可做为核心组成成分。它的转染效率是基于溶酶体保护, 使 DNA 免于核酸酶降解, 随后溶酶体溶胀与破裂提供了 PEI/DNA 粒子逃脱机制。

Guo 等^[19] 报道, 用 PEI 阳离子聚合物能将 DNA 分子转移到培养的哺乳类动物细胞上。当将 PEI/DNA 复合物应用到基因治疗时, 由于血浆存在, 细胞转染活性降低, 使得该复合物使用受限。发现对于任何种属的细胞, 叶酸 (folic acid) 都能明显加强该复合物在血浆中细胞转染活性, 不管在 PEI/DNA 复合物形成之前或之后, 加入叶酸都能观察到此现象。但其他阴离子化合物, 如胆酸 (cholic acid)、柠檬酸、EDTA、谷氨酸 (glutamic acid) 却观察不到这种现象, 这一新制剂的发现为基因传递及基因治疗提供了可靠、廉价、高效方法。

Lee 等^[20] 在带有负电荷 DNA/PEI 复合物表面, 再包裹一层由融合多肽 KALA 与 PEG 形成的带正电荷复合物, 该复合物由端基为马来酰胺的甲氧基聚乙二醇——一种半胱氨酸 (cysteine) 特殊衍生物与 KALA 反应而得, 作为基因传递内核体突破剂。包裹后的复合物带净正电荷。随着 PEG-KALA 数量增加, 该正电荷复合物粒径变化在 200 ~ 400 nm, 而单独用 KALA 包裹的 DNA/PEI 复合物却很大程度上发生凝聚。这是由于复合物表面 PEG 链抑制了阳离子 KALA 引发的粒子间的相互作用, 随着 PEG-KALA 包裹层的增加, 细胞转染率明显上升, 说明 KALA 的融合活性加强了基因表达水平。

Chemin 等^[21] 报道, 用线性 PEI 衍生物做为载体, 在体内与体外转移基因和去氧寡核苷酸 (oligodeoxynucleotide) 到肝细胞, 体外原代肝细胞转染率高达 50%。此外, 通过 iv 北京鸭, 将荧光去氧寡核苷酸有效传递到肝脏。因此, 线性 PEI 衍生物可有效转基因与去氧寡核苷酸到第 1 代肝细胞, 可做为基因治疗有效工具。

Kircheis 等^[22] 针对体内基因靶向传递各种障碍, 以及与各种非靶向细胞的结合作用等, 提出一类聚阳离子载体, 包括用腺病毒加强的转铁蛋白 (AVET) 和转铁蛋白/PEI (TF-PEI), 将 DNA 传递到皮下生长肿瘤, 测量在主要器官与肿瘤中的 DNA 分布与报告基因表达, 发现用 TF-PEI 或 AVEI 复合物在肿瘤中的基因表达约是裸 DNA 的 10 ~ 100 倍, 应用中性的 AVET 复合物与空间稳定的 PEG 接枝的 TF-PEI/DNA 复合物, 经全身系统给药后, 能将目的基因转运到皮下生长瘤体, 而应用带正电荷聚阳离子/DNA 复合物都导致在肺部的优先基因表达, 说明该载体有一定的毒性。该实验证明, 当系统应用基因治疗时, 转染复合物的物理参数, 如粒子大小、稳定性、表面电荷决定 DNA 分布毒性及转染效率。控制这些参数, 就能使目的基因在不同器官得到合理分布与有效表达。

Goula 等^[23] 认为, 用阳离子载体通过静脉给药传递 DNA, 由于带正电荷的复合物与血浆蛋白作用, 通常情况下是不可取的。然而如果优选剂型, 阳离子载体可以通过静脉或呼吸道给药途径提供可观水平的基因表达。该作者用线性的、分子质量为 22 ku 的 PEI 阳离子聚合物为载体, PEI/DNA 复合物的 5% 葡萄糖水溶液通过成年鼠尾静脉输入, 用 β -乳糖酶和萤火虫素酶为标记基因, 当 DNA 与 PEI 复合物比率为每个 DNA 磷酸盐等价于 4 个氮原子时, 萤火虫素酶可在肺中得到高水平表达 [1×10^7 RLU (recombinant luciferase) \cdot mg⁻¹ (protein)]。低水平转染发现在心、脾、肝、肾所有组织中表达都与剂量和时间呈依赖关系, 而 β -乳糖酶在肺中却呈现成串的 (10 个或更多) 肺细胞转基因表达, 这一试验表明复合物可通过肺中毛细血管障碍。虽然该机理还需进一步阐明, 但线性 PEI 做为治疗基因的静脉传递载体是具有很好前景的。

2.3 壳聚糖及其衍生物类

脱乙酰化的天然甲壳素形成生物相容性好、可生物降解、无毒的阳离子聚合物, 经过多步提纯, 得到超纯的壳聚糖 (ultrapure chitosan, UPC) 可做为基

因载体,用 UPC 纳米粒包埋 DNA 显示比裸质粒 DNA(pDNA)高得多的细胞转染率,并增加了 DNA 在体内稳定性。Halladay 等^[24]用壳聚糖($M_r = 4 \times 10^5$)纳米粒传递质粒 DNA 到培养中的人上皮肾细胞株(HEK)293A 中,其转染率高于表面吸附 DNA 的壳聚糖纳米粒,这种纳米粒形式可用于开发口服流感 DNA 疫苗。其机理是 DNA 疫苗在小肠的 Peyer's 结被有效捕捉,而产生粘膜免疫。用表面吸附方法具有低转染率,其原因可能是:①吸附于纳米表面 DNA 不稳定;②纳米粒与 DNA 引起聚集或者是交联剂毒性引起。

Koping-Hoggard 等^[25]建立了壳聚糖与质粒 DNA(pDNA)聚簇物 UPC/pDNA 结构与性能关系,比较了 UPC/DNA 聚簇物与 PEI/DNA 复合物在体外与小鼠气管中给药后的结果。结构测定表明分子中三分之二的带有伯氨基基团的壳聚糖单元能与 pDNA 形成稳定的胶体复合物。优选后 UPC/DNA 与 PEI/DNA 复合物在几乎同样程度上都能保护 pDNA 免受血浆的降解,它们在细胞株 293 中都能给出最大的转基因表达,与 PEI/DNA 复合物相比较,UPC/DNA 在剂量逐步加大时,UPC 仍无毒性显示。用一种含转译增强剂的敏感报告基因 pLacZ 能观察到转基因在上皮细胞中的表达。然而,基因表达的动力学是不同的。PEI/DNA 复合物引发基因表达的开始阶段比 UPC/DNA 复合物快,这可能由于 PEI/DNA 复合物能更迅速逃脱内核体(endosome)之故。虽然 PEI 复合物能导致基因更有效表达,但 UPC 与普通的阳离子脂质相比较,已表现出相当有效的基因表达,这一研究为应用壳聚糖做为基因传递载体打开了新思路。

2.4 其他类型基因载体

除了上述 3 种类型载体有较多报道外,另外有带氨基与羧基的共聚物,如 Lim 等^[26]报道人工合成的聚[2-(4-氨基丁基-L-乙醇酸)](PAGA)与 DNA 以电荷比为 1:1 的组成,能形成自组装生物可降解的复合物,PAGA 体内降解最终产物为 L-氧化赖氨酸,它的转染效率约为 PLL/DNA 复合物的 2 倍多。

Lim 等^[27]报道,在 4,4'-偶氮-双-(4-氰基戊酸)引发剂作用下,用含端羧基的 2-(二甲氨基)-乙基甲基丙烯酸酯与 N-乙烯基-2-吡咯酮共聚,得到 P(DMAEMA-co-NVP)共聚物,再用加有二环己基碳化二亚胺(dicyclohexylcarbodiimide, DCC)的 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)加以活化,然后与 PEG 双二胺复合,得到 P[(DMAEMA-NVP)-b-PEG]嵌段共聚物,再用偶

联法将半乳糖分子引入该共聚物端基,以此阳离子聚合物为载体,外包融合多肽,形成 p[(DMAEMA-NVP)-b-PEG]-半乳糖聚阳离子/DNA/KALA 复合物粒子,平均粒径为 200 nm,在 HepG 2 人肝癌细胞上测定,得到转染率与商业化试剂相同。

此外,Wen 等^[28]报道用生物可降解两亲聚磷酸酯 poly(phosphoester)为主链,胆固醇为支链阳离子聚合物 PCEP 与挂有红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)形成大小为 100~120 nm, Zeta 电位为 20~30 mV 的纳米粒 PCEP/pRFP 作为基因给药系统。在体外, Caco-2 细胞实验中,呈现很高的细胞转染率。用口服管饲法(oral gavage)观察到大鼠小肠中有很高的 RFP 表达。

Fonseca 等^[29]报道用聚[2-(二甲氨基)-乙基丙烯酸甲酯](PDMAEMA)阳离子为载体进行 β -葡糖醛酸酶基因治疗,发现该载体有压缩(condense) pDNA 作用,在 OVCAR-3 细胞上呈现有效转染作用,比商品阳离子脂质(lipofectamine)转染率高 30%。说明用 PDMAEMA 为载体的 β -葡糖醛酸酶基因治疗,在癌基因治疗中有显著潜在应用价值。

Howard 等^[30]用不同比例三甲基乙基甲基丙烯酸酯(TMAEM)与 N-(2-羟丙基)甲基丙烯酸酰胺(HPMA)形成阳离子共聚物为载体,评价载体的亲水性对载体与 DNA 自组装形成的聚电解质稳定性的影响。

3 前景与问题

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。

从目前发展趋势看,水溶性生物可降解类阳离子聚合物,在安全性、毒性、稳定性等方面都优于其他类载体,在体内多种器官与组织的细胞转染效率有的已达到临床的要求,但仍有相当部分载体在提高转染率上需下功夫,寻找无毒、基因表达高效的基因新载体是今后基因载体研究与主攻方向。

基因转染效率与多种因素有关,同一种载体对不同的目的基因与受体细胞转染效率也不一样,载体的组成、结构、分子量、粒径大小、表面电荷、热力学性质对基因转染效率都有不同程度的影响。对于这些机理研究,报道不多。

病毒类载体至今还起着一定作用,其安全性已引起各国医学界的普遍关注,它终将被非病毒类载体所替代。

References :

- [1] Mulligan RC, Berg P. Expression of a bacterial gene in mammalian cells [J]. *Science*, 1980, **209**(4463) :1422 - 1427 .
- [2] Fox JL. Gene therapy safety issues come to fore [J]. *Nat Biotech*, 1999, **17**(2) :1153 - 1157 .
- [3] Zelphati O, Francis C, Szoka J. Liposomes as a carrier for intracellular delivery of antisense oligonucleotide : a real or magic bullet ? [J]. *J Controlled Release*, 1996, **41** :99 - 102 .
- [4] Lasic DD, Templeton NS. Liposomes in gene therapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1996, **20**(3) :221 - 225 .
- [5] Conary JT, Erdos G, Guire MM, *et al.* Cationic liposome plamid DNA complexes : *in vitro* cell entry and transgene expression augmented by synthetic signal peptides [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 1996, **42**(4) :277 - 281 .
- [6] Ross PC, Hui SW. Lipoplex size is major determinant of *in vitro* lipofection efficiency [J]. *Gene Ther*, 1999, **6**(4) :651 - 657 .
- [7] Carnett MC. Gene delivery systems using cationic polymer [J]. *Grat Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1999, **16**(2) :147 - 152 .
- [8] Verma IM, Somia N. Gene therapy-promises, problem and prospects [J]. *Nature*, 1997, **389** :239 - 241 .
- [9] Hill IR, Garnett MC, Bignotti F, *et al.* Determination of protection from serum nuclease activity by DNA-Polyelectrolyte complexes using an electrophoretic methods [J]. *Anal Biochem*, 2001, **291**(1) :62 - 65 .
- [10] Luscher MM. Polyanions-a lost chance in the fight against HIV and other virus diseases ? [J] *Antiviral Chem Chemother*, 2000, **11**(4) :249 - 253 .
- [11] Harada KK. Formation of polyion complex micelles in an aqueous milieu from a pair of oppositely-charged block copolymers with poly (ethylene glycol) segments [J]. *Macromolecules*, 1995, **28** :5294 - 5298 .
- [12] Wolfert MA, Schact EH, Toncheva V, *et al.* Characterization of vectors for gene therapy formed by self-assembly of DNA with synthetic block copolymers [J]. *Hum Gene Ther*, 1996, **7**(4) :2123 - 2128 .
- [13] Kabanov AV, Vinogradov SV, Suzdaltseva YZ, *et al.* Water-soluble block polycations as carriers for oligonucleotide delivery [J]. *Bioconjugate Chem*, 1995, **6**(2) :639 - 643 .
- [14] Kataoka K, Togawa H, Harada A, *et al.* Spontaneous formation of polyion complex micelles with narrow distribution from antisense oligonucleotide and cationic block copolymer in Physiological saline [J]. *Macromolecules*, 1996, **39** :8556 - 8557 .
- [15] Kim JS, Kim BI, Maruyama A, *et al.* A new non-viral DNA delivery vector : terplex system [J]. *J Controlled Release*, 1998, **53** :175 - 182 .
- [16] Zaumer W, Brunner S, Buschle M, *et al.* Differential behavior of lipid based and polycation based gene transfer systems in transfecting primary human fibroblasts . a potential role of polylysine in nuclear transport [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1428**(1) :57 - 61 .
- [17] Bragonzi A, Boletta A, Biffi A *et al.* Comparison between cationic Polymers and lipids in mediating systemic gene delivery to the lung [J]. *Gene Ther*, 1999, **6**(12) :1995 - 1999 .
- [18] Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, *et al.* A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo* polyethylenimine [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**(6) :7297 - 7301 .
- [19] Guo W, Lee RJ. Efficient gene delivery via non-covalent complexes of folic acid and polyethylenimine [J]. *J Controlled Release*, 2001, **77**(1 - 2) :131 - 134 .
- [20] Lee H, Jeony JH, Park TG. A new gene delivery formulation of polyethylenimine/ DNA complexes coated with PEG conjugated fusogenic peptide [J]. *J Controlled Release*, 2000, **76**(1 - 2) :183 - 187 .
- [21] Chemin I, Moradpour D, Wieland S, *et al.* Liver-directed gene transfer : a linear polyethylenimine derivative mediates highly efficient DNA delivery to primary hepatocytes *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Viral Hepat*, 1998, **5**(6) :369 - 372 .
- [22] Kircheis R, Schuller S, Brunner S, *et al.* polycation-based DNA complexes for tumor targeted gene delivery *in vivo* [J]. *J Gene Med*, 1999, **1**(2) :111 - 114 .
- [23] Goula D, Benoist C, Mantero S, *et al.* polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung [J]. *Gene Ther*, 1998, **5**(9) :1291 - 1295 .
- [24] Halladay J, Williams I, Babensee J. Effect of mode of DNA association with chitosan nanoparticles on the efficiency for gene delivery [A]. *Proceedings of 28th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials* [C]. Boca Raton, CRS, 2001, USA :795 - 798 .
- [25] Koping-Hoggard M, Tubuleka I, Guan H, *et al.* Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine *in vitro* and after lung administration *in vivo* [J]. *Gene Ther*, 2001, **8**(14) :1108 - 1112 .
- [26] Lim YB, Han SU, Kong HU, *et al.* Biodegradable polyester, poly[2-(4-aminobutyl)- L-glycolic acid], as a nontoxic gene carrier [J]. *Pharm Res*, 2000, **17**(7) :811 - 815 .
- [27] Lim DW, Yeom YI, Park TG. Poly(DMAEMA-NVP)- β -PEG-galactose as gene delivery rector for hepatocytes [J]. *Bioconjug Chem*, 2000, **11**(5) :688 - 672 .
- [28] Wen J, Kiang T, Mao HQ, *et al.* Biodegradable poly (phosphester) for oral gene delivery [A]. *Proceedings of 28th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials* [C]. Boca Raton, CRS, 2001, USA :95 - 99 .
- [29] Fonseca MJ, Storm G, Hennink WE, *et al.* Cationic polymeric gene delivery of beta-glucuronidase for doxorubicin prodrug therapy [J]. *J Gene Med*, 1999, **1**(6) :407 - 411 .
- [30] Howard KA, Dash PR, Read ML, *et al.* Influence of hydrophilicity of cationic polymers on the biophysical properties of electrolyte complexes formed by self-assembly with DNA [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1475**(3) :245 - 249 .