pH 敏感基因载体的研究现状

沈银^a 胡桂香^b 张华星^b 齐莉莉^b 骆成才^{*b}

(^a 浙江大学化学系 杭州 310027)

(^b 浙江大学宁波理工学院 生物与化学工程分院 宁波 315100)

摘要 基因治疗正成为遗传病、癌症等疾病的有效治疗方法. 基因治疗实现的最大挑战是开发安全有效的基因运载体以将目的基因从血液运送到细胞质或细胞核. 目前, 常用的基因治疗载体有病毒载体和非病毒载体. 非病毒载体由于安全性好, 易于合成, 易于修饰而得到了更为广泛的研究. 其中 pH 敏感载体作为功能性非病毒载体, 不仅安全性高, 而且有更好的体内基因转染效率, 为非病毒性载体在临床上的应用开辟了广阔的前景. 本文主要从 pH 敏感脂质和 pH 敏感聚合物两方面对 pH 敏感基因载体进行简要综述, 介绍了该两类载体的构建方法及其对基因的运载机制.

关键词 基因治疗; 基因传递; 非病毒基因载体; pH 敏感脂质体; pH 敏感聚合物

Recent Progress in pH-Sensitive Gene Carriers

Shen, Yin^a Hu, Guixiang^b Zhang, Huaxing^b Qi, Lili^b Luo, Chengcai^{*b}

(^a Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

(^b School of Biological and Chemical Engineering, Ningbo Institute of Technology, Zhejiang University, Ningbo 315100)

Abstract Gene therapy shows promise as a potentially revolutionizing strategy for treatment of many genetically-related diseases, such as cancer. However, the lack of safe and effective gene delivery carriers (or vectors) has become a bottleneck in its basic research and clinical application. Generally, gene delivery carriers can be divided into viral and non-viral ones. Although non-viral gene delivery carriers can offer some advantages such as safety and facile fabrication, they don't possess the same high gene delivery efficiency as viral gene delivery carriers do, due to lack of functionality to overcome many intracellular gene-delivery obstacles. Currently, many kinds of "smart" non-viral gene-delivery carriers have been developed in order to realize efficient gene-delivery, since such carriers can undergo physical or chemical reactions in response to changes in pH, oxidative state, or enzymatic activity. As these stimuli or cues may be specific to a biological site, tissue, or condition, it may facilitate the release of the nucleic acid cargo at the desired site in an efficient manner. Among all these stimuli-responsive carriers, pH-responsive one has attracted major attention and great impetus has been directed towards utilizing the subtle yet significant change in pH value within the cellular compartments. In this review, we give an overview of pH-sensitive lipids and polymers which have been designed and developed in recent years, with focus on their structural features and consequent functional attributes to achieve efficient transfection. The underlying modes of actions relating to structure and differential pH environment have also been discussed. It is worthy to note that despite many pH-sensitive carriers have shown success *in vitro* and a few *in vivo*, none have entered clinical phase for their transfection activity is still insufficient. To develop more efficient gene delivery carriers, the exact mechanisms of how these pH-sensitive carriers overcome each intracellular obstacle, as well as some concepts such as "proton sponge", have to be made more clear or verified further.

Keywords gene therapy; gene delivery; nonviral gene carrier; pH-sensitive lipids; pH-sensitive polymers

1 引言

基因治疗(gene therapy)是指将正常的外源基因导入到人体靶细胞中, 以取代、补偿或者纠正异常基因, 从而达到治疗疾病的目的. 1990 年, 第一例用逆转录病毒载体治疗重症联合免疫缺陷综合症的基因治疗方案在临床上应用^[1]. 1991 年, 中国也成功实施了首例血友病 B 的基因治疗^[2]. 基因治疗对于人类疾病的治疗, 尤其是肿瘤的治疗具有巨大的潜力. 然而, 怎样有效地将基

因运送到靶细胞的细胞质或细胞核中, 仍是一项巨大的技术挑战.

目前, 可用于基因治疗的载体主要包括病毒载体和非病毒载体. 病毒载体具有较高的基因转染效率, 但同时存在可能引起免疫反应和致癌、致畸等风险^[3]. 为了提高基因治疗的安全性与效率, 近年来非病毒载体的研究受到广泛的关注. 非病毒载体介导基因运载时, 载体与目的基因通过静电作用形成基因-载体复合物; 运载过程主要包括血液中的运送、细胞膜内吞、内涵体和溶

* E-mail: luochengcai@nit.net.cn

Received November 28, 2012; published January 31, 2013.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21002088) and Ningbo Natural Science Foundation (No. 2012A610177).

项目受国家自然科学基金(No. 21002088)和宁波市自然科学基金(No. 2012A610177)资助.

酶体逃脱以及进入细胞核(见图1)^[4]。这里的每一步运载过程都会遇到挑战,影响着基因运载的有效性。例如,在高聚物介导的基因转运中,基因-高聚物复合物在被细胞膜内吞过程中可能涉及到四种机理,即网格蛋白介导内吞(Clathrin-mediated endocytosis, CME)、细胞膜穴样内陷介导内吞(Caveolae-mediated endocytosis)、微胞饮内吞(Micropinocytosis)和巨胞饮内吞(macropinocytosis)^[5]。如果基因-载体复合物以CME机理进入细胞,则复合物进入细胞后,内吞囊泡先与内涵体融合并在细胞质内形成早期的内涵体,部分复合物可能被重新运送到细胞膜边缘而经由外吞作用排出;多数情况下内涵体成长后pH降低至5.0~6.0,接着被送至溶酶体并与其融合。溶酶体内pH一般低于4.5,而且有很多种降解酶。如果复合物不能从内涵体逃脱到细胞质,基因就会在溶酶体中因被降解而丧失功能^[6];如果基因-载体复合物以细胞膜穴样内陷介导内吞机理进入细胞,由于内吞囊泡不易与溶酶体融合,并且其内部pH为中性,因此基因被破坏的可能性更小,基因运载过程也就更加有效^[7]。

图1 非病毒性载体运载基因的过程

Figure 1 Nonviral-vector-mediated gene delivery

长期以来,许多研究者都致力于设计更为“聪明”的基因载体。研究发现,将刺激施加在病态区(如癌细胞)表面时,能够触发药物载体性质的改变,从而增加或控制药物的释放,增加细胞对药物的摄取,或者控制药物在细胞内的传递。研究者们根据这一现象,设计了一些对刺激敏感的基因载体,包括pH敏感载体、氧化还原敏感载体和热敏感载体等^[8]。

氧化还原敏感载体利用细胞内和细胞外高度的氧化还原电势差,达到运载和释放基因的目的。这种载体一般包含一组或多组二硫键。然而,氧化还原敏感载体的应用需要高浓度还原剂,而在病态组织中可能不存在这种环境^[9]。而且,通过细胞内吞作用进入细胞时,在温和的弱酸性条件下,二硫键还原速度较慢^[10]。

热敏感载体的构建源于热疗辅助疗法。实践中发现,肿瘤细胞比正常细胞对热诱导引起的破坏敏感^[11]。一般来说,热敏感聚合物在水溶液中具有特定的低临界溶解温度(LCST),低于该温度时,聚合物是水溶性的;反之,则为非水溶性的。利用这一性质,热敏感载体通常包含热敏感的亲水性链段和相应的疏水性链段。目前研究的热敏感脂质也利用这一性质,在脂质表面进行热敏聚合物的修饰,如,聚N-异丙基丙烯酰胺(PNIPAAm)^[12]。热敏感载体一般难于设计和合成。

在许多生理或者病理过程中,都会涉及到pH的下降。例如,肿瘤组织细胞外和正常组织相比略显酸性,肿瘤细胞外的平均pH值为7.0而正常组织和血液中的pH值为7.4;一般认为基因载体复合物是通过胞吞作用被细胞吸收的。而胞吞通道的pH值从7.4的生理pH值,降低到内涵体中的5.5~6.0,在溶酶体中更是接近4.5^[13]。pH敏感的基因载体正是利用细胞外与内涵体间pH的不同,从而有效地克服胞内内涵体膜释放这一基因运载的主要障碍,促进基因的释放。这也是目前研究较多的一类基因载体。

2 pH敏感基因载体

pH敏感基因载体是由pH敏感的两亲性物质与其它物质(如脂质和聚合物)结合得到,因此在pH值低时更具两亲性。被广泛应用于基因运载的pH敏感物质主要有两大类:pH敏感脂质和pH敏感聚合物。

2.1 pH敏感脂质

pH敏感脂质是一种具有细胞内靶向和控制药物(如基因、核酸、肽、蛋白质)释放的功能性脂质。pH触发基因释放的原理包括:(1)通过质子化使带负电的双层脂质成中性,使得层状结构向六角相结构转化;(2)质子化的聚合物或者肽段吸附到双层膜上,通过裂解、相分离、空隙的形成或者融合破坏双层膜结构;(3)稳定的双层脂质酸催化水解形成不稳定的片段或圆锥形脂质;(4)中性表面活性剂电离,形成正电性的和表面活跃的共轭酸^[14]。

然而,在被靶细胞吸收前,脂质体需在体循环中足够稳定,以避免被RES吸收及被快速地清除。同时,要求脂质体对pH的改变有适当的灵敏度,以应对目标点上pH的下降。如,胞吞作用前后,pH从7.4下降到5.0~6.0只需10~30 min,其后内涵体就会与溶酶体融合^[15]。因此,pH敏感脂质体必须对初始的pH下降有所响应,并且能较快的释放基因以避免被溶酶体降解。

2.1.1 脂质双分子层的电中性化

Yatvin等^[16]设计了第一类pH敏感脂质,其由卵磷脂和N-棕榈酰同型半胱氨酸(PHC)组成。自此,研究者们提出了各种各样的带有羧酸基和膜融合脂质[如,DOPE (dioleoylphosphatidyl ethanolamine, 二油酰基磷脂酰乙醇胺)]的pH敏感脂质体^[17]。羧酸基团上过剩的负电荷随着pH的下降而被中和,从而减少了头部基团的表面积,触发PE-rich的层状结构向六角相结构转变,最终促进基因的释放。最常见的pH敏感脂质通常由DOPE和弱酸性的两亲性物质组成,如,油酸或者CHEMS (cholesteryl hemisuccinate, 琥珀酸胆固醇酯)^[18]。然而,在中性条件下,脂质体表面过多的负电荷可能引起与血浆蛋白和巨噬细胞不必要的相互作用,导致被快速地从体内循环中清除^[19]。用于腹膜转移癌治疗的脂

质体 CDDP (cisplatin)能够延长循环时间和增加肿瘤的摄取. Junior 等^[20]提出了一种新型的由 DOPE, CHEMS 和 DSPE-PEG₂₀₀₀(聚乙二醇修饰的磷脂, 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[methoxy(polyethylene glycol)-2000])组成的长周期 pH 敏感脂质体 SpHL-CDDP. 该脂质体在肿瘤和晚期 AUC 中表现出高保留值. Silva 等^[21]设计将 Am- β -CD/DNA 复合 DOPE-CHEMS, 在 pH 7.4 时, 观察到 DOPE 的层状和六角相结构, 在 pH 5.0 时, 只有六角相结构, 说明该脂质复合物保留了 pH 敏感性.

2.1.2 脂质的水解

为了避免 pH 敏感脂质中表面负电荷所存在的问题, 研究者们设计出了一些可用酸催化水解的可裂解 pH 敏感脂质. 因此, 引入了不同的头基、尾部疏水链、连接键和表面连接结构, 合成出了多种具有特定性质的 pH 敏感脂质结构. Cordes 和 Bull 提出了一些设计策略^[22]. 在可裂解的 pH 敏感脂质中, 不稳定的连接键可以是乙烯醚、脞、缩醛和原酸酯官能团等, 它们可在酸催化下水解(见图 2).

1. 乙烯醚水解

2. 缩醛水解

3. 原酸酯水解

4. 脞的水解

图 2 各种类型的酸敏连接键的水解方式

Figure 2 The proposed hydrolysis scheme of different types of acid-sensitive linkers

Boomer 等^[23,24]报道了一系列带有乙烯醚基团的 pH 敏感脂质(见图 3, a~c). 在低 pH 值条件下, 乙烯醚基链

裂解使得双分子层结构上存在缺陷, 促进基因释放. 与 DCAT 相比, 将 BCAT 用于小鼠, 没有明显的毒性. 而 CVEP 和 BVEP 的释药速率和膜融合速率都非常慢, 无法用于体内试验. Song 和 Hollingsworth^[25]报道了另一种 pH 敏感脂质, 其连接键是酸不稳定的缩醛基团(见图 3, d). Zhu 等^[26]也研究了一种类固醇脂质: 胆甾-5-烯-3-酮-3-(二甲基氯化铵)丙烯缩醛(见图 3, e). 该脂质在酸性条件下水解, 可达到与 DC-chole 同一水平的基因运载效率. 与乙烯醚和缩醛官能团相比, 原酸酯官能团则对酸性更加敏感. 这要归因于其水解后产生稳定的二烷基氧基阳离子. 相比于非 pH 敏感脂质, 由线性或者环状原酸酯连接阳离子头部和不饱和的疏水基团二油酰基甘油形成的脂质(见图 3, f~g)对 CV-1 和 HTB-129 细胞株有更高的转染效率^[27]. 最近, Chen 等^[28]设计了两种新型的 pH 敏感脂质(见图 3, h~i). 线性原酸酯连接键与环状原酸酯连接键相比, 更利于脂质与基因结合, 同时提高复合物的水解速率, 便于基因的释放. 脞是另一类 pH 敏感连接键, Aissaoui 等^[29]设计了两类由脞来连接的阳离子脂质(见图 3, j~m). 实验证明, BGBH-cholest-4-enone 相对于其他 3 种脂质, 能有效地介导基因的体外和体内转染, 同时具有相对低的细胞毒性. 说明若能对脞键提供相对稳定的环境, 就能提高转染效率. 其他能引起脂质水解的还有碱催化 and 酶促反应等^[14].

2.1.3 脂质双分子的电离

带有咪唑和组氨酸等基团的 pH 敏感脂质也受到了广泛的关注. Liang 和 Hughes^[30,31]设计了一些生物可降解的 pH 敏感表面活性剂作为内涵体破坏试剂. 这些表面活性剂包含一条十二烷基碳链和一个在酸性条件下可形成阳离子的咪唑基团. 其中十二烷基-2-(1-咪唑基)丙酸盐(DIP, 图 4, a)表现出较强的 pH 敏感性. 在 pH=5.0 时释放了大于 40% 的钙黄素, 而在中性条件下只有 10%. 然而, 由于单链表面活性剂倾向于从脂质体转移到生物膜, 如, 血红细胞膜, 因此不适合于体内应用. Asokan 和 Cho^[32]报道的一系列酰氧基烷基咪唑脂质中, 十四酰氧甲基咪唑(图 4, b)在 pH 5.5 时, 10 min 内能完全破坏人体的红细胞膜, 而在 pH 7.0 左右, 则需要 50 min. Budker 等^[33]设计了双链的咪唑脂质 c(图 4). 与非官能化的脂质体 DOTMA/DOPE 相比, c/DOPE 在 NIH, 3T3 和 HepG2 等细胞系中表现出更有效的转染效率. 组氨酸类脂质是属于以仿生肽为基础的脂质. Chaudhuri 等^[34]报道了一系列这类的阳离子脂质, 如 d(图 4). 他们发现除了组氨酸双亲化合物能有效地在 CHO, 203T7/A549 和 HeLa 细胞内运载 DNA, 含有多个组氨酸的脂质也能在血清中运载 DNA. Mevel 等^[35]构建的组氨酸脂质 e(图 4)利用亚磷酸酰胺作为构建部分. 当被用作辅助脂质与其他阳离子结合时, 与辅助脂质 DOPE 相比, 能增加 100 倍的基因传递效率.

图3 各种可水解的pH敏感脂质

Figure 3 Various hydrolyzable pH-sensitive lipids

2.2 pH 敏感聚合物

pH 敏感聚合物作为聚合物载体中的一种, 通过将适当的结构性或者功能性特征加入到聚合物的基本框架中, 利用 pH 的微小改变来提高基因传递的效率和靶向性. 为避免与带负电的血液组织作用, 聚合物载体中

的阳离子核需要被遮蔽. 一般情况下, 这些遮蔽物是中性的亲水性物质, 并被设计成具有 pH 触发降解的功能, 使其在到达内涵体后能够暴露复合物. 早期的研究者认为, 带有胺官能团的聚合物在内涵体的酸性环境中被质子化后通过“质子绵”(Proton sponge)效应来破坏内涵

图4 带有咪唑或组氨酸基团的 pH 敏感脂质

Figure 4 Various imidazole and histidine pH-sensitive lipids

体膜,使复合物从内涵体逃逸^[36]。最近, Won 等^[37]认为,“质子绵”理论存在许多矛盾,尚需进一步证实。Yue 等^[38]也对区别于“质子绵”效应的细胞内基因转运过程进行了综述;一些带有羧基官能团的聚合物(如聚丙烯酸乙酯,PEAA)会随着 pH 的变化改变自身疏水性,使之与内涵体膜融合从而破坏内涵体膜,实现复合物的内涵体逃逸。合理的聚合物设计应考虑细胞室内微小的 pH 变化,以有效地用于基因运载,同时提高运载系统的生物相容性和体内转染的安全性。

2.2.1 可降解 pH 敏感聚合物

虽然遮蔽物的使用可以诱导中和复合物表面电荷,延长复合物的循环时间和降低毒性,但是仍存在两个主要问题:一是减少了细胞对复合物的摄取量,二是在靶细胞上基因释放不充分。第一个问题可以通过在复合物上连接靶向配体来解决^[39];第二个问题可通过构建中性遮蔽物与阳离子聚合物核之间的酸不稳定连接键来解决,如缩醛-缩酮、腙和原酸酯等。在内涵体酸性条件下,这些连接键酸催化水解,引发复合物核上遮蔽物掉落,从而显著影响基因转染效率。

Walker 等^[40]报道了一类可逆遮蔽的聚合物,由遮蔽物聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)与聚-L-赖氨酸(poly(L-lysine), PLL)通过腙键相结合(图 5, a 和 b)。在 pH 7.4 时,该类共轭物的半衰期在 0.5~1.5 h 之间,而在 pH=5 时,均能快速的水解。但聚合物 b 的 pH 敏感性更强,是因为与腙键相连的吡啶环上质子化的氮能促进腙的水解,而聚合物 a 上酰肼衍生物的酰基,没有这种功能。尽管腙键能引导聚合物的可逆水解,但并不有利于内涵体逃逸。因此,该研究小组设计出三元复合物,将聚醚酰亚胺(Polyetherimide, PEI)与 PLL-HZN-PEG 和不可逆的聚合物 PLL-PEG 合并。用荧光素酶活性测试发现,PLL-HZN-PEG 介导的转染效率是不可逆聚合物 PLL-PEG 的 40 倍。在此基础上 Walker 等^[41]又设计出一系列胺活性的吡啶基腙键的 PEG 试剂:PEG-HZN-NHS、OPPS-PEG-HZN-NHS 和 Alesa-PEG-HZN-NHS(图 5, d~f),用作 pH 敏感 PEI 的遮蔽物。

Knorr 等^[42]合成了一种新的 PEG 修饰的聚合物,包

含一个 *p*-哌嗪基苯甲醛缩醛连接键和一个连有巯基官能团的马来酰亚胺基团。他们将 PEG-acetal-MAL 与 PEI 结合,合成出聚合物载体 PEG-acetal-PEI(图 5, g)。其在 pH 5.0 时,培养半个小时后发生聚集,说明缩醛键在酸性条件下发生水解,除去 PEG 遮蔽物。同时与其它稳定的 PEG 遮蔽的聚合物相比,PEG-acetal-PEI 在 RENCA-EGFR 细胞和 K562 细胞中的转染效率大约是它们的 10 倍。虽然缩醛键有利于载体在内涵体内水解,但从内涵体中逃脱仍是一个重要的瓶颈。此问题可以通过向聚合物载体中并入内涵体活性物质得以解决。内涵体活性物质有 DMMAn-Mel (melittin modified with dimethylmaleic anhydride) 和 PBAVE [an amphipathic poly(butyl and vinyl ether)]等。随后 Knorr 等^[43]合成了两种不同的基于缩醛的连接键—OEI-MK 和 OEI-BAA(图 5, h 和 i)。MK (2,2-bis(N-maleimidoethoxy)propane)可作为一个可逆的蛋白质交联剂, BAA (1,1-bis-(2-acryloyloxy ethoxy)-[4-methoxyphenyl]methane)则应用在酸水解的聚合物颗粒。聚合物 OEI-MK 和 OEI-BAA 具有非常快速的酸水解动力学,一般在 37 °C, pH 5.0 时,半衰期为 3 min;而在中性环境里,半衰期为 3.5~5 h。酸降解聚合物对比酸不敏感的聚合物有明显的优势,即低毒性。与酸不敏感聚合物 LT-OEI-HD(图 5, j)相比,在体内毒性试验中,聚合物 OEI-MK 和 OEI-BAA 具有较好的生物相容性。

在基于 RNAi 机制的基因治疗中,基因沉默的效果主要依赖于有效的细胞内 siRNA 运载过程,包括胞内释放和 siRNA 从载体释放到细胞质。Lin 等^[44]合成了一组 pH 敏感的梳状聚合物(图 6, a~c),该聚合物由腙键连接两种聚合物框架而形成。这些梳状聚合物在酸性条件下表现出高效的溶血活性,并随聚合物浓度的增加而增强。在 pH 5.8 时,随着腙键的水解,所有聚合物降解成小的片段,以降低毒性。同时,它们可以在低 N/P 时与 siRNA 复合形成 pH 敏感的血清和核酶稳定的复合物,成功地沉默了 GAPDH 基因。Shim 等^[45]先后设计了一系列以酸不稳定的缩酮键连接 PEI (KL-PEI, 图 6, d)的聚合物和聚精胺与丙烯酸通过缩醛键聚合(图 6, f)的聚合

图5 带有酸不稳定连接键的聚合物

Figure 5 Polymers that contain an acid-labile linkage

物, 用作有效的、细胞内靶向和生物相容的 siRNA 载体。与 L-PEI 相比, KL-PEI 具有以下几方面的优势: 一是由于胺基支链的存在, 在低 N/P 时, 也能与 siRNA 紧密的结合; 二是在 pH 5.0 时, KL-PEI 的水解速率是 pH 7.4 时的 10 倍左右, 有利于 siRNA 的释放; 三是降低了细胞毒

性, 使其成为有效的和生物相容的 siRNA 载体。PSKE 虽然在 siRNA 络合和细胞摄取方面不是很理想, 但其细胞内核酸释放却非常有效。而 PES(图 6, e)则与之相反。研究表明, 双模式降解(即在内涵体和细胞质中差别降解)的 PSKE 是无细胞毒性的非病毒载体, 并能够通

图6 带有酸不稳定连接键的聚合物用于 siRNA 运载

Figure 6 Polymers that contain an acid-labile linkage for siRNA delivery

过分子结构调整控制其酸降解性,从而协调体内和体外基因转染和基因沉默。

2.2.2 组氨酸修饰的聚合物

将一些膜不稳定的试剂,如,氯喹、甘油或者融合肽应用于聚合物,可以显著提高基因的转染效率。阳离子聚合物 PLL 和 PLH [poly(L-histidine)]具有膜融合性能。PLL 只有在超出正常生理条件下才能诱导融合。组氨酸上的咪唑基团的 pK_a 在 6.0 左右,因此可以在弱酸性条件下变成阳离子;而 PLH 在内涵体 pH 值下,可以诱导膜融合。根据以上两个观点,Midoux 小组^[46]设计一个组氨酸修饰的阳离子聚合物(图 7, a)作为基因载体。他们证实在没有氯喹或者融合肽存在的情况下,组氨酸修饰的 PLL 能够与 DNA 络合并有效地转染各种细胞系。最近研究者将聚-L-组氨酸插入到 PEG 和 PLL 之间,得到聚合物 PEG-CH₁₂K₁₈,有望用于基因局部治疗载体,以治疗肺癌等^[47]。

随后,研究者发现将氯喹并入到 PLL 或者 PLH-g-PLL 中,均能提高两者的基因传递效率^[47]。为了避免载体复合物截留在内涵体中,开发理想的聚合物基因传递系统,学者们利用 PLH 上组氨酸片段的膜融合性能,设计了一系列聚合物(图 7, b~d)^[48,49]。聚合物 b (N-acetyl-PLH-g-PLL)是一种梳状聚合物,在 293T 细胞中观察到基因转染效率明显地高于 PLL,胺化的 PLH (c)和羧甲基化的 PLH (CM-PLH, d)也受到关注。溶血实验发现,聚合物 c 在 pH 6.0 时的溶血活性远远高于 pH 7.0 时,说明在内涵体 pH 范围,胺化的 PLH 膜融合性能

有所增强。同时,在 HeG2 细胞系中观察到其转染效率也高于 PLL,并且没有明显的细胞毒性。将阴离子的聚合物 d 包裹 PEI/DNA 二元复合物,得到的 CM-PLH/PEI/DNA 三元复合物基因表达效率是 PEI/DNA 的 300 倍。这要归因于负电性的羧甲基抑制了复合物与血清蛋白的非特异性作用和 pH 敏感的组氨酸在内涵体 pH 范围内的破坏膜能力。

Wang 等^[50]设计合成了一类新型的 pH 敏感聚合物(图 7, e)。该聚合物由二硫键,可质子化的片段,如组氨酸,和多个一级和二级胺组成,可以与 pDNA 和 siRNA 稳定的复合。由于存在不同级别的氨基,在质子化后具有不同的 pK_a 。聚合物 e 具有高度缓冲能力以逃脱内涵体,并且其在血浆和胞外液中能稳定存在,不被排除到体外。

2.2.3 膜融合肽共轭聚合物

膜融合肽 GALA 是含有 30 个氨基酸残基的 pH 敏感两亲性肽段,由谷氨酸-丙氨酸-亮氨酸-丙氨酸 (EALA)基本单元重复出现和一个组氨酸及一个色氨酸组成。在低 pH 值时, GALA 表现出显著的膜融合性,有较高的基因传递效率。为了模仿信封型病毒类传递系统, Sasaki 等^[51]开发了一种人工纳米系统,称为多功能信封型纳米器(MEND)。MEND 由一个浓缩的 DNA 纳米颗粒和 Tf (transferrin)、Cholesterol-GALA (Cho-GALA)或者 PEG-GALA 修饰的脂质包膜组成。在 Tf-MEND 中引入 Chol-GALA 或 PEG-GALA 后,提高了近 10 倍的转染效率。因为 Chol-GALA 能与封装膜相互作用而破坏

图7 组氨酸修饰的聚合物载体
Figure 7 Histidinylated polymeric vectors

封装膜, 而 PEG-GALA 能穿透内涵体膜, 并将其破坏. Hatakeyama 等^[52]用 GALA 修饰 PPD-MEND 作为 siRNA 运载系统. 体外和体内转染实验表明, 由 GALA 和 PPD 共同修饰的 MEND 有利于纳米颗粒从内涵体中逃脱, 从而提高了 siRNA 的运载效率和基因沉默效果. Khalil 等^[53]则用 GALA 修饰 R8-MEND, 当 R8-MEND 是负电荷核心时, R8-GALA-MEND 在肝脏中的基因表达效率明显提高.

KALA 是一种阳离子膜融合肽, 其重复单元是赖氨酸-丙氨酸-亮氨酸-丙氨酸. 当 pH 从 7.0 降到 5.0 时, KALA 发生结构变化, 从依赖 pH 的两亲性 α -螺旋结构到不规则的线圈结构转变. Shaheen 等^[54]在 R8-T-MEND 聚合物中引入 KALA, 得到的纳米颗粒 R8/KALA-T-MEND 在 TAWS II 中的转基因表达提高了近 20 倍, 远远超过商业购买的脂质体载体—PLUS. 当转染卵清蛋白编码的 pDNA 时, 在特点抗原基(SINFEKL)处有明显的抗原现象, 而 T-MEND 和 PULS 则没有这种现象.

R8/KALA-T-MEND 作为疫苗载体具有潜在的用途. Choi 等^[55]设计的多功能 siRNA 载体系统由还原性二硫键连接的 6PEG-siRNA 与细胞穿膜肽(Hph1)和 cl-KALA 相结合. Hph1 能增加纳米颗粒的靶向性, cl-KALA 则可以帮助 siRNA 从内涵体中逃脱. 6-PEG-siRNA-Hph1/cl-KALA 在 MDA-MB-435 细胞系中表现出高效的 GFP(绿色荧光蛋白)基因沉默效果.

癌症免疫疗法中疫苗产生的关键是将肿瘤相关的抗原(TAAs)运送到树突状细胞(DCs)中. 其中, 较有效的策略是将 TAA 编码的 DNA 或者 mRNA 运送到 DCs 作为一种内源性抗原来表达 TAA. 脂质体和脂质复合物用 pH 敏感的膜融合聚合物修饰后, 如 SucPG(图 8, a) 和 MGluPG(图 8, b), 在酸性条件下能产生膜融合能力. 来自 pH 敏感聚合物的阴离子表面可以被 DC2.4 细胞上的清道夫受体识别, 并随着聚合物 pH 敏感性的增加, 转染活性随之增强. 这些带有 pH 敏感的膜融合聚合物相比于一些商品化的试剂, 在 DC2.4 细胞中具有更强的

图8 膜融合聚合物
Figure 8 Fusogenic polymers

转染效率^[51,56].

2.2.4 聚烷基丙烯酸酯载体

将疏水性单体和电离后更具亲水性的共聚单体结合作为 pH 敏感的基因载体是一种新的设计策略. pH 改变及随后的净电荷调整引起因共聚物中疏水性和亲水性平衡的改变而发生相的转变. 如, 甲基丙烯酸甲酯 (MMA) 与甲基丙烯酸 (MAc 或 MAA) 或者与甲基丙烯酸二甲氨基乙酯 (DMAEMA) 结合所得的共聚物. MMA 是疏水部位, MAc 和 DMAEMA 是亲水部位. MAc 在高 pH 值时因羧酸基团的去质子化而变得更具亲水性, 而羧酸基团质子化后, 就变得更具有疏水性. 因此, 相的转变发生在羧酸基团的 pK_a 值范围内, 即 pH 值在 4.5~5.5 之间. 共聚物 MMA-DMAEMA 则相反, 在低 pH 值时因质子化的氨基具有亲水性, 随着氨基的去质子化而具有疏水性. 这些聚合物的主要特点是在囊泡内根据 pH 的变化, 破坏生物膜, 直接进行细胞内 DNA 的传递. Felber 等^[57]设计合成的 pH 敏感核-壳型纳米颗粒 PICMs 是将 PEG-b-P(PrMA-co-MAA) 与 PAMAM 共聚得到. 该纳米颗粒能稳定存在于血清中, 而在弱酸性条件下能脱掉壳, 释放 PAMAM/siRNA. 三甲基壳聚糖和甲基丙烯酸的共聚物可以用来运载 siRNA. 在内涵体内, 发生质子缔效应, TMC-MAA-siRNA 复合物膨胀和 MAA 聚合物构象的转变, 导致内涵体膜的破裂, 使得 4 h 后在 L929 细胞系内观察到抑制 47% 的 RhoA mRNA 表达^[58]. Nouri 等^[59]研究了 DMAEMA 与 PEI 间不同的嫁接度对

基因传递的影响. 在 HEK 293T 细胞系中的基因转染实验发现, 在高聚合浓度时, DMAEMA-g-PEI 的嫁接度越高, 其细胞毒性越小. 同时发现 DMAEMA-g-PEI[88%]是最有效的基因运载载体. Convertine 等^[60]设计的 siRNA 聚合物载体包含 DMAEMA 和丙基丙烯酸 (PAA). 他们合成了一系列 PAA 组成不同的大嵌段共聚物. 其中, 由 48% BMA, 29% PAA 和 23% DMAEMA 组成的三元聚合物具有最好的溶血性及最有效的 siRNA 运载.

Stayton 等^[61]的研究表明, 一些聚丙烯酸烷基酯也具有 pH 敏感的膜不稳定性, 如聚丙烯酸甲酯 (PMAA)、聚丙烯酸乙酯 (PEAA)、聚丙烯酸丙酯 (PPAA) 和聚丙烯酸丁酯 (PBAA). 这些化合物的溶血性和 pH 敏感性可以通过调节疏水烷基链的长度来控制, 如每增加一个亚甲基, 溶血性增加. 由于 PPAA 骨架上羧基团能够逐步质子化, 因此其与疏水单体共聚后, 能在一个特定的 pH 值范围内调节构象从亲水性向疏水性转变. PPAA 成功提高了 DNA 在细胞内的传递效率. 该研究组随后又提出了一些更灵活的载体系统, 如 PDSA (吡啶基二硫化丙烯酸酯, pyridyl disulfide acrylate), Poly(EAA-co-BA-co-PDSA) 和 Poly(PAA-co-BA-co-PDSA) (图 9, a), 这些聚合物表现出了很高的 pH 响应性和膜不稳定性^[52].

图9 聚烷基丙烯酸酯载体
Figure 9 Poly(alkyl acrylate) vectors

Armes 等^[63]设计的二嵌段共聚物 PMPC-PDPA (poly(2-(methacryloyloxy)-ethyl-phosphorylcholine)-co-poly[2-(diisopropylamino)-ethyl methacrylate], 图 9, b) 在生理 pH 下形成稳定的囊泡, 但在 pH 5~6 范围内因 PDPA 上的叔胺质子化而构象转变, 快速降解成单体, 促进基因的释放. Lomas 等^[64]研究了 $PMPC_m$ -PDPA_n 共聚物上 PDPA 的摩尔分数对结合 pDNA 效率的影响 ($m=25$, $n=70\sim160$). 尽管 ζ -电势分析证实 PDPA 嵌段摩尔分数的增加使质子化的胺基增加, 但与 pDNA 结合倾向没有明确的关系. 进一步实验表明相对高百分比的 pDNA 分装出现在 $PMPC_{25}$ -PDPA₇₀、 $PMPC_{25}$ -PDPA₉₀ 和 $PMPC_{25}$ -PDPA₁₂₀ 中.

2.2.5 阴离子聚合物

另一种解决遮蔽物抑制基因释放的策略是将阴离

子和阳离子聚合物结合形成一种可调的 pH 敏感载体系统. Mignet 等^[65]报道通过调节阴离子和阳离子比例, 可以开发出包含有 DNA 的阴离子颗粒, 其在 pH 5.5~6.0 时分离和融合. 还可以在设计中加入 DOPE 或者 CHEMS. 融合性的增加主要是因为 DOPE 采用了倒锥形结构, 促进了双层脂质构象向六角相的转变. CHEMS 在中性时带负电, 能稳定双层结构; 而在酸性时质子化, 丧失了稳定性.

2.3 壳聚糖衍生物

壳聚糖(chitosan, CS)具有生物相容性, 生物可降解性和低毒性. 但其主要的缺点是低缓冲能力导致了低转染效率. 因此, 将壳聚糖用 pH 敏感基团修饰来增加其缓冲能力可提高其转染效率. 常见的 pH 修饰基团有咪唑、低分子量的 PEI 和甲基丙烯酸^[66]. Chang 等^[67]在壳聚糖中引入咪唑基团, 以增加细胞摄取量并赋予 pH 缓冲能力. 结果发现, 细胞摄取聚合物的量明显增加, 并且咪唑-壳聚糖巨大的缓冲能力大大提高了目的基因的表达效率. Ghosn 等^[68]将咪唑乙酸(IAA)导入到壳聚糖中, 利用 IAA-CS 介导基因沉默. 静脉注射后, PEG-IAA-CS/siRNA 复合物明显地减少了肺部和肝脏内的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(DAPDH 酶). 用 1,1'-羰基二咪唑作为连接键连接壳聚糖和 PEI (1.8 kDa)制备得到 CS-graft-PEI^[69]. 在三种癌症细胞系的实验结果表明, CS-graft-PEI 的长期转染效率高于 PEI (25 kDa), 且具有低毒性. 在小鼠中注射 CCL22 基因(用 CS-graft-PEI 运载)后, 癌细胞增长率明显下降. Jere 等^[70]将其用于运载对应 Akt1 基因的 siRNA 到 A549 细胞, 沉默细胞中的 Akt1 基因. 结果表明, 转染后肺癌细胞的增殖速度显著降低, 并且 A549 恶性肿瘤细胞的转移也大大减少.

图 10 壳聚糖衍生物

Figure 10 Chitosan derivatives

Dehousse 等^[58]则将 MAA 共聚到 TMC/siRNA 复合物中来改善溶酶体逃逸. MAA/TMC/siRNA 复合物能够转染 L929 细胞, 并极大地抑制 RhoA siRNA 的表达.

3 总结和展望

pH 敏感的非病毒基因载体, 如 pH 敏感脂质和 pH 敏感聚合物, 凭借其特殊的结构和功能特点, 能够为开发有效的和生物可降解的载体铺平道路. 较之 pH 敏感脂质, pH 敏感聚合物具有与基因物质结合紧密, 结构可调整性大, 修饰位点多的特点, 将会得到更多关注. 但是作为一种新兴的基因运载工具, 仍需要大量的实验和临床应用来开发这两种基因载体的潜能. 该领域未来的研究将会集中在设计易于合成的载体和详细研究载体的构效关系等方面, 以发现性质更为优良的基因载体, 并明确 pH 敏感度与转染效率之间的关系.

作者简介

骆成才, 1973 年生, 博士, 浙江大学宁波理工学院副教授, 硕士生导师. 2000 年~2005 年在浙江大学获得硕士和博士学位, 2010 年~2011 年在美国凯斯西储大学生物与医学工程系从事 pH 敏感基因载体的设计、合成及其运送性质研究. 分别在 *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, *Journal of Colloid and Interface Science*, *Journal of Organometallic Chemistry* 等杂志上发表论文十余篇.

沈银, 女, 1986 年生, 浙江大学硕士研究生, 从事小干扰 RNA 载体的合成及应用研究.

胡桂香, 女, 1976 年生, 浙江大学宁波理工学院副教授, 从事有机功能分子的计算机辅助设计研究.

张华星, 男, 1973 年生, 浙江大学宁波理工学院副教授, 从事有机功能分子的合成研究.

齐莉莉, 女, 1976 年生, 浙江大学宁波理工学院讲师, 从事细胞生物学研究.

References

- [1] Anderson, W. F. *Nature* **1998**, 392, 25.
- [2] Huang, J. Z.; Gu, H. G.; Xia, H. S. *Chin. J. Bases Chin. General Surg.* **2003**, 10, 83. (黄建钊, 顾红光, 夏慧生, 中国普外基础与临床杂志, **2003**, 10, 83.)
- [3] Cui, L.; Li, Y.; Hou, X. D.; Gong, W. J.; Xu, Y. H.; Cao, A. M. *Acta Chim. Sinica* **2007**, 65, 2181. (崔亮, 李洋, 侯小东, 宫文娟, 徐宇虹, 曹阿民, 化学学报, **2007**, 65, 2181.)
- [4] (a) Matthew, G. S.; Steven, L. C. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 7887; (b) Wang, J.; Lu Z.; Wientjes, M. G.; Au, J. L. *AAPS J.* **2010**, 12, 492.
- [5] (a) Grosse, S.; Aron, Y.; Thévenot, G.; François, D.; Monsigny, M.; Fajac, I. *J. Gene Med.* **2005**, 7, 1275; (b) Bishop, N. E. *Rev. Med. Virol.* **1997**, 7, 199; (c) Pelkmans, L.; Helenius, A. *Traffic* **2002**, 3, 311; (d) Conner, S. D.; Schmid, S. L. *Nature* **2003**, 422, 37; (e) Han-

- Hansen, C. G.; Nichols, B. J. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 1713.
- [6] Midoux, P.; Breuzard, G.; Gomez, J. P.; Pichon, C. P. *Curr. Gene Ther.* **2008**, *8*, 335.
- [7] (a) Pack, D. W. *J. Controlled Release* **2009**, *136*, 54; (b) Rejman, J.; Bragonzi, A.; Conese, M. *Mol. Ther.* **2005**, *12*, 468; (c) van der Aa, M. A.; Huth, U. S.; Häfele, S. Y.; Schubert, R.; Oosting, R. S.; Mastrobattista, E.; Hennink, W. E.; Peschka-Süss, R.; Koning, G. A.; Crommelin, D. J. *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 1590.
- [8] Ganta, S.; Devalapally, H.; Shahiwala, A.; Amiji, M. J. *Controlled Release* **2008**, *126*, 187.
- [9] Kirpotin, D.; Hong, K.; Mullah, N.; Papahadjopoulos, D.; Zalipsky, S. *FEBS Lett.* **1996**, *388*, 115.
- [10] Guo, X.; Szoka, F. C. *Jr. Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 335.
- [11] Dewhirst, M. W.; Vujaskovic, Z.; Jones, E.; Thrall, D. *Int. J. Hyperthermia* **2005**, *21*, 779.
- [12] Kono, K.; Yoshino, K.; Takagishi, T. *J. Controlled Release* **2002**, *80*, 321.
- [13] (a) Engin, K.; Leeper, D. B.; Cater, J. R. Thistlethwaite, A. J.; Tupchong, L.; Thistlethwaite, A. J.; Tupchong, L.; McFarlane, J. D. *Int. J. Hyperthermia* **1995**, *11*, 211; (b) Mellman, I.; Fuchs, R.; Helenius, A. *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, *55*, 663.
- [14] Zhang, X. X.; McIntosh, T. J.; Grinstaff, M. W. *Biochimie* **2012**, *94*, 42.
- [15] Schmid, S. L. *Subcell. Biochem.* **1993**, *19*, 1.
- [16] Yatvin, M. B.; Kreutz, W.; Horwitz, B. A.; Shinitzky, M. *Science* **1980**, *210*, 1253.
- [17] Chu, C. J.; Szoka, F. C. *J. Liposome Res.* **1994**, *4*, 361.
- [18] (a) Legendre, J. Y.; Szoka, F. C. *Pharm. Res.* **1992**, *9*, 1235; (b) Hafez, I. M.; Cullis, P. R. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2000**, *1463*, 107.
- [19] Drummond, D. C.; Meyer, O.; Hong, K.; Kirpotin, D. B.; Papahadjopoulos, D. *Pharm. Res.* **1999**, *51*, 691.
- [20] Júnior, A. D.; Mota, L. G.; Nunan, E. A.; Wainstein, A. J.; Wainstein, A. P.; Leal, A. S.; Cardoso, V. N.; De Oliveira, M. C. *Life Sci.* **2007**, *80*, 659.
- [21] Silva, S. M. L.; Coelho, L. N.; Malachias, Â.; Oliveira, M. C. *Chem. Phys. Lett.* **2011**, *6*, 66.
- [22] Cordes, E. H.; Bull, H. G. *Chem. Rev.* **1974**, *74*, 581.
- [23] Boomer, J. A.; Thompson, D. H.; Sullivan, S. M. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 1292.
- [24] Boomer, J. A.; Qualls, M. M.; Inerowicz, H. D.; Haynes, R. H.; Patri, V. S.; Kim, J. M.; Thompson, D. H. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 47.
- [25] Song, J.; Hollingsworth, R. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1851.
- [26] Zhu, J.; Munn, R. J.; Nantz, M. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2645.
- [27] Chen, H. G.; Zhang, H. Z.; McCallum, C. M.; Szoka, F. C.; Guo, X. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4269.
- [28] Chen, H. G.; Zhang, H. Z.; Thor, D.; Rahimian, R.; Guo, X. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *52*, 159.
- [29] Aissaoui, A.; Martin, B.; Kan, E.; Oudrhiri, N.; Hauchecorne, M.; Vigneron, J. P.; Lehn, J. M.; Lehn, P. J. *Med. Chem.* **2004**, *47*, 5210.
- [30] Liang, E.; Hughes, J. A. *J. Membr. Biol.* **1998**, *166*, 37.
- [31] Liang, E.; Hughes, J. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1998**, *1369*, 39.
- [32] Asokan, A.; Cho, M. J. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 903.
- [33] Budker, V.; Gurevich, V.; Hagstrom, J. E.; Bortzov, F.; Wolff, J. A. *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 760.
- [34] (a) Kumar, V. V.; Pichon, C.; Refregiers, M.; Guerin, B.; Midoux, P.; Chaudhuri, A. *Gene Ther.* **2003**, *10*, 1206; (b) Singh, R. S.; Gonçalves, C.; Sandrin, P.; Pichon, C.; Midoux, P.; Chaudhuri, A. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 713; (c) Karmali, P. P.; Kumar, V. V.; Chaudhuri, A. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2123; (d) Karmali, P. P.; Majeti, B. K.; Sreedhar, B.; Chaudhuri, A. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 159.
- [35] Mével, M.; Neveu, C.; Gonçalves, C.; Yaouanc, J. J.; Pichon, C.; Jaffrès, P. A.; Midoux, P. *Chem. Commun.* **2008**, (27), 3124.
- [36] (a) Thomas, M.; Klivanov, A. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 14640; (b) Akinc, A.; Thomas, M.; Klivanov, A. M.; Langer, R. J. *Gene Med.* **2005**, *7*, 657; (c) Sonawane, N. D.; Szoka, F. C. Jr.; Verkman, A. S. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 44826.
- [37] Won, Y. Y.; Sharma, R.; Konieczny, S. F. *J. Controlled Release* **2009**, *139*, 88.
- [38] Yue, Y. N.; Wu, C. *Biomater. Sci.* **2013**, *1*, 152.
- [39] Park, I. K.; Singha, K.; Arote, R. B.; Choi, Y. J.; Kim, W. J.; Cho, C. S. *Macromol. Rapid Commun.* **2010**, *31*, 1122.
- [40] Walker, G. F.; Fella, C.; Pelisek, J.; Fahrmeir, J.; Boeckle, S.; Ogris, M.; Wagner, E. *Mol. Ther.* **2005**, *11*, 418.
- [41] Fella, C.; Walker, G. F.; Ogris, M.; Wagner, E. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2008**, *34*, 309.
- [42] Knorr, V.; Allmendinger, L.; Walker, G. F.; Paintner, F. F.; Wagner, E. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1218.
- [43] Knorr, V.; Russ, V.; Allmendinger, L.; Ogris, M.; Wagner, E. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1625.
- [44] Lin, Y. L.; Jiang, G. H.; Birrell, K. L.; El-Sayed, M. E. H. *Biomaterials* **2010**, *31*, 7150.
- [45] (a) Shim, M. S.; Kwon, Y. J. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 488; (b) Shim, M. S.; Kwon, Y. J. *Biomaterials* **2011**, *32*, 4009.
- [46] Midoux, P.; Monsigny, M. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 406.
- [47] Boylan, N. J.; Kim, A. J.; Suk, J. S.; Adstamongkonkul, P. *Biomaterials* **2012**, *33*, 2361.
- [48] (a) Bennis, J. M.; Choi, J. S.; Mahato, R. I.; Park, J. S.; Kim, S. W. *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 637; (b) Asayama, S.; Hamaya, A.; Sekine, T.; Kawakami, H.; Nagaoka, S. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2004**, *48*, 229.
- [49] (a) Asayama, S.; Kato, H.; Kawakami, H.; Nagaoka, S. *Adv. Technol.* **2007**, *18*, 329; (b) Asayama, S.; Sudo, M.; Nagaoka, S.; Kawakami, H. *Mol. Pharm.* **2008**, *5*, 898.
- [50] Wang, X. L.; Jensen, R.; Lu, Z. R. *J. Controlled Release* **2007**, *31*, 250.
- [51] Sasaki, K.; Kogure, K.; Chaki, S.; Nakamura, Y.; Moriguchi, R.; Hamada, H.; Danev, R.; Nagayama, K.; Futaki, S.; Harashima, H. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 2717.
- [52] Hatakeyama, H.; Ito, E.; Akita, H.; Oishi, M.; Nagasaki, Y.; Futaki, S.; Harashima, H. *J. Controlled Release* **2009**, *139*, 127.
- [53] Khalil, I. A.; Hayashi, Y.; Mizuno, R.; Harashima, H. *J. Controlled Release* **2011**, *156*, 374.
- [54] Shaheen, S. M.; Akita, H.; Nakamura, T.; Takayama, S.; Futaki, S.; Yamashita, A.; Katoono, R.; Yui, N.; Harashima, H. *Biomaterials* **2011**, *32*, 6342.
- [55] Choi, S. W.; Lee, S. H.; Mok, H.; Park, T. G. *Biotechnol. Prog.* **2010**, *26*, 57.
- [56] Yuba, E.; Kojima, C.; Sakaguchi, N.; Harada, A.; Koiwai, K.; Kono, K. *J. Controlled Release* **2008**, *130*, 77.
- [57] Felber, A. E.; Bastien, C.; Elsbahy, M.; Delevey, G. F.; Damha, M. J.; Leroux, J. C. *J. Controlled Release* **2011**, *152*, 159.
- [58] Dehousse, V.; Garbacki, N.; Colige, A.; Evrard, B. *Biomaterials* **2010**, *31*, 1839.
- [59] Nouri, A.; Castro, R.; Kairys, V.; Santos, J. L.; Rodrigues, J.; Li, Y.; Tomás, H. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2012**, *23*, 2967.
- [60] Convertine, A. J.; Benoit, D. S. W.; Duvall, C. L.; Hoffman, A. S.; Stayton, P. S. *J. Controlled Release* **2009**, *133*, 221.
- [61] Stayton, P. S.; El-Sayed, M. E.; Murthy, N.; Bulmus, V.; Lackey, C.; Cheung, C.; Hoffman, A. S. *Orthod. Craniofac. Res.* **2005**, *8*, 219.
- [62] Thomas, J. L.; Barton, S. W.; Tirrell, D. A. *Biophys. J.* **1994**, *67*, 1101.
- [63] Du, J.; Tang, Y.; Lewis, A. L.; Armes, S. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17982.
- [64] Lomas, H.; Du, J. Z.; Canton, I.; Madsen, J.; Warren, N.; Armes, S. P.; Lewis, A. L.; Battaglia, G. *Macromol. Biosci.* **2010**, *10*, 513.
- [65] Mignet, N.; Richard, C.; Seguin, J.; Largeau, C.; Bessodes, M.; Scherman, D. *Int. J. Pharm.* **2008**, *361*, 194.
- [66] Kim, Y. K.; Jiang, H. L.; Choi, Y. J.; Park, I. K.; Cho, M. H.; Cho, C. S. *Adv. Polym. Sci.* **2011**, *243*, 1.
- [67] Chang, K. L.; Higuchi, Y.; Kawakami, S.; Yamashita, F.; Hashida, M. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1087.
- [68] Ghosh, B.; Singh, A.; Li, M.; Vlassov, A. V.; Burnett, C.; Puri, N.; Roy, K. *Oligonucleotides* **2010**, *20*, 163.
- [69] Gao, J. Q.; Zhao, Q. Q.; Lv, T. F.; Shuai, W. P.; Zhou, J.; Tang, G. P.; Liang, W. Q.; Tabata, Y.; Hu, Y. L. *Int. J. Pharm.* **2010**, *387*, 286.
- [70] Jere, D.; Jiang, H. L.; Kim, Y. K.; Arote, R.; Choi, Y. J.; Yun, C. H.; Cho, M. H.; Cho, C. S. *Int. J. Pharm.* **2009**, *378*, 194.

(Zhao, X.)