

[文章编号] 1007-385X(2004)04-

阳离子聚合物载体在肿瘤基因治疗中的应用

郭妍^{1,2}, 徐宇虹^{1,2}, 顾健人²(1. 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200030; 2. 上海交通大学肿瘤研究所, 上海 200032)

* 基因治疗是一种对各种与基因相关、威胁到人类生命的疾病有重要潜在治疗作用的一种新的治疗方法^[1]。基因治疗在四十多年的发展道路上虽然取得了许多惊人的成就,但也遇到了很多困难。目前无论是在国际上还是在国内,基因治疗要真正进入临床应用,还有一些根本问题没有彻底解决,其中非常突出的是安全、高效及可控的基因载体的构建^[2]。

目前基因治疗领域主要有三种不同的基因输送体系:物理转染技术体系、病毒载体系统以及非病毒载体系统^[3]。物理转染技术,如电穿孔和粒子轰击技术等,它们的使用一般局限于体表组织,并有一定的损伤,裸DNA注射的转染效率相对较低。病毒载体,包括反转录病毒,腺病毒和腺相关病毒等已经在体外试验中显示了较高的转导效率^[4],但由于病毒载体大多需要保留野生病毒的外壳和感染机制,没有靶向性,而且在安全性和可控性方面存在某些隐患,如对载体外壳的免疫反应,基因随机整合的致癌性和潜在内源病毒的重组等^[5]。对于肿瘤基因治疗而言,病毒载体缺乏针对肿瘤组织的作用机制,所以目前几乎所有的应用病毒载体治疗肿瘤的方案,都需要进行直接的瘤内或者瘤周注射,主要针对一些身体浅表可及的肿瘤,如皮肤癌、头颈部肿瘤等。

非病毒载体主要依靠带正电的聚合物(如阳离子聚合物、带正电荷的脂质体等)将DNA包装成一定大小的DNA复合物进行输送^[6-7]。和病毒载体相比,利用非病毒载体进行DNA输送有许多优点:对受转移的DNA大小和数目没有限制;制备相对简单;免疫源性问题较小以及安全性较高等。更重要的是在非病毒载体中可以根据具体应用设计相应的靶向作用机制,有效地降低毒副作用,提高作用效力。

但对于阳离子脂质体载体,虽然有大量研究表明它们在体外细胞试验中的转染效率很高,但是脂质体DNA复合物的结构非常复杂,在体液中不够稳定,在体内复杂环境中转染效率不能稳定,因而在体内应用中成功的例子不多。

而对于阳离子高聚合物载体,研究发现有一系列的阳离子聚合物能够将DNA包装成一定大小的DNA

复合物并帮助基因转染,如 polylysine(PLL), polyethylenimine(PEI), PMAM dendrimer 等都已经是在体外细胞转染中广泛应用^[8-11]。同时,由于这些聚合物可以被方便地修饰上一些功能分子,如靶向分子等,研究者希望在体内可以通过受体靶向以及受体介导内吞的方式将DNA带到体内特定的靶组织和靶细胞中,因此这些聚合物得到了极大地重视。但在实际体内试验中,阳离子聚合物的DNA复合物同样存在着在体液中不稳定,容易被清除和降解,以及转染效率较低等问题^[12]。所以要从根本上改善体内基因输送的效率,我们认为,必须深入理解阳离子高聚物载体的构建、输送中的一系列关键问题,制定相应的对策,并进行严格的质量控制和检验,才有可能真正实现阳离子高聚物载体在体内基因治疗中的应用。

下面,我们将对其中主要的一些关键问题做具体的论述:

1 非病毒阳离子聚合物载体的结构与表征

在非病毒阳离子聚合物载体的制备过程中,得到均一、水溶性好和稳定的DNA复合物粒子至关重要。DNA复合物的大小、形貌和表面的电荷等特性决定了复合物与体液、细胞间质以及靶细胞间的相互作用。特别是对于具有靶向作用设计的载体,这一系列性质将直接影响基因在体内的分布和转染效率。所以,在阳离子高聚物载体的构建中,必须严格优化和控制阳离子聚合物的结构及组成、DNA和阳离子聚合物之间的价态比,以及DNA和阳离子聚合物结合的条件等。

但是,虽然有关阳离子聚合物和DNA相互作用形成DNA复合物的过程以及复合物的物化性质的研究受到了很大的重视,也有不少报道^[13-14],但是目前常用

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863计划)项目(E220-01-01)

[作者简介] 郭妍(1977-),女,福建宁德人,博士,主要从事基因治疗非病毒载体构建和表征

[通讯作者] 徐宇虹(1968-),女,浙江桐乡人,教授,主要从事药物以及基因治疗研究, Email: yhxu@sjtu.edu.cn
顾健人(1932-),男,江苏苏州人,研究员,主要从事肿瘤基因组研究和基因治疗研究

的阳离子聚合物作为基因载体的一个很大的局限性在于聚合物分子的大小和价态的非均一性,直接导致了制备的载体组成和结构的不同。特别是一系列的靶向输送载体,靶向分子的连接以及在 DNA 复合物上的分布状态十分复杂,需要建立严格的分析和表征方法,才有可能对 DNA 载体的形成有一定的控制和确定。阳离子高聚物及其被靶向分子等修饰后的产物,一般通过透析、凝胶分离、离子交换色谱等方法来纯化。但要准确表征高聚物分子的分子量分布,特别是与靶向分子连接反应的状态,常用的很多分析方法包括凝胶电泳、高效液相、质谱等都很难以实现,急需发展新的分离分析技术、确立产物的质量标准,才有可能有效地控制下一步载体制备的条件,优化载体的配方和使用方法。

而对于阳离子高聚物/DNA 复合物形成后的一系列物理化学性质的表征,已有很多的研究报道。常用分析手段包括琼脂糖凝胶电泳(反映 DNA 结合价态和大小)、CD 光谱法(DNA 结构)、DNase 酶切(DNA 结合价态)、光子相关光度法(粒径和粒径分布)、电子显微镜(形貌和大小)、和分析离心技术(粒子大小和分布)等等。但必须指出的是,这一系列表征技术都不足以全面反映 DNA 复合物粒子的特点,特别是体内转染的特征,所以只有发展新的技术,并将多种技术联合起来使用才能正确表征阳离子高聚物/DNA 复合物。

2 体内输送的稳定性问题

基因治疗中很多载体的输送机理,往往只在体外的细胞模型中表现得比较明确,而体内环境错综复杂,载体必须经过体内的各种组织环境,长距离运输,受到各种各样因素的干扰,才有很小的几率接近目标细胞。所以前期的一些研究都指出了在推动体内基因治疗技术进入临床应用的过程中,现有的非病毒载体系统存在的稳定性和可控性等问题至为重要,特别是在系统导入的载体系统中载体粒子与血浆蛋白、各类细胞、细胞间质等的非特异性作用,粒子相互之间的聚集以及被网状内皮细胞系统(RES)清除等存在的问题。它将大大影响载体在体内的输送和分布,并对载体的结构以及转染活性造成很大的破坏,使治疗效果不能保证。

对于肿瘤基因治疗,尤其希望能够制备在血液中稳定,能够长时间循环的载体,才有可能直接将基因药物通过静脉注射,靶向作用于肿瘤细胞。这是确保肿瘤基因治疗疗效的前提。

研究表明聚阳离子载体经表面修饰亲水性聚合物(poly(ethylene glycol)、dextran、poly(pHPMA))等后,载体表面由于亲水性聚合物的立体效应,能减少载体在

体液、血液等体内环境下自身的聚集,减少和血清中蛋白的非特异性作用,而不影响载体和靶向细胞的相互作用^[15]。其中 PEG 表面修饰的作用在现已上市的一些蛋白和脂质体制剂中发挥了极为重要的作用。常用的亲水性聚合物为聚乙二醇(PEG),一般为一端甲基化的线状结构,只有一个活性位点,限制了相互之间的交联和聚合。阳离子聚合物与亲水性聚合物之间的连接方式可以通过化学反应,也可以通过配体和受体之间的相互作用进行连接,如通过 streptavidin 和 biotin 之间的亲和作用。而在靶向型非病毒载体中,有时靶向分子和 PEG 分子同时连接在阳离子聚合物的骨架上,有时靶向分子是连接在 PEG 链的远端,因为一些研究者担心 PEG 链会干扰靶向分子的靶向作用,靶向分子的信号呈现可能会被亲水性聚合物遮蔽^[16]。更有一些研究直接用 PEG 分子修饰已经形成的高聚物/DNA 复合物,从而保证 PEG 分子分布在复合物粒子的表面。

不同立体结构的 PEG 与阳离子聚合物连接的产物,对其后制备的 DNA 复合物的形貌与大小、毒性和基因转移效率等理化、生物学特性有很大的影响^[17]。PEG 的分子量大小对 DNA 复合物的形成, DNA 包装的状态,以及体内循环半衰期和转染效率等也有重要的影响,应受到极大的重视^[18]。

3 体内靶向性问题

非病毒 DNA 载体的最大优势在于可能涉及特定的机制,靶向性地将基因导入体内特定细胞。这一点,对于肿瘤的基因治疗,特别是针对转移灶和微转移灶的治疗,具有十分重要的意义。要实现这一目标,需要在载体上修饰靶向分子,通过它们与靶分子的特异性相互作用,使载体在靶组织和细胞表面复集,从而提高基因药物的转染效率并减少毒性^[19]。目前常见的靶向分子有 folate、galactose 等小分子配体, EGF、transferrin 等蛋白,各种特异性抗体,以及一系列的特异性合成多肽等。将靶向分子直接或间接连接在聚阳离子/DNA 复合物上,在细胞试验中,可以明确地通过靶向分子的特异性结合和受体介导的内吞作用,使转染效率得到极大地提高^[20]。

但是,在体内的复杂环境下,靶向作用并不单纯取决于靶向分子与靶细胞间的相互作用,载体复合物粒子的大小、表面电荷,以及靶向分子在表面的形态等,都将极大地影响载体在体内的循环和分布,从而决定最终到达靶组织的载体数量和转染效率。所以,对于靶向载体的表征和质量控制,必须同时考量其特异性作用和非特异性作用两方面的特性。特异性结合能力

可以通过体外的结合试验进行表征,如表面等离子共振,亲和电泳等,特别需要确定的是靶向分子在载体粒子表面装配后结合能力的变化。而非特异性作用则必须根据不同应用中可能遭遇的体内微环境进行具体的表征,如血清蛋白的结合,补给系统的干扰,免疫细胞的作用,毛细血管结构的影响,以及细胞外间质骨架分子的作用等等,都将影响载体粒子最终到达靶细胞效率和结构,从而影响转染效率。但需要指出的是,这一系列问题虽然在以前的很多研究中已经被认识到,但却因为缺乏确定的研究系统和方法进行系统的表征,所以至今依然是靶向载体系统在体内应用的最大障碍之一。

4 体内细胞的转染(溶酶体释放和细胞核摄取)

在细胞转染过程中,即使载体粒子能被细胞内吞,但是基因表达的效率还是很低,主要是因为载体粒子通过内吞作用进入内吞小体中,如果不能及时从中释出,便会进一步与溶酶体溶合,被彻底降解。所以在载体设计中,必须包含帮助 DNA 分子从内吞体释放出来的机制,以免这一步成为体内基因导入的又一个瓶颈问题。

一些细胞试验中常用的方法,如加入氯喹等内吞体溶酶体的缓冲剂,加入甘油等弱化内吞体膜结构的材料,以及与病毒形成复合物混用使用等,只适合在体外培养细胞中作用,而且效果欠佳^[21]。在体内试验中,人们研制了一系列具有一定破膜作用的多肽^[22],包括基于一些野生病毒膜蛋白结构的 INF7, HA20, Mellitin 等,和一些人工设计的两性多肽 GALA, KALA 等,通过共价键结合或者简单物理方法包装在阳离子多聚物载体中,待载体粒子进入内吞体中后,发挥其破膜作用,帮助 DNA 分子逃离溶酶体。必须指出的是,这一类多肽在载体粒子中的结合和包装的状态,同样也将影响它们在体内细胞外循环的稳定性,以及一旦进入内吞体中表现的破膜能力,因此,对于载体中破膜肽结构和功能的表征和质量控制,也是非常重要的。目前最常用的方法,是将多肽以及包装有多肽的载体与红细胞混合,通过在不同 pH 下的溶血试验,来表征破膜能力,这一方法对于体外细胞转染能力,具有一定的预测性,但对于体内基因导入,其准确性和有效性,还需要进一步提高。

对于某些结构的阳离子多聚物,比较突出的如 PEI 和 PMAM dendrimer 等,研究表明它们本身就具有在较低 pH 下缓冲以及破膜的机制,如 PEI 的所谓“质子海绵”效应,dendrimer 的所谓“渗透膨胀”效应。所以并不需要其它外加的破膜作用成分,使载体构建相

对简单。但从另一侧面而言,由于这些高聚物本身较高的活性,它们在体内循环分布过程中的毒性问题也不可忽视。

而当 DNA 分子脱离了内吞体进入细胞质后,一些研究者认为它们已经脱离了阳离子高聚物的保护,很容易被细胞质中的 DNA 酶所降解,必须具有迅速进入细胞核的机制。表现在细胞转染中,研究发现,转染效率对细胞分裂周期具有很大的依赖性。另外有些研究者认为,脱离了内吞体的 DNA 分子依然是以与阳离子多聚物复合的状态存在,复合粒子在细胞质中转运,再进入细胞核以后,才在染色体蛋白的干扰作用下逐渐解离,所以在载体中添加带有核定位信号的多肽,也能进一步提高转染的效率。当然,有关核定位信号在载体中组装结构和功能的表征和质量控制,又一次地对载体粒子的设计和制备,提出了进一步的挑战。

综上所述,在阳离子多聚物载体系统中,需要将各种关键问题的相应解决方案综合在载体的设计和结构中,如将亲水性聚合物、靶向分子、内吞小膜释放因子、核定位信号合理地、可控地连接到阳离子多聚物骨架上,形成多元的载体系统,才有可能有效地提高体内基因输送和转染的效率。近年来,这方面的研究受到了极大的重视,也取得了一定的成果^[15,40-44]。但目前主要的应用试验还是集中在体外细胞转染和病灶直接注射等方案上,而我们希望通过载体系统的深入研究和优化,最终能够实现将基因通过系统给药的方式导入人体,通过正常的体内循环靶向靶组织和细胞^[45-46]。这一理想,将对基因治疗的临床应用,特别是在恶性肿瘤治疗中的应用,将有十分重要的意义。

[参考文献]

- [1] Kinnon C, Levinsky RJ. Somatic gene therapy for genetic disease [J]. Arch Dis Child, 1990, 65(1): 72-73.
- [2] Anderson WF, Human gene therapy [J]. Nature, 1998, 392(6679 Suppl): 25-30.
- [3] Wagner E, Ogris M, ZW. Polylysine-based transfection systems utilizing receptor-mediated delivery [J]. Adv Drug Deliv Rev, 1998, 30(1-3): 97-113.
- [4] Rosenfeld MA, Siegfried W, Yoshimura K, et al. Adenovirus-mediated transfer of a recombinant alpha 1-antitrypsin gene to the lung epithelium *in vivo*. [J]. Science, 1991, 252(5004): 431-434.
- [5] Temin HM. Safety considerations in somatic gene therapy of human disease with retrovirus vectors [J]. Hum Gene Ther, 1990, 1(2): 111-123.
- [6] Pouton CW, Lucas BJ, Thomas, et al. Polycation-DNA complexes for gene delivery: A comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids [J]. J Control Release, 1998, 53(1-3): 289-299.
- [7] Gao X, Huang L. Cationic liposome-mediated gene transfer [J]. Gene Ther, 1995, 2(10): 710-722.
- [8] Fritz JD, Herweijer H, Zhang G, et al. Gene transfer into mammalian cells using histone-condensed plasmid DNA [J]. Hum

- Gene Ther, 1996, 7(12): 1395-1404.
- [9] Sadler K, Tam JP. Peptide dendrimers: applications and synthesis [J]. J Biotechnol, 2002, 90(3-4): 195-229.
- [10] Kircheis R, Blessing T, Brunner S, *et al.* Tumor targeting with surface-shielded ligand-polycation DNA complexes[J]. J Control Release, 2001, 72(1-3): 165-170.
- [11] 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 U S A, 1995, 92(16): 7297-7301.
- [12] Pouton CW, Seymour LW. Key issues in non-viral gene delivery [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 46(1-3): 187-203.
- [13] Reschel T, Konak C, Oupicky D, *et al.* Physical properties and *in vitro* transfection efficiency of gene delivery vectors based on complexes of DNA with synthetic polycations. J Control Release, 2002, 81(1-2): 201-217.
- [14] Wolfert MA, Seymour LW. Atomic force microscopic analysis of the influence of the molecular weight of poly(L)lysine on the size of polyelectrolyte complexes formed with DNA [J]. Gene Ther, 1996, 3(3): 269-273.
- [15] Ward CM, Pechar M, Oupicky D, *et al.* Modification of pLL/DNA complexes with a multivalent hydrophilic polymer permits folate-mediated targeting *in vitro* and prolonged plasma circulation *in vivo*. J Gene Med, 2002, 4(5): 536-547.
- [16] Blessing T, Kursam M, Holzhauser R, *et al.* Different strategies for formation of pegylated EGF-conjugated PEL/DNA complexes for targeted gene delivery[J]. Bioconj Chem, 2001, 12(4): 529-537.
- [17] Mannisto M, Vanderkerken S, Toncheva V, *et al.* Structure-activity relationships of poly(L-lysines): Effects of pegylation and molecular shape on physicochemical and biological properties in gene delivery[J]. J Control Release, 2002, 83(1): 169-182.
- [18] Photos PJ, Bacakova L, Discher B, *et al.* Polymer vesicles *in vivo*: correlations with PEG molecular weight[J]. J Control Release, 2003, 90(3): 323-334.
- [19] Peng KW. Strategies for targeting therapeutic gene delivery[J]. Mol Med Today, 1999, 5(10): 448-453.
- [20] Tian P, Ren S, Ren C, *et al.* A novel receptor-targeted gene delivery system for cancer gene therapy[J]. Sci China Ser C Life Sci, 1999, 42(2): 216-224.
- [21] Ciftci K, Levy J. Enhanced plasmid DNA transfection with lysosomotropic agents in cultured fibroblasts[J]. Int J Pharm, 2001, 218(1-2): 81-92.
- [22] Wagner E. Effects of membrane-active agents in gene delivery[J]. J Control Release, 1998, 53(1-3): 155-158.
- [23] Sagara K, Kim SW. A new synthesis of galactose-poly(ethylene glycol)-polyethylenimine for gene delivery to hepatocytes[J]. J Control Release, 2002, 79(1-3): 271-281.

[收稿日期] 2003 - 09 - 10

[修回日期] 2004 - 10 - 10