

交联型聚乙烯亚胺智能基因载体的制备及 PEG 化影响^{*}

陈 磊¹ 田华雨¹ 陈学思^{1**} 朴泰宽² 丸山厚³ 景遐斌¹

(¹中国科学院长春应用化学研究所 高分子物理与化学国家重点实验室 长春 130022)

(²韩国科学技术院生物科学系 大田 305-701) (³日本九州大学材料化学与工程学院 福岡 812-8581)

摘 要 使用脘胺双丙烯酰胺(CBA)对低分子量聚乙烯亚胺(PEI)进行交联反应制备智能降解型聚阳离子基因载体.通过与聚乙二醇(PEG)反应得到不同程度 PEG 化的聚阳离子载体.利用核磁、黏度测试、粒度仪、zeta 电位仪和凝胶电泳对聚阳离子载体及其与 DNA 的复合物进行了表征.研究表明随着 PEG 含量的增加,聚阳离子载体/DNA 复合物颗粒粒径变小、表面正电荷降低,PEG 具有明显的屏蔽作用,但过多的 PEG 也使载体与 DNA 复合能力下降.通过 MTT 细胞毒性测试和荧光素酶质粒转染实验得出,含二硫键的交联型阳离子聚合物在测试范围内显示了非常低的细胞毒性,最佳转染效率是 PEI25k 的 4 倍,PEG 化后其细胞毒性得到进一步改善,转染效率却明显降低.

关键词 基因传递, 聚乙烯亚胺, 二硫键, 生物降解, PEG 化

随着近代生物技术的发展与人类基因库的不断完善,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^[1,2].在具体实施中,如何获取安全有效的基因载体日益成为制约基因治疗临床应用的瓶颈问题.人工合成的阳离子聚合物由于其无免疫源性,分子设计多样,尺寸可控并能够连接靶向物质逐渐成为该领域的研究热点.在众多已经报道的聚阳离子载体中,聚乙烯亚胺(PEI)由于其独特的“质子海绵效应”而倍受关注,一系列机理研究表明 PEI 能够帮助 DNA 复合物成功从细胞内涵体逃逸,从而实现高效的基因传递^[3,4].

但是,常用的 PEI 载体分子量约在 2.5×10^4 左右,存在体内无法降解,细胞毒性大等明显的缺点.在最近的研究报道中发现^[5-8],可以通过使用各种不同的交联剂将小分子量的 PEI 进行选择性交联得到阳离子聚合物,实验结果显示,交联型 PEI 体内可降解,保持了小分子量 PEI 的低细胞毒性,同时获得了与 PEI25k 相似的高转染效率.研究表明二硫键可以在生物体内循环中保持稳定,而在细胞内由于大量还原型谷胱甘肽的存在,二硫键又能够被较易的还原断开成为巯基.因为这一特殊性质,含二硫键的交联型聚阳离子载体呈现出一种智能型控制释放特点,具有极大的研

究价值^[9-11].

阳离子基因载体在具体的应用中,由于其与 DNA 形成的复合物颗粒表面呈现较强的正电性,所以在体内循环中容易结合各种负电性的生物大分子如血清蛋白等,出现凝聚而被清除不能实现体内有效传递.聚乙二醇(PEG)因为其优异的抑制非特异性吸附能力和良好生物相容性,在已有的报道中经常被应用于阳离子基因载体的修饰^[12-15].各种研究表明经 PEG 修饰后的 PEI/DNA 复合物能避免自身凝聚,降低颗粒大小,有效拮抗血清对转染的抑制,降低红细胞的聚集.PEG 化可以屏蔽复合物颗粒表面的正电荷,增加其在体内高盐环境中的稳定性,降低细胞毒性.在转染效率方面,不同结构与含量的 PEG 影响不一.通过接枝 PEG 来修饰 PEI 类基因载体的已有报道中^[16-18],研究全部集中如 PEI25k 等大分子量阳离子载体中,对于目前全新的可降解交联型 PEI 载体,PEG 化所带来的影响尚未见报道.本文先合成了一种新型高效的交联型 PEI 载体,然后研究了不同 PEG 化程度对其理化性能和生物性能的影响.

1 实验部分

1.1 实验原料

超支化聚乙烯亚胺(PEI25k)(Sigma, $M_w = 2.5$

^{*} 可生物降解高分子专题报道;2009-01-13 收稿,2009-03-02 修稿;国家自然科学基金-亚洲三国前瞻项目(项目号 20621140369)、国家自然科学基金(基金号 20604028, 50873102, 50733003)和科技部国际合作重点项目(项目号 20071314)资助; ** 通讯联系人, E-mail: xschen@ciac.jl.cn

$\times 10^4$);超支化聚乙烯亚胺(PEI1800)(Alfa, $M_w = 1800$);脘胺双丙烯酰胺(CBA)(Alfa, 98%);单甲氧基聚乙二醇琥珀酰亚胺丙酸酯(mPEG-SPA)(shearwater, $M_n = 5000$);鲑鱼精 DNA(Stratagene);荧光素酶质粒 T、细胞裂解液、荧光素酶检测试剂盒(Promega);噻唑蓝(MTT)(Sigma);BCA(二喹啉甲酸)法蛋白浓度检测试剂盒(Pierce);透析袋(MWCO 3500;7000, 上海绿鸟);氯仿、甲醇、正己烷等溶剂为分析纯直接使用。

1.2 交联型聚阳离子 CBA-PEI 的合成

称取分子量为 1800 的超支化聚乙烯亚胺(PEI)3 g(1.67 mmol)置于干燥的反应安瓶中,加入 16 mL 氯仿溶解;另称取脘胺双丙烯酰胺(CBA)0.43 g(1.67 mmol)溶解于 14 mL 甲醇/氯仿(体积比 1:1)的混合溶剂中,将 CBA 溶液加入 PEI 的反应安瓶中混合均匀,密封后升温至 45℃搅拌反应 4 天.反应完毕后,反应液加入到 500 mL 正己烷中沉降,将沉降后的白色混浊液置于 0℃冷冻 24 h,倾去透明上清液,真空干燥 10 h 后加入去离子水溶解,在截留分子量为 3500 的透析袋中透析 2 天,冷冻干燥得到白色粘胶状产物 2.96 g,收率为 86%。

1.3 CBA-PEI 的 PEG 化

将 CBA-PEI 50 mg 溶于 5 mL 去离子水中,称取加入相应质量比的 mPEG-琥珀酰亚胺丙酸酯(mPEG-SPA),室温下搅拌反应 2 h,在截留分子量为 7000 的透析袋中透析 2 天,冷冻干燥得白色固体产物,其中以 CBA-PEI-P-2 为例收率为 90%。

1.4 测试方法

核磁共振氢谱在 Bruker AV400 NMR 核磁共振仪上测量,溶剂为 D_2O ,以四甲基硅烷为内标;CBA-PEI 的黏均分子量参照文献方法[19],使用乌式黏度计在 25℃恒温水浴中测量,黏度计内径为 0.3~0.4 mm,溶剂为 0.5 mol/L 硝酸钠溶液。

1.5 复合物的粒径与表面电位表征

复合物根据不同的阳离子聚合物/DNA 比例混合制备,涡旋后孵育 30 min,粒径大小与表面电荷通过采用纳米粒度电位仪(zeta plus, Brookhaven 公司,美国)进行测定.本项实验中以鲑鱼精 DNA 为模型 DNA(Stratagene)。

1.6 凝胶阻滞电泳

将质粒 DNA(pDNA, pEGFP-N1)稀释到 0.1 mg/mL,加入等体积一定浓度的聚合物溶液一起涡旋.孵育 10 min 后,用 1%的琼脂糖电泳分析。

1.7 细胞毒性测试

材料的细胞毒性采用 MTT 方法评价. CHO 细胞接种于 96 孔细胞培养板, DMEM 培养液中含 10% FBS, 100 units/mL 青霉素, 100 μ g/mL 链霉素, 在 37℃, 5% CO_2 孵箱中培养 24 h. 配制不同浓度的阳离子聚合物的 PBS 溶液. 然后在每孔中加入 100 μ L 的聚合物溶液, 继续培养 24 h 后, 每孔加入 20 μ L MTT 溶液(5 mg/mL 溶解于 PBS 中). 在 37℃继续孵育 4 h, 小心弃去培养液, 每孔加入 200 μ L DMSO, 振荡 10 min. 然后用 ELISA microplate reader(Bio-Rad)酶标仪测试每孔的吸收, 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} 是与聚合物溶液作用的细胞样品孔的吸收, A_{control} 是不与聚合物溶液作用的细胞样品孔的吸收, 每组实验重复 3 次。

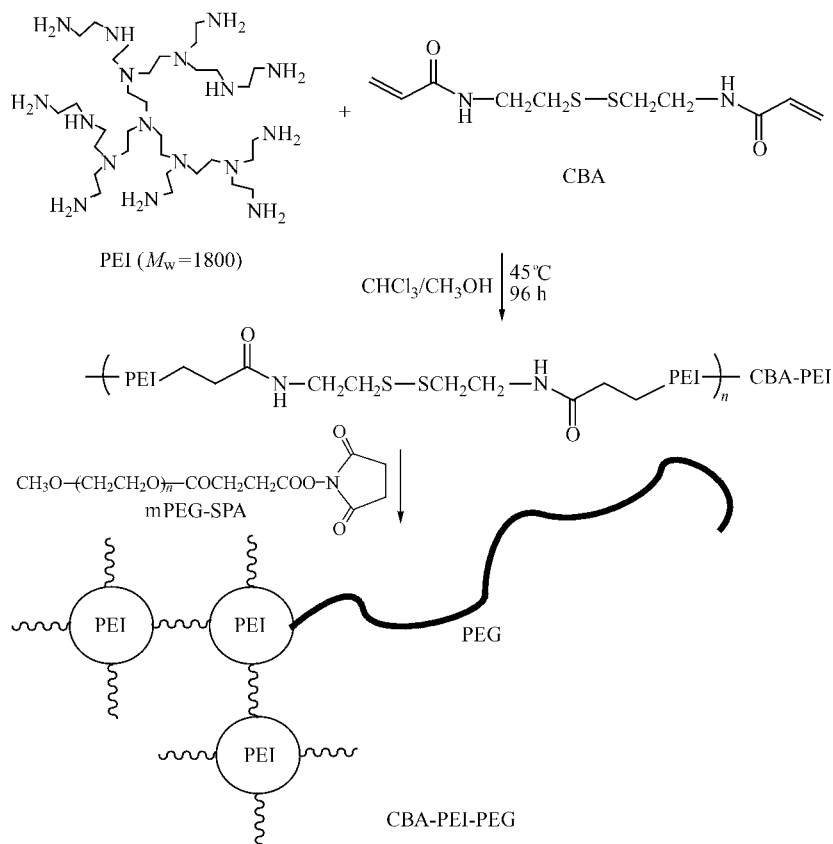
1.8 细胞荧光素酶转染实验

细胞转染研究在 CHO 细胞和 KB 细胞中进行, 选用荧光素酶质粒 DNA(pGL3 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, 细胞密度约为 1×10^4 /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, 配制不同质量比的阳离子聚合物/DNA 复合物, 孵育 30 min 后加入 96 孔板中. 继续培养 20 h 后, 小心移去培养液, 使用 PBS 缓冲液清洗两次, 完全吸除 PBS 后, 每孔加入 100 μ L 细胞裂解液(Promega 公司). 使用荧光素酶分析系统(Promega 公司)测定荧光素酶活性的相对光单位(relative light unit, RLU). 采用 BCA 法测定裂解液中的蛋白含量, 以校正培养板孔之间由于细胞密度不同引起的荧光素酶表达差异, 最终结果的荧光素酶活性表示为每毫克蛋白的 RLU。

2 结果与讨论

2.1 载体合成与理化表征

聚阳离子 CBA-PEI 及聚乙二醇接枝共聚物 CBA-PEI-PEG 的具体合成方法参见示意图 1. 在 CBA 交联 PEI 的合成实验中, 我们在参照以往文献报道^[20]的基础上做了进一步改进, 选用寡聚阳离子超支化的 PEI1800 ($M_w = 1800$) 作为交联主体分子. 因为相对于以往报道中较常使用的 PEI423 ($M_w = 423$) 或者 PEI600 ($M_w = 600$), 超支化



Scheme 1 Synthesis Route of the CBA-PEI-PEG Copolymer

PEI1800 ($M_w = 1800$)更易交联反应成为大分子量的聚阳离子,而不需要使用一个过大的反应浓度^[5,20],避免了一个黏稠的反应体系,从而能够较精确的控制反应浓度使交联产物的可重复性大大增强。

通过实验发现,氯仿/甲醇的混合溶剂更加有利于 CBA-PEI 交联反应,原因可能是交联生成的聚阳离子更易溶解于氯仿/甲醇的混合溶剂。

Table 1 Preparation of polymers

No.	CBA-PEI	CBA-PEI-P-1	CBA-PEI-P-2	CBA-PEI-P-3
PEG/CBA-PEI (W/W) ^a	—	1:5	1:2	1:1
PEG/CBA-PEI (%) ^b	—	19.4%	38.9%	95.8%
Molecular weight	8710 ^c	10400 ^b	12100 ^b	17060 ^b

^a Feed weight ratio; ^b Determined from ¹H-NMR data; ^c Determined from capillary viscosity measurements

交联产物 CBA-PEI 通过黏度法测试得出平均分子量约为 8710, 即一个交联分子约含有 5 个 PEI1800 ($M_w = 1800$) 单元. 进一步采用不同的投料比例将 mPEG-琥珀酰亚胺丙酸酯 (mPEG-SPA)

直接与 CBA-PEI 缩合反应得到 PEG 化的 CBA-PEI (简称 CBA-PEI-P). 琥珀酰亚胺丙酸酯的活化作用使得该缩合反应具有很高的效率, 由表 1 可见核磁表征中的 PEG 含量与反应投料比例基本一致.

通过核磁氢谱进一步确认聚合物的结构,如图1所示 PEI 的特征峰集中在 $\delta = 2.5 \sim 2.9$ 处;而在 $\delta = 3.47(\text{a})$ 、 $3.07(\text{b})$ 、 $2.39(\text{c})$ 出现的特征峰分别归属 CBA 的亚甲基峰以及丙烯酰胺双键在

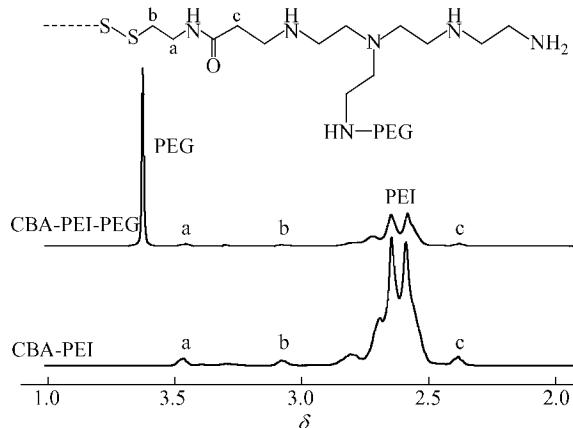


Fig. 1 ^1H -NMR spectra of CBA-PEI and CBA-PEI-PEG

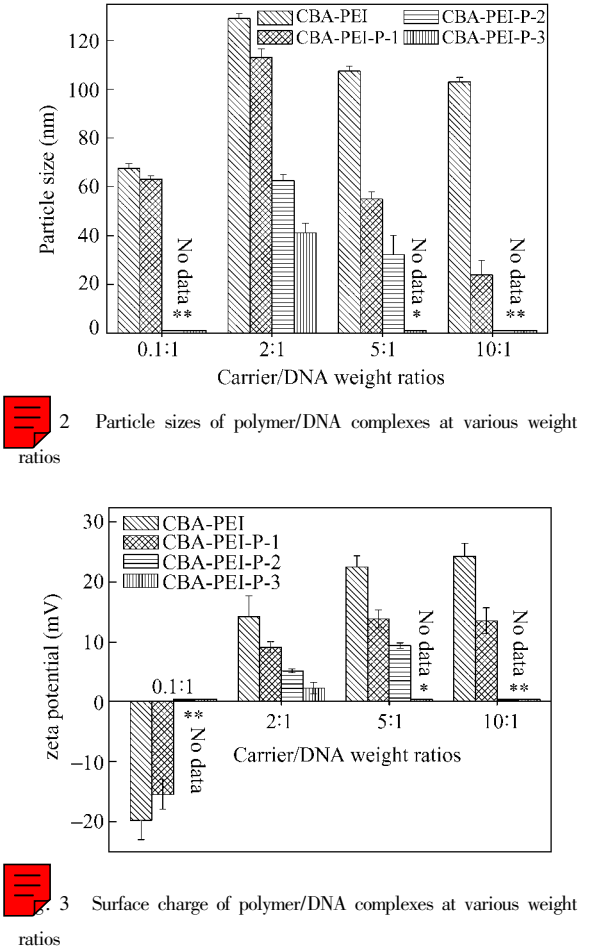
Michael 加成反应后所生成的亚甲基,由此证实了 CBA 交联 PEI 反应的发生.在 CBA-PEI-PEG(测试样品为 CBA-PEI-P-2)的核磁氢谱中除了 CBA-PEI 所有相同的特征峰外,在 $\delta = 3.63$ 处还出现了 PEG 的特征峰,证实 PEG 已经接枝到聚阳离子载体上.

2.2 复合物的粒径与表面电位

基因载体与 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成为影响基因传递效果的影响因素.通过图 2 的粒径测试结果并结合图 3 的表面电位结果,可以得出如下结论.(1)单纯的 CBA-PEI 载体包裹 DNA 后基本形成 100 nm 左右颗粒,接枝 PEG 后复合颗粒的粒径显著降低,并且随着 PEG 接枝含量以及复合质量比的增加而减小.这是由于 PEG 具有抑制吸附的作用,成为了有效的 spacer,避免了颗粒间的聚集而不易形成大的纳米颗粒;(2) PEG 的接枝能够有效的降低复合颗粒表面电位,说明这种 spacer 效应一定程度上能屏蔽过剩的表面电荷提高稳定性;(3)从实验结果中发现随着 CBA-PEI 载体中的 PEG 含量增加到一定程度后,无法与 DNA 形成有效的复合,测试不到复合物颗粒.从而得出结论接枝 PEG 虽然可以减小 CBA-PEI 与 DNA 的复合物粒径、避免颗粒团聚、部分屏蔽表面电荷提高稳定性,但是过多的 PEG 也使得自身结构的致密性降低,也就是说含有 PEG 的静电纳米颗粒是一个较松散的结构.

2.3 凝胶阻滞电泳

通过凝胶阻滞实验来考察载体材料与 DNA 的复合能力.由图 4 可以看出,交联产物 CBA-PEI 具有较强的复合 DNA 能力,在与 DNA 质量比达



到 0.1 以上时即能够将带负电的 DNA 完全阻滞.但是当 CBA-PEI 进行 PEG 修饰后其与 DNA 的复合能力发生了显著变化,首先是 CBA-PEI-P-1 (PEG 质量比含量约为 16%)的完全阻滞比例提高到了 0.3 至 0.4 左右;然后 CBA-PEI-P-2(PEG 质量比含量约为 28%)和 CBA-PEI-P-3(PEG 质量比含量约为 49%)出现明显的 DNA 携带能力降低.

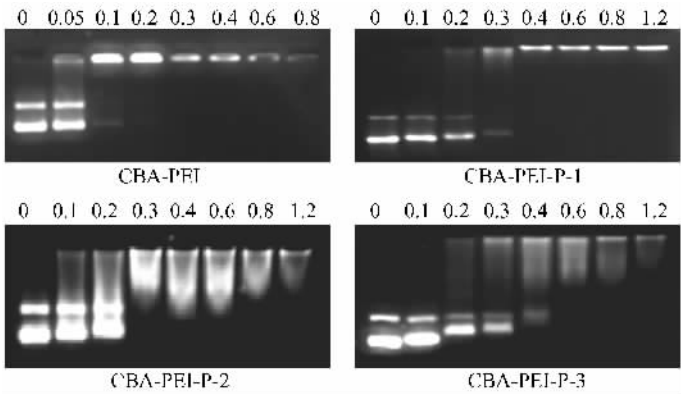


Fig. 4 Gel retardation assay of polymer/DNA complexes

The polymer to DNA weight ratio used to form each polyplex is given above the corresponding lane.

虽然在与 DNA 质量比 0.3 或 0.4 时出现了部分阻滞现象,但是不能全部阻止 DNA 的电泳迁移,从而出现了一部分 DNA 被留在加样孔而另一部分迁移的现象,随着质量比加大被阻滞部分的比例也缓慢增加,直至与 DNA 质量比 1.2 时接近完全阻滞.

2.4 MTT 细胞毒性

采用 MTT 的方法比较了不同浓度 PEI25k, CBA-PEI 以及 PEG 化 CBA-PEI 的细胞毒性,细胞实验采用 CHO 细胞进行.图 5 给出了在不同浓度下各种聚合物处理后的细胞存活率.由图 5 可见 PEI25k 具有较高的细胞毒性,相对而言 CBA-PEI 这种小分子量 PEI 的交联物毒性很低,在测试浓度范围内细胞存活良好,结果与已报道的此类载体^[3,4,15]性质相同.相对于 CBA-PEI,PEG 化后的材料(CBA-PEI-P-1, CBA-PEI-P-2, CBA-PEI-P-3)显示了更低的细胞毒性,并且随着 PEG 接枝含量的增加而降低.这一结果说明 PEG 化对这种交联型聚阳离子仍有改善细胞毒性的效果.

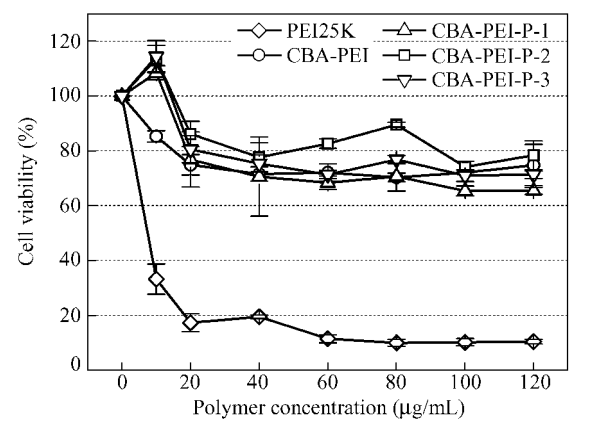


Fig. 5 The percentage of viable cells at various polymer concentrations for PEI25K, CBA-PEI, CBA-PEI-P-1, CBA-PEI-P-2 and CBA-PEI-P-3

2.5 细胞荧光素酶转染

选用荧光素酶质粒 DNA(pGL3 plasmid)作为报告基因进行细胞转染实验来评价材料的转染性.首先选用 CHO 细胞系分别对 PEI25k 和新材料 CBA-PEI 进行转染性能的比较.图 6 可以看出相比于 PEI25k,交联型聚阳离子 CBA-PEI 具有更高的转染效率,最高达到 PEI25k 的 4 倍左右.进一步选用 KB 细胞系对不同 PEG 化的 CBA-PEI 载体进行转染实验来考察 PEG 对此载体的影响.图 7 的结果看出接枝 PEG 后, CBA-PEI 的转染性能

下降明显,随着接枝含量的增加其转染效率几乎以数量级的趋势在下降.结合上面的凝胶电泳实验以及复合物粒径结果,我们推测这种转染效率的下降很可能是由于 PEG 的接枝使得 CBA-PEI 载体对 DNA 的复合能力下降而造成的. PEG 化 CBA-PEI 载体与 DNA 形成了一个较为松散的复合结构,这种松散的结合方式不利于质粒 DNA 的基因传递.但是在已见报道的众多文献中^[21]这种较为松散的复合结构却有利于小干扰 RNA (siRNA)的高效传递.

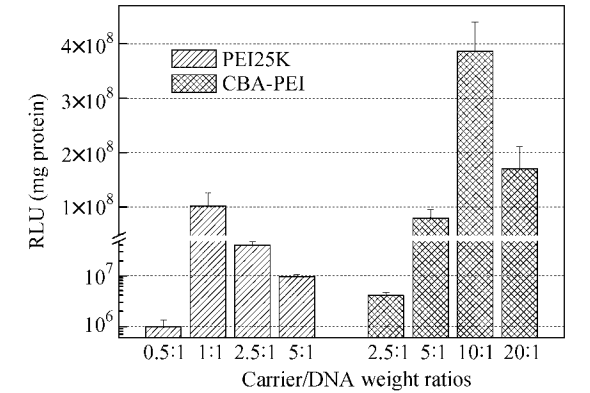


Fig. 6 Transfection efficiency of polymer/pDNA at various weight ratios in CHO cells

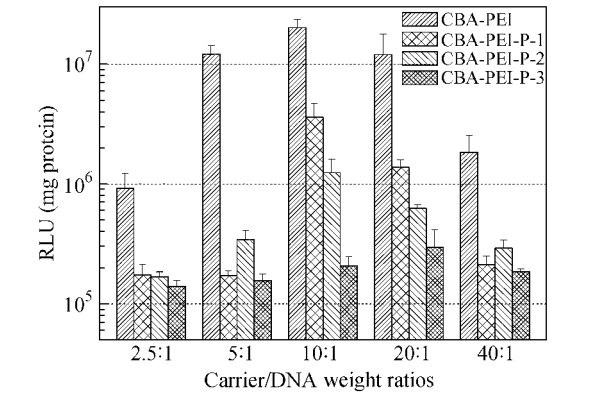


Fig. 7 Transfection efficiency of polymer/pDNA at various weight ratios in KB cells

3 结论

新型交联型基因载体 CBA-PEI 在基因传递中具有更为优异的性能,相比于传统的 PEI25k 更加高效低毒并可体内降解,相对于已见报道的此类交联型 PEI 载体,我们改变了交联单元优化了合成方法,更加简便易得具有可重复性,并且相比较获得了更高的转染性能.在进一步的研究中,率先

探讨了 PEG 化给这类载体性能带来的影响. 由各种表征结果可见 CBA-PEI 的 PEG 化使得其与 DNA 的结合能力降低, 进而影响了转染性能. 但是 PEG 化改性能带来细胞毒性上的进一步降低, 并且 PEG 在遮蔽过剩表面正电荷仍然显示了

相当的效果, 这非常有利于复合物载体在体内环境的稳定. 由于分子结构的相似, 我们认为可以推而广之, 这些性能改变代表了 PEG 化对此类交联型 PEI 载体的共同影响.

REFERENCES

- 1 Olefsky J M. *Nature*, 2000, 408(6811): 420 ~ 421
- 2 Tang Y, Ge Y Z, Yin J Q. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2007, (28): 1 ~ 9
- 3 Boussif O, Lezoualch F, Zanta M A, Mergny M D, Scherman D, Demeneix B, Behr J P. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, (92): 7297 ~ 7301
- 4 Yuan Renxu(苑仁旭), Zuo Yufang(左瑜芳), Xiao Zhongpeng(肖中鹏), Huang Wenlin(黄文林), Shuai Xintao(帅心涛). *Acta Polymerica Sinica* (高分子学报), 2009, (2): 104 ~ 110
- 5 Forrest M L, Koerber J T, Pack D W. *Bioconjugate Chemistry*, 2003, (14): 934 ~ 940
- 6 Ahn C H, Chae S Y, Bae Y H, Kim S W. *Journal of Controlled Release*, 2002, (80): 273 ~ 282
- 7 Jere D, Xu C X, Arote R, Yun C H, Cho M H, Cho C S. *Biomaterials*, 2008, (29): 2535 ~ 2547
- 8 Fu Huili(付慧莉), Cheng Sixue(程巳雪), Zhuo Renxi(卓仁禧). *Acta Polymerica Sinica*(高分子学报), 2009, (2): 97 ~ 103
- 9 Ooya T, Choi HS, Yamashita A, Yui N, Sugaya Y, Kano A, Maruyama A, Akita H, Ito R, Kogure K, Harashima H. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, (128): 3852 ~ 3853
- 10 Wang X L, Jensen R, Lu Z R. *J Controlled Release*, 2007, (120): 250 ~ 258
- 11 Wang Y X, Chen P, Shen J C. *Biomaterials*, 2006, (27): 5292 ~ 5298
- 12 Lee M, Kim S W. *Pharm Res*, 2005, (22): 1 ~ 10
- 13 Lee Y, Fukushima S, Bae Y, Hiki S, Ishii T, Kataoka K. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, (129): 5362 ~ 5363
- 14 Tian H Y, Xiong W, Wei J Z, Wang Y, Chen X S, Jing X B, Zhu Q Y. *Biomaterials*, 2007, (28): 2899 ~ 2907
- 15 Li Laisheng(李来胜), Tong Jing(童景), Wu Juan(吴卷), Du Jingzhi(杜金志), Wang Jun(王均). *Acta Polymerica Sinica*(高分子学报), 2009, (3): 257 ~ 263
- 16 Petersen H, Fechner PM, Fischer D, Kissel T. *Macromolecules*, 2002, 35(18): 6867 ~ 6874
- 17 Zhang X, Pan S R, Hu H M, Wu G F, Feng M, Zhang W, Luo X. *J Biomed Mater Res, Part A*, 2008, (84A): 795 ~ 804
- 18 Cai Jia(蔡佳), Chen Jun(陈钧), Huang Ping(黄平), Shen Yunfan(申云帆), Jiang Xinguo(蒋新国). *Chinese Journal of Pharmaceuticals*(中国医药工业杂志), 2006, 37(11): 737 ~ 741
- 19 Harpe AV, Petersen H, Li Y X, Kissel T. *J Controlled Release*, 2000, (69): 309 ~ 322
- 20 Christensen L V, Chang C W, Kim W J, Kim S W. *Bioconjugate Chem*, 2006, (17): 1233 ~ 1240
- 21 Schaffert D, Wagner E. *Gene Therapy*, 2008, (16): 1131 ~ 1138

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF A CROSSLINKING POLYETHYLENIMINE AS SMART GENE CARRIER AND EFFECTS OF PEGYLATION DEGREE

CHEN Lei¹, TIAN Huayu¹, CHEN Xuesi¹, PARK Taegwan², MARUYAMA Atsushi³, JING Xiabin¹

(¹ State Key Laboratory of Polymer Physics and Chemistry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022)

(² Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Daejeon 305-701, Republic of Korea)

(³ Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812-8581, Japan)

Abstract A smart biodegradable cationic polymer (CBA-PEI) based on the disulfide bond-containing cross-linker cystamine bisacrylamide (CBA) and low molecular weight branched polyethylenimine (1800-Da, PEI1800) was successfully synthesized by Michael addition reaction in our recent study. Furthermore, a series of copolymers (CBA-PEI-PEG) with different PEGylation degree were obtained by the mPEG-SPA (5000-Da) reacting with CBA-PEI at

various weight ratios directly. The molecular structures of the resulting polymers CBA-PEI and CBA-PEI-PEG were evaluated by nuclear magnetic resonance spectroscopy ($^1\text{H-NMR}$) and capillary viscosity measurements, all of which had successfully verified formation of the copolymers. The polymer/DNA complexes based on CBA-PEI and CBA-PEI-PEG were measured by dynamic light scattering and gel retardation assay. The results showed that the particle size and zeta potential of complexes were reduced with increasing amount of PEG grafting, even no particle formation. The particle size of CBA-PEI/DNA complexes was in range of 103.1 to 129.1 nm, and the zeta potential was in range of 14.2 to 24.3 mV above the 2:1 weight ratio. In the same measure condition, the particle size of CBA-PEI-PEG complexes was reduced to a range of 32.2 to 55 nm, and the zeta potential was in range of 9.3 to 13.8 mV at the 2:1 weight ratio. In the gel retardation assay, CBA-PEI showed a strong DNA-binding capability. Plasmid DNA was completely retarded at the 0.1:1 weight ratio. By contrast, CBA-PEI-PEG which consists of PEG/CBA-PEI (W/W, 38.9%) or PEG/CBA-PEI (W/W, 95.8%) displayed a poor retardation effect even at the high weight ratio. PEG-grafted showed a shield effect in polymer/DNA complexes. However, it showed the reduced DNA binding ability if the cationic polymers were modified with too much PEGs. Moreover, the CBA-PEI and CBA-PEI-PEG were evaluated in CHO and KB cells for their cytotoxicity and transfection efficiency. MTT assay revealed that both CBA-PEI and CBA-PEI-PEG had very lower cytotoxicity in CHO cell lines compared with PEI25k. Although CBA-PEI showed 4 times higher transfection efficiencies compared with PEI25k, the transfection efficiency of CBA-PEI-PEG was reduced obviously with increasing amount of PEG grafting.

Keywords Gene delivery, Polyethylenimine, Disulfide bonds, Biodegradable, PEGylation