

PEG修饰对 PLL-EGF 基因载体靶向结合作用的影响*

郭妍^{1,2)} 顾健人²⁾ 徐宇虹^{2,3)**}

(¹⁾上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240;

²⁾上海交通大学肿瘤研究所, 癌基因及相关基因国家重点实验室, 上海 200032;

³⁾上海交通大学药学院, 上海 200240)

摘要 聚阳离子基因载体系统由于安全性好和便于设计等优点, 近年来在基因治疗中的应用发展迅速. 在进行基因药物的体内靶向输送时, 目前国际上主要通过基因输送系统中修饰聚乙二醇(PEG)和靶向分子来提高体内输送的稳定性和靶向性. PEG的修饰可能会遮蔽靶向分子的功能呈现, 因此建立定量分析方法评价 PEG 修饰对靶向结合作用的影响非常重要. 将连接有表皮生长因子(EGF)的聚赖氨酸(PLL)基因载体作为研究模型, 建立 BIAcore 检测方法, 比较 PLL-EGF, PEG₇₀₀₀ 修饰的 PLL-EGF, PEG₂₀₀₀₀ 修饰的 PLL-EGF 对表皮生长因子受体(EGFR)的结合和解离速率, 评价 PEG 修饰对 PLL-EGF 靶向功能呈现的影响. 结果表明, PEG₇₀₀₀ 的修饰降低了 EGF 和 EGFR 之间的结合速率, 提高了解离速率, 整体减弱了靶向分子的靶向结合能力. PEG₂₀₀₀₀ 的修饰进一步减弱靶向分子功能的呈现. 因此在进行靶向型聚阳离子基因输送系统设计时, 考察 PEG 修饰对靶向结合能力的影响程度非常重要. 该研究结果也对其他基因载体系统的设计提供必要的参考.

关键词 聚阳离子基因输送系统, 聚乙二醇(PEG), 表皮生长因子(EGF), BIAcore, 聚赖氨酸(PLL)

学科分类号 R73

基因治疗通过传递基因药物到特定的位置, 表达需要的蛋白质或者取代、修复有问题的基因, 已成为恶性疾病治疗的新希望. 基因治疗的关键在于构建高效、安全的基因载体. 聚阳离子非病毒载体通过聚阳离子与基因药物之间的电荷作用, 将基因药物包装成纳米粒子, 提高基因药物的作用效率. 一些聚阳离子非病毒载体基因输送系统在细胞试验中显示了比较高的作用效率, 但是在进行体内系统给药时, 由于体内各种复杂因素的影响, 基因输送系统的靶向能力和输送效率很低^[1].

近年来, 国际上发展了在聚阳离子基因输送系统中同时连接亲水性聚合物聚乙二醇(PEG)和靶向分子的基因输送策略^[2~6], 其中 PEG 的修饰提高输送系统的体内稳定性^[7], 靶向分子的连接给输送系统提供体内的靶向机制^[8]. PEG 和靶向分子都需要呈现在输送系统的表面, 执行各自的功能. 在进行聚阳离子基因输送系统的设计时, 一个非常重要的问题是: PEG 链通过表面遮蔽作用来提高输送系统的稳定性, 这种遮蔽作用可能影响靶向分子的靶

向结合作用, 从而影响靶向输送效果. 目前国际上有一些不同的研究结果报道. 一些研究人员认为 PEG 修饰会影响靶向分子的呈现, 在 Woodle 和 Lee 等^[5,9]的研究中, 靶向分子被连接在 PEG 链的远端以减少 PEG 链对靶向结合能力的影响. Blessing 等^[10]在研究 EGF-PEI/DNA 复合物转染特性时, 采取了两种策略, 策略一是将靶向分子 EGF 直接连接在聚乙烯亚胺(PEI)骨架上, 策略二是将靶向分子 EGF 连接在 PEG 链的远端. 另一方面, Kircheis 等^[9]报道了基于 transferrin-PEI 的基因转染效率不受 PEG 修饰的影响. Ogris 等^[11, 12]报道 PEG 修饰不会减弱含有 EGF 或者 transferrin 靶向分子的聚阳离子基因输送系统的转染效率. 这些不同结论的产生, 可能是由于细胞试验设计和基因表达检测方法的不同. 生物试验中存在许多可能的干

*霍英东教育基金会青年教师基金(91035)和上海交通大学青年基金资助项目.

** 通讯联系人. Tel/Fax: 021-34204739, E-mail: yhxu@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2006-11-07, 接受日期: 2006-12-31

扰因素, 采用的比较方法更多是定性而不是定量比较. 基于以上的考虑, 必须发展体外的定量分析方法, 考察 PEG 修饰对聚阳离子靶向型基因输送系统的影响, 从而为聚阳离子靶向输送系统的设计和研体内靶向输送提供可靠的依据.

考察 PEG 修饰对聚阳离子基因输送系统靶向结合作用的影响, 关键在于研究不同 PEG 修饰情况下靶向分子和靶点之间的相互作用. 表面等离子体共振技术(surface plasmon resonance, SPR)是利用金属薄膜的光学耦合产生的一种物理光学现象, 已经成为研究生物分子相互作用的重要手段^[13,14]. Pharmacia 公司基于 SPR 技术, 开发了商用的仪器 BIAcore. 该技术有别于传统检测方法, 它的优点在于能实时监测分子之间相互作用的动态过程, 检测过程简单和快速.

本文以 PLL-EGF 为研究模型, 其中聚赖氨酸(PLL)是最常用的聚阳离子之一, 表皮生长因子(EGF)靶向于肿瘤细胞表面高表达的表皮生长因子受体(EGFR). 利用 BIAcore 技术考察了 PEG 修饰以及 PEG 链的长短对 PLL-EGF 中 EGF 靶向结合能力的影响.

1 材料、仪器和方法

1.1 材料

高分子质量的聚赖氨酸(PLL) ($M_r = 28\ 500$)、表皮生长因子受体(EGFR)、牛血清白蛋白(BSA)和 2-mercaptoethylamine 从 Sigma Chemical (St Louis, MO, USA) 购得. Succinimidyl 4- (N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate(SMCC) 从 Pierce Biotechnology (Rockford, USA) 购买. Sephadex™ G-25 从 Amersham Pharmacia Biotech AB (Uppsala, Sweden)公司购买. 人源 rhEGF 由上海生物工程中心制备. 亲水性聚合物 mPEG-NHS ($M_r = 7\ 000, 20\ 000$) (mwd=1.10) 由复旦大学高分子科学系黄骏廉教授提供. BIAcore 实验中所使用的传感生物芯片是 CM5. N-hydroxysuccinimide (NHS) 和 N-ethyl-N'-3 [- (dimethylamino)propyl] carbodiimide (EDC)活化试剂、盐酸化的氨基乙醇、连接缓冲液、再生缓冲液和体系的缓冲液都来自 BIAcore 的试剂盒(BIAcore, Uppsala, Sweden). 其他所有化学试剂均为分析纯. 实验中使用的水用超纯水系统制备(Millipore, Bedford, MA, USA).

1.2 仪器

实验使用的 SPR 仪器是 BIAcore 3000

(BIAcore, Uppsala, Sweden).

1.3 方法

1.3.1 合成 PLL-EGF. PLL-EGF 的合成方法是: 采用异双功能基团化合物 SMCC 作为连接剂, SMCC 与 PLL 上的氨基反应, 将 PLL 上的部分氨基活化成 PLL-maleimide. PLL-maleimide 与经 2-mercaptoethylamine 活化的 EGF 反应得到产物 PLL-EGF. 具体过程为: a. 将 0.07 mg SMCC (溶于 1 ml DMSO)滴加入 1 ml 的 PLL 溶液中(1 g/L, pH 7.2, 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, 5 mmol/L EDTA), 25℃反应 30 min. 反应产物用脱盐柱脱盐(脱盐柱填充 Sephadex™ G-25). b. 0.64 mg EGF 溶液(溶于 1 ml pH 7.2, 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, 5 mmol/L EDTA 溶液中)用 2-mercaptoethylamine (反应摩尔比为 2-mercaptoethylamine : EGF = 2 : 1) 25℃活化 90 min, 用除盐柱脱盐, 同时除去未反应的 2-mercaptoethylamine. c. PLL-maleimide 溶液和活化了的 EGF 溶液混合, 在 4℃反应过夜. 产物 PLL-EGF 透析纯化(截至分子质量为 10 000), 冻干保存.

1.3.2 合成 PEG₇₀₀₀-g-PLL-EGF 和 PEG₂₀₀₀₀-g-PLL-EGF.

PEG-g-PLL-EGF 的合成方法是将 mPEG-NHS 与 PLL 反应, 生成 PEG-g-PLL, 再用 SMCC 活化 PEG-g-PLL 上的氨基, 形成 PEG-g-PLL-maleimide. PEG-g-PLL-maleimide 与经 2-mercaptoethylamine 活化的 EGF 反应得到的产物 PEG-g-PLL-EGF.

PEG₇₀₀₀-g-PLL-EGF 的具体合成过程为: a. 将 1.47 mg PEG₇₀₀₀-NHS (溶解在 1 ml DMSO 中)滴加入 1 ml PLL 溶液中(1 g/L, pH 7.2, 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, 5 mmol/L EDTA, 反应摩尔比为 PEG₇₀₀₀-NHS : PLL = 6 : 1), 25℃反应 30 min, 得到 PEG-g-PLL. b. 在 PEG-g-PLL 中加入 0.07 mg SMCC(溶于 1 ml DMSO, 反应摩尔比为 SMCC : PLL = 6 : 1), 25℃反应 30 min. 反应产物用脱盐柱脱盐(脱盐柱填充 Sephadex™ G-25). c. 0.64 mg EGF 溶液(溶于 1 ml pH 7.2, 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, 5 mmol/L EDTA 溶液中)用 2-mercaptoethylamine (反应摩尔比为 2-mercaptoethylamine : EGF = 2 : 1) 25℃活化 90 min, 生成 PEG₇₀₀₀-g-PLL-maleimide. 用除盐柱脱盐, 同时除去未反应的 2-mercaptoethylamine. d. PEG₇₀₀₀-g-PLL-maleimide 溶液和活化了的 EGF 溶液混合, 4℃反应过夜. 最后的产物 PEG₇₀₀₀-g-PLL-EGF 透析纯化(截至分子质量

为 10000), 冻干保存.

PEG₂₀₀₀₀-NHS : PLL 的反应摩尔比为 4 : 1, PEG₂₀₀₀₀-g-PLL-EGF 的合成过程与 PEG₇₀₀₀-g-PLL-EGF 相同.

1.3.3 BIAcore 实验.

利用表面等离子共振技术的生物传感器 BIAcore, 实时监测 PLL-EGF 和 EGFR 之间的相互作用, 并用该技术评价 PEG 是否修饰以及 PEG 链的长度对靶向结合能力的影响.

BIAcore 实验中使用的芯片是 CM5, 在实验过程中, 传感器表面和样品池保持在 25℃. 通过碳二酰亚胺反应, 将生物传感芯片 CM5 表面的羧甲基葡聚糖活化. 95 ng 的 EGFR (7 mg/L) 溶解在 10 mmol/L 醋酸钠(pH 4.8)中, 以流速 10 μ l/min 流过芯片表面, 通过 EGFR 上的氨基与芯片表面活化基团之间的反应连接到芯片上. 1 mol/L 盐酸化的氨基乙醇(pH 8.5)流过表面, 将未反应的 EGFR 洗去, 同时封闭芯片上多余的活化位点.

PLL-EGF, PEG₇₀₀₀-g-PLL-EGF 和 PEG₂₀₀₀₀-g-PLL-EGF 都溶解在 BIAcore 提供的 HBS-EP 缓冲液中 [10 mmol/L Hepes, pH 7.4, 含有 150 mmol/L NaCl, 3 mmol/L EDTA, 0.005% polysorbate 20 (V/V)], 形成不同浓度的样品. 样品与 EGFR 的结合过程是将不同浓度(60~1000 nmol/L)的样品 (35 μ l) 以 5 μ l/min 的流速流过芯片表面, 历时 5 min. 样品的解离过程用 BIAcore 缓冲液以 5 μ l/min 的流速冲洗 5 min. 最后, 芯片表面用 40 μ l 的 10 mmol/L 氨基乙酸(pH 2.0)进行再生. 再生过程中, 结合在 EGFR 上的分析物被洗脱. 芯片再生后, 芯片表面重新流过相同的分析物, 光响应结果相同, 说明选择的芯片再生条件不会改变芯片表面状态.

BSA 的分子质量和 EGFR 相似, 和 EGF 没有特异性的相互作用. 将 BSA 连接在另一芯片表面, 建立参比通道, 可以扣除实验中的本体折射参数变化和背景的非特异性作用. 以下所报道的数据已经扣除了连接有 BSA 的参比通道背景.

动力学速率常数(k_a , k_d)和平衡结合常数 (K_A , K_D)由 BIAevaluation 3.1 软件计算得出. 分子间相互作用的数据用 Scatchard 格式表征(Req/nc 对 Req , 其中 Req 是平衡时生物芯片的响应, n 是价态, c 是浓度).

2 结 果

2.1 生物传感芯片的活化和 EGFR 的连接

图 1 显示了 EGFR 在生物传感芯片表面的连接过程. 如图 1 所示, NHS/EDC 活化传感芯片表面, 然后 EGFR 连接在芯片表面, 最后用氨基乙醇封闭多余的活性位点, 并冲洗掉未连接的 EGFR. EGFR 的连接使得光响应值上升 5075.2Ru.

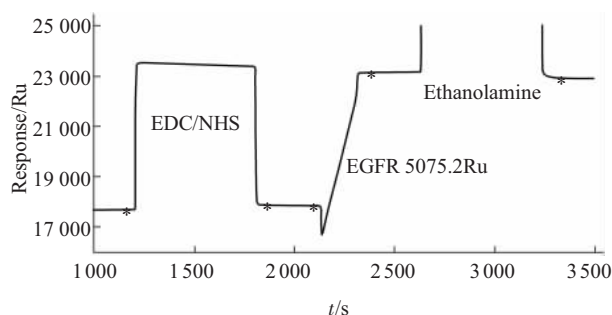


Fig. 1 The process of EGFR conjugation on BIAcore CM5 chip

CM5 chip was activated by EDC/NHS. Then EGFR conjugated to the chip. Ethanolamine was used to block the excess activation site on the chip.

2.2 参比通道的设置

图 2 显示了在连接有 EGFR 的反应通道和连接有 BSA 的参比通道中同时流过 PLL-EGF 样品的情况, 样品在参比池中有一定的非特异性吸附, 但是在连接有 EGFR 的反应池中光响应值更大. 扣除参比池中的非特异性吸附, 剩下的就是由 PLL-EGF 和 EGFR 特异性相互作用引起的变化. PEG₇₀₀₀-g-PLL-EGF, PEG₂₀₀₀₀-g-PLL-EGF 与 EGFR

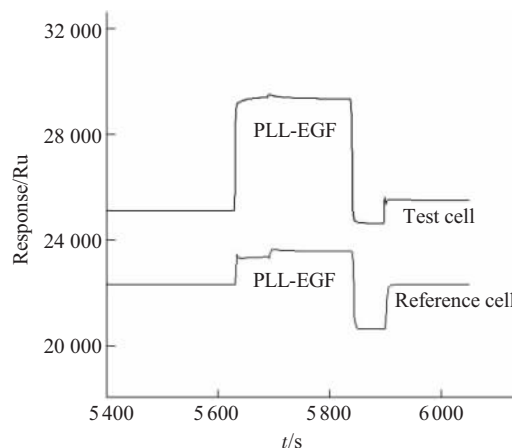


Fig. 2 The light response when PLL-EGF flowed over the reaction cell (conjugated with EGFR) and reference cell (conjugated with BSA)

之间也存在类似的非特异性相互作用, 通过 BSA 参比通道的设置, 可以减去非特异性相互作用引起的光响应值.

2.3 不同浓度的 PLL-EGF、PEG₇₀₀₀-g-PLL-EGF、PEG₂₀₀₀₀-g-PLL-EGF 与芯片表面 EGFR 的相互作用过程

图 3a, b, c 分别显示了实时监测 PLL-EGF、PEG₇₀₀₀-g-PLL-EGF、PEG₂₀₀₀₀-g-PLL-EGF 与 EGFR 之间相互作用的结合和解离过程. 35 μ l 不同浓度的 PLL-EGF(600, 300, 240, 180, 60 nmol/L)在连接

有 EGFR 的反应通道和连接有 BSA 的参比通道中, 以 5 μ l/min 流速在通道表面作用 5 min. 在 EGFR 反应通道表面形成的光响应值减去 BSA 参比通道的光响应值之后, 将不同浓度的 PLL-EGF 形成的光响应值在同一时间段作图, 得到图 3a. 图 3b 和 3c 用同样的方法分别得到不同浓度的 PEG₇₀₀₀-g-PLL-EGF (1000, 400, 320, 160, 80 nmol/L)、PEG₂₀₀₀₀-g-PLL-EGF(1150, 350, 270, 180, 90 nmol/L)与 EGFR 之间特异性相互作用的光响应曲线.

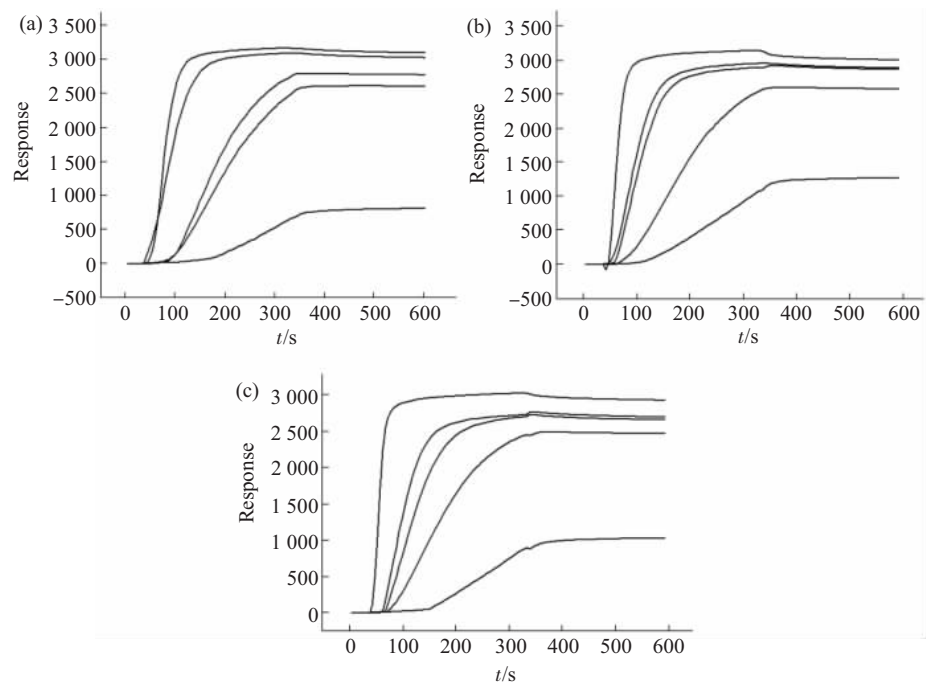


Fig. 3 BIAcore light response of PLL-EGF, PEG₇₀₀₀-g-PLL-EGF, PEG₂₀₀₀₀-g-PLL-EGF with different concentration flowed over immobilized EGFR respectively
(a) PLL-EGF (600, 300, 240, 180, 60 nmol/L) flowed over immobilized EGFR. (b) PEG₇₀₀₀-g-PLL-EGF (1000, 400, 320, 160, 80 nmol/L) flowed over immobilized EGFR. (c) PEG₂₀₀₀₀-g-PLL-EGF (1150, 350, 270, 180, 90 nmol/L) flowed over immobilized EGFR.

实时监测反应的结合过程和解离过程, 扣除参比通道的光响应值, 得到的数据用同时动力学模拟 K_a/K_d 模型中的有质量迁移的 1 : 1 结合模型进行拟

合(BIAevaluation 3.1). 拟合程度最好的动力学常数列于表 1, 其中所估计的平衡解离常数从动力学拟合中计算得出. 从表 1 中可以看出, 对 EGFR 结合

Table 1 Kinetic analysis of interaction between PLL-EGF, PEG₇₀₀₀-g-PLL-EGF, PEG₂₀₀₀₀-g-PLL-EGF and immobilized EGFR

	$K_a/(10^5 \cdot L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1})$	$K_d/(10^{-4} \cdot s^{-1})$	$K_A(10^8 \cdot L \cdot mol^{-1})$	$K_D/(10^{-9} \cdot mol \cdot L^{-1})$
PLL-EGF	4.07	8.99	4.53	2.21
PEG ₇₀₀₀ -g-PLL-EGF	3.38	9.87	3.88	2.58
PEG ₂₀₀₀₀ -g-PLL-EG	1.81	14.8	1.22	8.17

The data were fitted by kinetics simultaneous K_a/K_d 1 : 1 with mass transfer using BIAevaluation 3.1 software respectively.

速率的顺序为 PLL-EGF > PEG₇₀₀₀-g-PLL-EGF > PEG₂₀₀₀₀-g-PLL-EGF, 解离速率的顺序为 PEG₂₀₀₀₀-g-PLL-EGF > PEG₇₀₀₀-g-PLL-EGF > PLL-EGF.

图 4 把 PLL-PEG, PEG₇₀₀₀-g-PLL-EGF 和 PEG₂₀₀₀₀-g-PLL-EGF 对 EGFR 的稳态结合数据用 Scatchard plots 进行拟合. 拟合的结果表明 3 种拟合曲线都是非线性的.

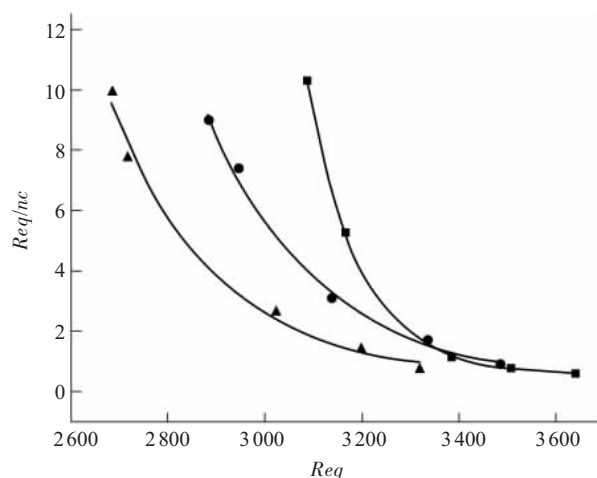


Fig. 4 Scatchard analysis of the equilibrium binding data for PLL-EGF, PEG₇₀₀₀-g-PLL-EGF and PEG₂₀₀₀₀-g-PLL-EGF to EGFR

The data were simulated by non-linear fitting respectively. ■—■: PLL-EGF; ●—●: PEG₇₀₀₀-g-PLL-EGF; ▲—▲: PEG₂₀₀₀₀-g-PLL-EGF.

3 讨 论

聚阳离子基因载体通过和基因药物之间的电荷作用, 将基因药物包装成生物纳米粒子, 提高基因药物的输送和转染效率. 由于其安全性好, 载体设计灵活等优点, 是基因输送研究领域研究热点. 在进行基因药物体内靶向输送时, 目前国际上主要采用的策略是在基因输送系统中修饰亲水性聚合物 PEG 来提高输送系统的稳定性, 在输送系统中连接靶向分子形成靶向机制. 我们前期的研究工作, 已经用原子力显微镜技术证实了 PEG 的修饰在基因输送系统表面形成一层具有遮蔽作用的保护层, 降低体外和体内环境中各种非特异性相互作用^[7]. PEG 修饰造成的一个重要问题是, PEG 链和靶向分子同时装配在输送系统的表面, 表面的 PEG 链保护层会影响分子质量相对较小的靶向分子的靶向结合能力.

Woodle 等^[9]认为, 输送系统表面的 PEG 会遮蔽靶向分子, 因此在研究中先将聚阳离子与基因相互作用形成 DNA 复合物, 再将靶向分子连接在

DNA 复合物上, 以防止 PEG 链遮蔽靶向分子从而降低靶向结合效率. 然而, 一些其他的工作表明, PEG 的修饰并不明显影响靶向分子的靶向结合能力^[11], 如 Blessing 等^[10]的研究中 PEG 修饰基本不影响 EGF 介导的基因输送系统的转染效率. 这些研究结果可能高度取决于靶向分子的类型和所修饰的 PEG 链的长度和数量.

大多数早期的研究都是基于细胞结合实验和转染实验. 本文首先发展了表面等离子共振技术 (SPR) 来监测 PEG 修饰对 PLL-EGF 基因载体的靶向结合能力的影响. 和其他的生物检测方法相比, 用 SPR 技术能定量检测配体与受体之间的特异性相互作用, 也是一种更简单和快速的方法^[15~17].

在 PLL-EGF 基因载体合成过程中未反应的 EGF 在透析过程中被除去 (见实验过程), 目的是防止自由的 EGF 分子在 SPR 实验中也占据 EGFR 结合点, 导致实验误差^[18]. 从结合速率和解离速率数据可以看出 PEG 修饰以后, 相比于 PLL-EGF, PEG₇₀₀₀-g-PLL-EGF 对 EGFR 的结合速率下降, 而解离速率上升. 当连接了更高分子质量的 PEG 链——PEG₂₀₀₀₀ 之后, 这种影响更加明显. 显然, PEG 修饰降低了 EGF 对 EGFR 的结合效率. PEG₇₀₀₀-g-PLL-EGF 和 PEG₂₀₀₀₀-g-PLL-EGF 都显示了逐渐降低的结合速率, 和逐渐升高的解离速率. 不同长度的 PEG 链不同程度地影响 EGF 对 EGFR 的结合常数和解离常数. PEG₂₀₀₀₀-g-PLL-EGF 对 EGFR 的结合速率比 PEG₇₀₀₀-g-PLL-EGF 慢了 46%, 而解离速率快了约 50%, 说明更长的 PEG 链更大地影响靶向分子的结合能力.

理论上, EGF 与 EGFR 之间的相互作用摩尔比是 1:1, 如果进行 Scatchard 分析, 得到的是线性拟合数据. 而实际上 Scatchard 分析表明, EGFR 和 PLL-EGF, PEG-g-PLL-EGF 之间的相互作用得到的是非线性的拟合 (图 4). 主要是以下几个原因: EGF 在每条 PLL 链上的连接个数不尽相同; EGF 在每条 PLL 链上的结合位点也不尽相同; 相似的, PEG 在 PLL 链上的分布和数量也不相同. 这些原因都导致了在 Scatchard 分析中的非线性关系.

本文的研究结果肯定了亲水性聚合物 PEG 的修饰确实降低靶向分子的靶向结合能力. 随着 PEG 链的延长, PEG 链对靶向分子的遮蔽能力也进一步增强, 从而进一步降低靶向分子的靶向结合能力. 因此, 在进行聚阳离子基因输送系统的设计时, 要充分考虑 PEG 修饰对靶向分子的影响, 并建立

分析体系对该影响进行评估. 本文建立的方法有助于进一步改善聚阳离子基因输送系统的设计, 同时也对其他基因药物输送系统的设计起到重要的参考作用.

参 考 文 献

- 郭妍, 顾健人, 徐宇虹. 阳离子聚合物在体内基因治疗中的应用. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2004, **11** (4): 235~238
Guo Y, Gu J R, Xu Y H. Chin J Cancer Biotherapy, 2004, **11** (4): 235~238
- Kursa M, Walker G F, Roessler V, *et al.* Novel shielded transferrin-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes for systemic tumor-targeted gene transfer. Bioconjug Chem, 2003, **14** (1): 222~231
- Kirchheis R, Blessing T, Brunner S, *et al.* Tumor targeting with surface-shielded ligand-polycation DNA complexes. J Control Release, 2001, **72** (1~3): 165~170
- Lee H, Jeong J H, Park T G. PEG grafted polylysine with fusogenic peptide for gene delivery: high transfection efficiency with low cytotoxicity. J Control Release, 2002, **79** (1~3): 283~291
- Lee H, Kim T H, Park T G. A receptor-mediated gene delivery system using streptavidin and biotin-derivatized, pegylated epidermal growth factor. J Control Release, 2002, **83** (1): 109~119
- Lee H, Jeong J H, Park T G. A new gene delivery formulation of polyethylenimine/DNA complexes coated with PEG conjugated fusogenic peptide. J Control Release, 2001, **76** (1~2): 183~192
- Guo Y, Sun Y, Li G, *et al.* The molecular structure of poly(ethylene glycol)-modified nonviral gene delivery polyplexes. Molecular Pharmaceutics, 2004, **1** (6): 477~482
- Nah J W, Yu L, Han S O, *et al.* Artery wall binding peptide-poly (ethylene glycol)-grafted-poly (L-lysine)-based gene delivery to artery wall cells. J Control Release, 2002, **78** (1~3): 273~284
- Woodle M C, Scaria P, Ganesh S, *et al.* Sterically stabilized polyplex: ligand-mediated activity. J Control Release, 2001, **74** (1~3): 309~311
- Blessing T, Kursa M, Holzhauser R, *et al.* Different strategies for formation of pegylated EGF-conjugated PEI/DNA complexes for targeted gene delivery. Bioconjug Chem, 2001, **12** (4): 529~537
- Ogris M, Steinlein P, Carotta S, *et al.* DNA/polyethylenimine transfection particles: influence of ligands, polymer size, and PEGylation on internalization and gene expression. AAPS PharmSci, 2001, **3** (3): E21
- Ogris M, Brunner S, Schuller S, *et al.* PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. Gene Ther, 1999, **6** (4): 595~605
- Fivash M, Towler E M, Fisher R J. BIAcore for macromolecular interaction. Curr Opin Biotechnol, 1998, **9** (1): 97~101
- Malmqvist M. BIAcore: an affinity biosensor system for characterization of biomolecular interactions. Biochem Soc Trans, 1999, **27** (2): 335~340
- Zhou M, Felder S, Rubinstein M, *et al.* Real-time measurements of kinetics of EGF binding to soluble EGF receptor monomers and dimers support the dimerization model for receptor activation. Biochemistry, 1993, **32** (32): 8193~8198
- Elleman T C, Domagala T, McKern N M, *et al.* Identification of a determinant of epidermal growth factor receptor ligand-binding specificity using a truncated, high-affinity form of the ectodomain. Biochemistry, 2001, **40** (30): 8930~8939
- Hoyt D W, Harkins R N, Debanne M T, *et al.* Interaction of transforming growth factor alpha with the epidermal growth factor receptor: binding kinetics and differential mobility within the bound TGF-alpha. Biochemistry, 1994, **33** (51): 15283~15292
- Wolschek M F, Thallinger C, Kursa M, *et al.* Specific systemic nonviral gene delivery to human hepatocellular carcinoma xenografts in SCID mice. Hepatology, 2002, **36** (5): 1106~1114

The Influence of PEG Modification on EGF-PLL Binding Capacities to EGFR*

GUO Yan^{1,2)}, GU Jian-Ren²⁾, XU Yu-Hong^{2,3)**}

⁽¹⁾School of Life Science and Technology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China;

⁽²⁾State Key Laboratory for Oncogenes & Related Genes, Cancer Institute, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200032, China;

⁽³⁾School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China)

Abstract Cationic polymers are being developed quickly as gene delivery vectors. For *in vivo* gene delivery, the cationic polymers are usually further modified by hydrophilic polymer grafting or ligand conjugation, which have been shown to increase the vector stability, gene delivery efficiency and specificity greatly. Some previous research had shown that modified hydrophilic polymer may partly shield the targeting ligand and result in poor delivery specificity. Developing a method to evaluate the influence of PEG modification on targeting delivery is particularly critical to cationic polymer design and gene therapy development. One of most commonly used cationic polymer polylysine (PLL) was chosen as a model. Targeting ligand epidermal growth factor(EGF)was conjugated with PLL to form PLL-EGF. Then hydrophilic polymer polyethylene glycol (PEG) with molecular mass 7 000 and 20 000 were used to modify PLL-EGF respectively to generate PEG₇₀₀₀-g-PLL-EGF and PEG₂₀₀₀₀-g-PLL-EGF. In BIAcore experiments, epidermal growth factor receptor (EGFR) was conjugated onto BIAcore chip and various PEG modified PLL-EGF solutions were flowed over the chip. By observing the change of RU value, the specific interaction of EGF to EGFR was compared. Compared with PLL-EGF, PEG modified PLL-EGF showed lower association rate and higher disassociation rate to EGFR. Furthermore, compared to PEG₇₀₀₀ modified PLL-EGF, PEG₂₀₀₀₀ modified PLL-EGF got lower association rate and higher disassociation rate to EGFR. The Scatchard analysis results showed that the interactions between EGFR and PLL-EGF or PEG-PLL-EGF are non-linear. It can be concluded that PEG modification indeed reduced the association rate and enhanced the dissociation rate of EGF to EGFR. The length of PEG chain was also a key factor to influence interaction between ligand and receptor. The results showed that it was critical important to evaluate the influence of PEG modification on delivery specificities. The BIAcore method developed in this paper can successfully evaluate the influence, which would be important for cationic polymer design and its application as potential non-viral gene delivery vectors.

Key words polycation gene delivery system, polyethylene glycol (PEG), epidermal growth factor(EGF),BIAcore, polylysine(PLL)

*This work was supported by grants from a Fok Ying Tong Education Foundation grant (91035) and Shanghai Jiaotong University Youth Grant.

**Corresponding author . Tel/Fax: 86-21-34204739, E-mail: yhxu@sjtu.edu.cn

Received: November 7, 2006 Accepted: December 31, 2006