

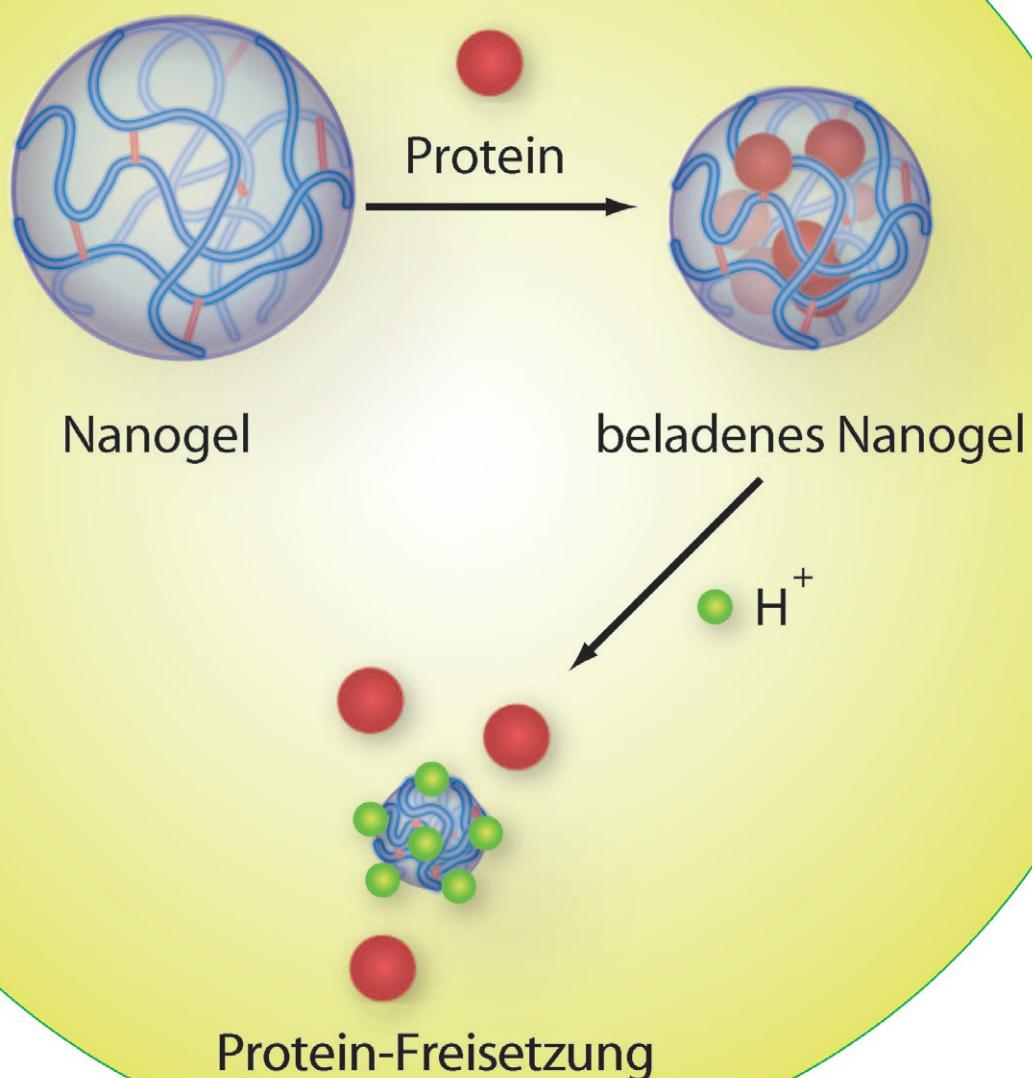
# Nanogele als pharmazeutische Trägersysteme: winzige Netzwerke mit großen Möglichkeiten

Alexander V. Kabanov\* und Serguei V. Vinogradov

**Stichwörter:**

Nanogele · Polyelektrolyte ·  
Polymere · Polynukleotide ·  
Wirkstofftransport

*In memoriam Viktor A. Kabanov (1934–2006)*



**A**ls Nanogele bezeichnet man gequollene Netzwerke aus hydrophilen oder amphiphilen Polymeren in der Größenordnung von einigen Dutzend bis Hundert Nanometern. Sie wurden als Trägersysteme für den Transport von Wirkstoffen entwickelt. Durch gezieltes Design können biologisch aktive Moleküle spontan eingebunden werden, sei es mithilfe von Salzbrücken, Wasserstoffbrücken oder hydrophoben Wechselwirkungen. Polyelektrolyt-Nanogele sind in der Lage, gegensätzlich geladene niedermolekulare Wirkstoffe und Biomakromoleküle wie Oligo- und Polynukleotide (siRNA, DNS) sowie Proteine aufzunehmen. Die Gastmoleküle wechselwirken elektrostatisch mit den ionischen Polymerketten des Gels und werden dadurch in den winzigen Nanogelen gebunden. Zahlreiche chemische Funktionalitäten stehen zur Verfügung, um Gruppen für Bildgebungsverfahren und den gezielten Wirkstofftransport im Nanogel einzuführen. Letzteres kann z. B. durch abbaubare oder schaltbare Vernetzungen erreicht werden. Aktuelle Arbeiten zeichnen eine aussichtsreiche Zukunft für biomedizinische Anwendungen von Nanogelen.

## 1. Einleitung

Der Begriff „Nanogel“ definiert im Allgemeinen wässrige Dispersionen von Hydrogelpartikeln auf der Nanometerskala, die durch physikalische oder chemische Vernetzung von Polymeren entstehen. Wir haben diesen Begriff eingeführt, um gequollene, chemisch vernetzte Strukturen aus kationischen und neutralen Polymeren wie das verzweigte PEG-*cl*-PEI aus Polyethylenimin (PEI) und Poly(ethylenglycol) (PEG), ursprünglich entwickelt für den Transport von Antisense-Oligonukleotiden, zu definieren.<sup>[1,2]</sup> Bereits zuvor beschrieb die Gruppe um Sunamoto das Phänomen der physikalischen Vernetzung (Selbstorganisation) von Cholesterin-modifizierten Polysacchariden (z. B. Pullulan, Mannan, Amylopectin und Dextran), die zur Bildung gequoller Hydrogele mit Größen im Nanometerbereich führte.<sup>[3]</sup> Bezuglich der Beschreibung solcher Systeme sei hier auf eine kürzlich veröffentlichte Übersicht verwiesen.<sup>[4]</sup> Technisch gesehen, handelt es sich hierbei auch um Nanogele.

Nanogele sind wegen ihrer hohen Beladungskapazität, guten Stabilität und ihrer Empfindlichkeit für äußere Faktoren wie Ionenstärke, pH-Wert und Temperatur vielversprechende Trägersysteme. Diese Kombination an Eigenschaften der Nanogele wird derzeit von keinem anderen pharmazeutischen (Nano-)Trägersystem erreicht. Seit der ersten Übersicht zur Synthese und Anwendung von Nanogelen aus dem Jahr 2002 haben diese Materialien auf dem Gebiet des Transports von Wirkstoffen und Diagnostika zunehmend Beachtung gefunden.<sup>[5]</sup> Der vorliegende Aufsatz soll nun einen aktuellen Überblick über pharmazeutische Anwendungen der Nanogele geben und deren Potenzial aufzeigen. Kürzlich erschienene Übersichten über die Synthese und Anwendung von Nanogelen liefern weiterführende Informationen.<sup>[6,7]</sup>

Gequollene und unbeladene Nanogele enthalten einen erheblichen Anteil Wasser. Bei der Aufnahme von Wirk-

## Aus dem Inhalt

<b>1. Einleitung</b>	5525
<b>2. Herstellung von Nanogelen</b>	5526
<b>3. Chemische Modifizierung von Nanogelen für den zielgerichteten Wirkstofftransport</b>	5529
<b>4. Quellung: die wichtigste Eigenschaft der Nanogele</b>	5530
<b>5. Beladen von Nanogelen mit Wirkstoffen und deren Freisetzung</b>	5531
<b>6. Therapie mit Nanogelen</b>	5533
<b>7. Biomakromoleküle in Nanogelen</b>	5533
<b>8. Zusammenfassung</b>	5534

stoffen entstehen in der Regel spontan Wasserstoffbrücken, elektrostatische und/oder Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen Polymermatrix und der Fracht. Durch den resultierenden Kollaps des Gels bilden sich stabile Nanopartikel, in denen der Wirkstoff eingeschlossen wird. Die Aggregation der Nanopartikel kann durch Einführung von dispergierten, hydrophilen Polymeren wie Poly(ethylenglycol) (PEG) in die Struktur verhindert werden. Während des Kollaps der Wirkstoff-Nanogel-Komplexe werden solche hydrophilen Polymere an der Oberfläche exponiert, sodass sich eine schützende hydrophile Schicht um das Nanogel bildet, die eine makroskopische Phasentrennung verhindert. Funktionelle Gruppen an der Nanogeloberfläche können außerdem mit verschiedenen Strukturen für den ortsspezifischen Wirkstofftransport im Körper modifiziert werden. Für eine Reihe von Nanogelen konnte ein Transport der Fracht in die Zelle und durch biologische Barrieren hindurch nachgewiesen werden. Diese Nanogele sind hoch stabil und bewahren biologische Wirkstoffe vor dem metabolischen Abbau in der Zelle. Im Allgemeinen weisen Nanogele ein großes Potenzial

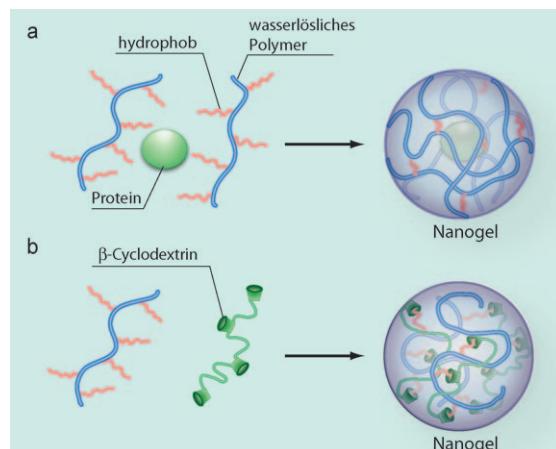
[\*] Prof. Dr. A. V. Kabanov, Prof. Dr. S. V. Vinogradov  
Center for Drug Delivery and Nanomedicine and  
Department of Pharmaceutical Sciences  
College of Pharmacy, University of Nebraska Medical Center  
986025 Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198-5830 (USA)  
Fax: (+1) 402-559-9365  
E-Mail: akabanov@unmc.edu  
Homepage: <http://nanomedicine.unmc.edu>  
Prof. Dr. A. V. Kabanov  
Fakultät für Chemie  
Moskauer Staatliche Lomonossov-Universität  
119899 Moskau (Russland)

für den systemischen Wirkstofftransport auf und verbessern die orale und cerebrale Bioverfügbarkeit von niedermolekularen Wirkstoffen und Biomakromolekülen.

## 2. Herstellung von Nanogelen

Aktuelle Methoden zur Herstellung von Nanogelen umfassen 1) physikalische Selbstorganisation von wechselwirkenden Polymeren, 2) Polymerisation von Monomeren in homogener Phase oder in mikro- oder nanoskaliger heterogener Umgebung, 3) kovalente Vernetzung von Polymeren und 4) Herstellung von Nanogelteilchen mithilfe geeigneter Template. Diese Varianten sind in den Abbildungen 1–4 gezeigt und werden im Folgenden beschrieben.

Die physikalische Selbstorganisation von Polymeren wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen eingesetzt, um eine Reihe von Nanogelen herzustellen. Bei dieser Methode wird gewöhnlich die kontrollierte Aggregation von hydrophilen Polymeren genutzt, die zu hydrophoben oder elektrostatischen Wechselwirkungen und/oder zur Bildung von intermolekularen Wasserstoffbrücken fähig sind. Der Aufbau der Nanogele erfolgt unter milden Bedingungen und im wässrigen Medium. Zur Selbstorganisation befähigte hydrophile Polymere ermöglichen die Verkapselung von Biomakromolekülen und werden zur Herstellung mit Protein beladener Nanogele genutzt. Akiyoshi et al. gewannen zum Beispiel Hydrogеле durch hydrophobe Aggregation von Cholesterin-modifiziertem Pullulan in Gegenwart von Insulin (Abbildung 1a).<sup>[8]</sup> Nur bei einem eng begrenzten Cholesterin-Zuckereinheiten-Verhältnis von 1:40–1:100 bildeten sich Nanogele mit 20–30 nm Durchmesser und bis zu fünf Insulinmolekülen pro Partikel. Die Größe von selbstorganisierten Nanogelen kann durch geeignete Wahl der Polymerkonzentration sowie von Parametern wie dem pH-Wert, der Ionenstärke und der Temperatur gesteuert werden. So erhielten Yu et al. Proteinnanogele durch temperaturinduzierte Gelierung von entgegengesetzt geladenen Proteinen wie Ovalbumin und Lysozym oder Ovotransferrin.<sup>[9]</sup> In ähnlicher Weise wurden Nanogele durch pH- und temperaturinduzierte Gelbildung von Chitosan mit Ovalbumin erhalten.<sup>[10]</sup> Eine Arbeit von Gref et al. beschreibt die Selbstorganisation von verschiedenen großen Nanogelen durch Aggregation von laurylmodifiziertem Dextran und β-Cyclodextrin-haltigem Po-



**Abbildung 1.** Physikalische Selbstorganisation von Nanogelen im wässrigen Medium. a) Die Aggregation des hydrophob modifizierten Polymers Cholesterin-Pullulan in Gegenwart von Insulinmolekülen führt zu deren Aufnahme in das Nanogel. b) Wirt-Gast-Wechselwirkung zwischen den Lauryl- und β-Cyclodextrinringgruppen sorgen dafür, dass beim Vermischen von laurylmodifiziertem Dextran und β-Cyclodextrin-modifiziertem Polymer Nanogele gebildet werden.

lymer im wässrigen Medium (Abbildung 1b).<sup>[11]</sup> Gele mit einer Größe von 120–150 nm wurden durch Variation der Konzentration der beiden Polymere über einen weiten Bereich erhalten. Die stabilen Nanogele konnten gefrierge-trocknet werden, was ihre Langzeitlagerung deutlich vereinfachte.

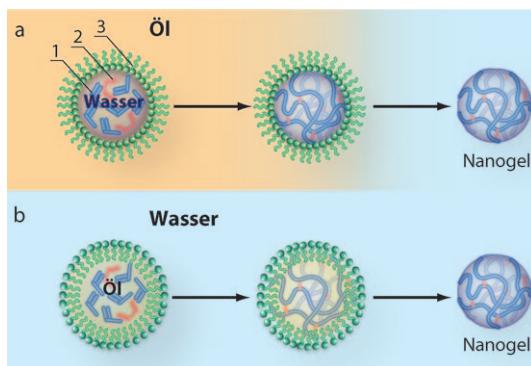
Die chemische Synthese in heterogener kolloidaler Umgebung eröffnet viele Möglichkeiten, um die Struktur und die Eigenschaften von Nanogelen zu variieren. Einige Arbeiten nutzten inverse Wasser-Öl-Mikroemulsionen (W/O) als Medium für die Herstellung von stabilen Polymernetzwerken auf Nanometerskala durch eine Copolymerisation, bei der difunktionelle Monomere als Vernetzer zugegeben wurden (Abbildung 2a). Speiser et al. beschrieben erste Arbeiten zur Polymerisation in inversen Micellen.<sup>[12]</sup> Dieser Ansatz wurde von Levashov und Kollegen durch die kovalente Immobilisierung von Enzymen in Nanogranulaten aus Acrylamid-(*N,N*-Methylenbisacrylamid)-Copolymeren erweitert.<sup>[13]</sup> Schließlich synthetisierten DeSimone et al. kationische PAETMAC-Nanogele durch Copolymerization von 2-Acryloxyethyltrimethylammoniumchlorid und 2-Hydroxy-



Alexander Kabanov promovierte 1987 über chemische Kinetik und Katalyse an der Lomonossov-Universität in Moskau (UdSSR) und habilitierte dort 1990 im Bereich Biochemie. Er begann anschließend mit Studien über die Verwendung von Polymernmicellen, DNS-Polykation-Komplexen und anderen polymeren Systemen auf Nanometerebene für die Formulierung von niedermolekularen Wirkstoffen und Biomakromolekülen. Nach seinem Umzug in die USA 1994 nahm er einen Ruf an die Fakultät für Pharmazie des University of Nebraska Medical Center (UNMC) an, wo er nun Parke-Davis-Professor für Pharmazie und Direktor des Center for Drug Delivery and Nanomedicine ist.



Serguei Vinogradov promovierte 1979 über Naturstoffchemie am Shemyakin-Institut für bioorganische Chemie der Russischen Akademie der Wissenschaften. Nach dem Niedergang der UDSSR setzte er seine Studien mit C. Helene, CNRS-Labor für Biophysik in Paris, N. Thuong, Zentrum für molekulare Biophysik in Orleans (Frankreich), und A. Kabanov fort. Er hat nun eine Forschungsprofessur an der Fakultät für Pharmazie der UNMC und am Center for Drug Delivery and Nanomedicine inne. Seine Forschungsinteressen umfassen Nanogele als Trägersysteme für Nucleotidtherapeutika, chemische Methoden für die Biokonjugation sowie neuartige Therapieansätze.



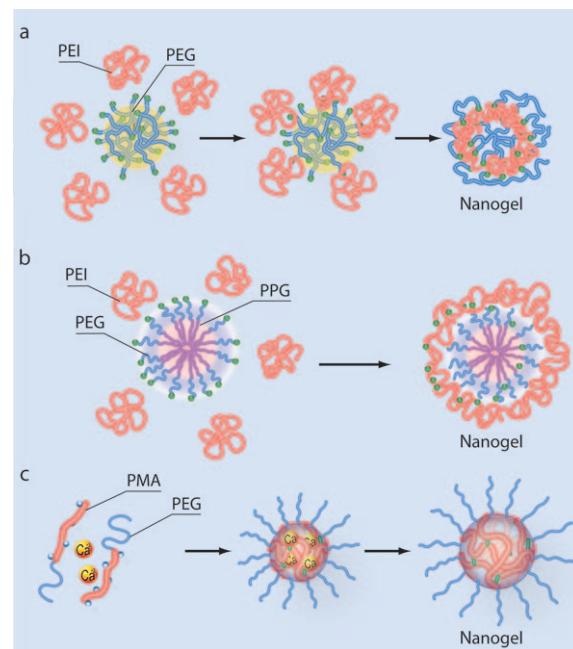
**Abbildung 2.** Chemische Synthese von Nanogelen durch Copolymerisation in einem Kolloid. a) Herstellung von Nanogelen durch Copolymerisation von Monomeren (1) und difunktionellen Vernetzern (2) in Tensid(3)-stabilisierten W/O-Mikroemulsionen, die durch Entfernen der Tenside und des organischen Lösungsmittels in wässrige Medien überführt werden können. b) Copolymerisationen können ebenfalls in O/W-Emulsionen, die auch durch Tenside stabilisiert werden können, ausgeführt werden.

ethylacrylat mit PEG-bisacrylat als Vernetzer in inversen Mikroemulsionen.<sup>[14,15]</sup> Anionische Nanogele mit hydrodynamischen Partikeldurchmessern von nur 50 nm sind zugänglich durch Copolymerisation von Poly(dimethylacrylamid-co-2-acrylamido-2-methyl-1-propansulfonsäure) und *N,N*-Methylenbisacrylamid in inversen Mikroemulsionen.<sup>[16]</sup>

Während der Polymerisation eingebrachte labile Vernetzer werden regelmäßig genutzt, um die Abbaubarkeit der Nanogele zu gewährleisten und die Freisetzung des Wirkstoffs zu erleichtern. So haben Fréchet und Kollegen durch radikalische Polymerisation mit säurelabilen, acetalhaltigen Vernetzern in inversen Emulsionen Nanogele auf Acrylamidbasis für den Protein-, Antigen- und DNS-Transport erhalten.<sup>[17]</sup> Die Acetalgruppe ist bei pH 7 stabil ( $t_{1/2} = 24$  h), während sie bei endosomalem pH-Wert rasch hydrolysiert wird ( $t_{1/2} = 5$  min). Dieser Prozess resultiert in der Zersetzung des Nanogels und der Freisetzung der Fracht.<sup>[18,19]</sup> Die Gruppe um Matyjaszewski nutzte die radikalische Atomtransferpolymerisation (ATRP) für die Synthese von stabilen vernetzten Nanogelen aus wasserlöslichen Polymeren.<sup>[20]</sup> Mithilfe eines disulfidhaltigen Vernetzers konnten biologisch abbaubare Nanogele aufgebaut werden. Disulfidbrücken sind stabil im extrazellulären Medium, werden jedoch nach Aufnahme in die Zelle infolge der hohen Glutathionkonzentration rasch gespalten. Dies sollte zu einer beschleunigten Freisetzung von Wirkstoffen führen. Matyjaszewski und Kataoka haben diesen Ansatz weiter ausgebaut, um biologisch abbaubare und vernetzte Nanogele auf der Basis von Poly[oligo(ethylenoxid)-methylmethacrylat] zu erhalten.<sup>[21]</sup>

Polymerisationen, die zu Nanogelen führen, können auch in Öl-Wasser-Emulsionen (O/W) oder wässrigen Suspensions ausgeführt werden (Abbildung 2b). Des Weiteren kann in homogener wässriger Lösung eine Fällungspolymerisation initiiert werden, sodass eine kolloidale Suspension des Polymers erhalten wird. Auf diese Weise wurde von Peppas et al. eine Suspension von Nanokugeln aus einem Ppropfcopolymer von Poly(methacrylsäure) (PMA) und PEG synthetisiert.<sup>[22]</sup>

Neben diesen Polymerisationsmethoden kann das nachträgliche Vernetzen von Polymeren eine ausgezeichnete Möglichkeit zur Synthese von großporigen Nanogelen sein.<sup>[23]</sup> Diese weitverbreitete Variante wurde zur Herstellung einer Reihe von funktionellen Nanogelen für den Wirkstofftransport genutzt. Insbesondere wurde auf diese Weise das erste kationische vernetzte Nanogel synthetisiert, das als Polynucleotid-Träger genutzt werden konnte.<sup>[1]</sup> Durch ein zweifach aktiviertes PEG wurde verzweigtes PEI in einer O/W-Emulsion (Dichlormethan in Wasser) vernetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und Reifung der Partikel in wässriger Lösung wurden so Nanogele erhalten (Abbildung 3a). Kationische Nanogele auf PEI-Basis mit Größen



**Abbildung 3.** Synthese von Nanogelen durch Vernetzung von bereits existierenden Polymerketten oder selbstorganisierenden Polymeraggregaten. a) Vernetzung von PEI und PEG mit zwei reaktiven Termini in O/W-Emulsion, gefolgt von Entfernung des organischen Lösungsmittels. b) Die Konjugation von PEI mit Pluronic-Blockcopolymer (PEG-b-PPG-b-PEG) mit zwei reaktiven Termini, das in wässriger Lösung Polymermicellen bildet, resultiert in Nanogelen mit hydrophoben PPG-Domänen und vernetzten hydrophilien PEI-PEG-Bereichen. c) Das Di-blockcopolymer PEG-b-PMA wird in Gegenwart von zweiwertigen Metallkationen in wässriger Lösung zu einer Micelle mit einem Polyionen-Metallionen-Kern und einer PEG-Hülle kondensiert. Durch anschließende Vernetzung des Micellkerns und Entfernen der Metallkationen entsteht ein Nanogel mit einem vernetzten Polyelektrolytkern (PMA) und einer PEG-Hülle.

von 80–200 nm wurden auch durch eine photochemische Fenton-Reaktion in wässrigem Medium synthetisiert.<sup>[24,25]</sup> Nur 40–45 nm große, nichttoxische vernetzte Pullulan-Nanogele wurden in einem invers-micellaren System (Aerosol OT/Hexan) hergestellt.<sup>[26,27]</sup> Wie im Fall der Polymerisationsvernetzung kann die Vernetzung in solchen Nanogelen derart gestaltet werden, dass die Produkte abbaubar sind. So konnte für den Polynucleotidtransport mit segmentiertem, disulfidvernetztem PEI ein kationisches Nanogel mit ver-

minderer Toxizität erhalten werden.<sup>[28,29]</sup> In einer anderen Arbeit wurden inverse W/O-Emulsionen zur Herstellung von disulfidvernetzten Nanogelen auf Hyaluronsäure(HA)-Basis verwendet.<sup>[30]</sup> Eine interessante Variante von DNS enthaltenden, vernetzten Nanogelen ist die Herstellung von 100 nm kleinen Partikeln durch Mischen von thiolfunktionalisiertem sternförmigem PEG und DNS in Dimethylsulfoxid. Diese Partikel konnten anschließend oxidativ vernetzt werden, wodurch biologisch abbaubare DNS-Nanogele erhalten wurden.<sup>[31]</sup>

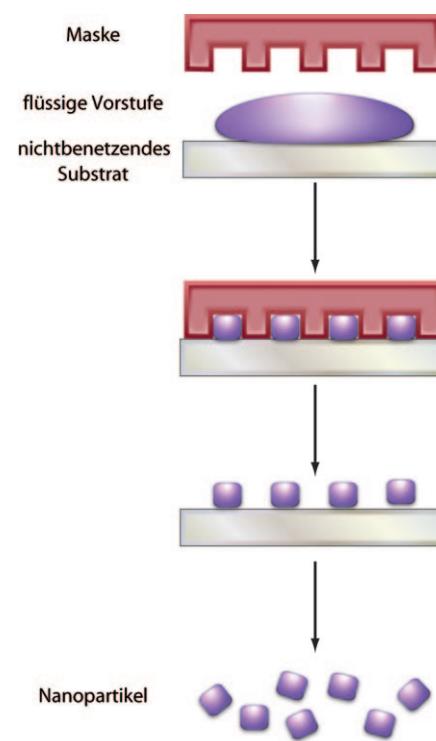
Neue Möglichkeiten, die räumliche Anordnung von Polymerketten auf Nanometerebene zu steuern, ergaben sich durch die Kombination aus der Selbstorganisation von Polymericellen und deren Vernetzung. Beispielsweise erhielten Wooley et al. Nanopartikel, indem sie die Hülle der Polymericellen vernetzten.<sup>[32–37]</sup> Durch die Variation des Lösungsmittels und der organischen Gegenionen konnten vernetzte Nanopartikel mit unterschiedlicher Morphologie erhalten werden, darunter kugelförmige, stäbchenförmige und toroidale Strukturen.

In einer weiteren Arbeit wurde PEI in wässriger Lösung mit Micellen aus Pluronic-Triblockcopolymer (PEG-*b*-PPG-*b*-PEG) mit zwei aktivierten Endgruppen vernetzt (Abbildung 3b; PPG = Poly(propylenglycol)).<sup>[38]</sup> Das resultierende Nanogel bestand also aus einem hydrophobem PPG-Kern mit einer Korona aus hydrophilem PEG-*cl*-PEI. Lee et al. nutzten Poly(D,L-milchsäure)-*b*-PEG-*b*-poly(D,L-milchsäure)-Tri-blockcopolymere mit Acrylat-Endgruppen zur photochemischen Vernetzung der Polymericellen.<sup>[39]</sup> Die dadurch gebildeten Nanogele enthielten einen hydrophoben Poly(D,L-milchsäure)-Kern, der mit einem hydrophoben Krebstherapeutikum beladen werden konnte.

Bronich und Mitarbeiter erreichten eine einzigartige räumliche Verteilung der Polymerketten in Nanogelen.<sup>[40]</sup> Sie entwickelten ein Verfahren, bei dem Polyelektrolytmicellen zunächst aus doppelt hydrophilen Blockcopolymeren durch Kondensation der ionischen Blöcke mit entgegengesetzt geladenen Ionen hergestellt wurden. Anschließend wurden die ionischen Blöcke im Kern kovalent vernetzt, und die zur ursprünglichen Vernetzung genutzten Ionen wurden entfernt (Abbildung 3c). Die so erhaltenen Nanogelen aus PEG-*b*-PMA-Diblockcopolymeren bestehen aus einer hydrophilen PEG-Hülle und einem vernetzten hydrophilen ionischen PMA-Kern, der in Wasser gequollen vorliegt und hydrophile Pharmaka aufnehmen kann.<sup>[41]</sup> Auf ähnliche Weise wurden durch Kondensieren und Vernetzung von PEG-*g*-Polyacrylsäure (PEG-*g*-PAA) analoge Nanogelen erhalten.<sup>[40]</sup>

Schließlich entwickelten DeSimone et al. eine weitere Methode, die es ermöglicht, einige Dutzend Nanometer bis einige Mikrometer große Polymerpartikel herzustellen, aus denen Nanogelen erhalten werden können.<sup>[42]</sup> Dieses photolithographische Prägeverfahren (Partikel-Replikation in nichtbenetzenen Templayen, PRINT) nutzt nichtbenetzen Elastomermatrizen aus Perfluorpolyether mit geringer Oberflächenenergie, die durch photochemisches Vernetzen von Dimethacrylat-funktionalisierten Perfluorpolyether-Oligomeren auf strukturierten Siliciumwafern zugänglich sind. Die nichtbenetzenen Matrizen verhindern die Bildung von dünnen Filmen zwischen den Formkörpern, sodass mono-

disperse Nanopartikel mit exakt definierter Form aus einer großen Vielfalt an organischen Ausgangsstoffen hergestellt werden können (Abbildung 4). PRINT ermöglicht eine sehr genaue Kontrolle über die Größe, Form, Zusammensetzung



**Abbildung 4.** Bei dem photolithographischen PRINT-Verfahren werden monodisperse Nanopartikel mit exakt definierter Form mithilfe von nichtbenetzenen Perfluorpolyether-Elastomermasken aus zahlreichen organischen Vorstufen hergestellt.

und Oberflächenfunktionalitäten der Partikel sowie das Einbringen von empfindlichen pharmazeutischen Wirkstoffen und Biomakromolekülen. So wurde das PRINT-Verfahren verwendet, um mithilfe von UV-induzierter Copolymerisation aus verschiedenen Vinylmonomeren wie PEG-Triacrylat, PEG-Monomethylethermonomethacrylat und *p*-Hydroxystyrol 200 nm kleine, monodisperse und quellbare Partikel herzustellen.<sup>[43]</sup>

In zahlreichen Arbeiten wurde eine dieser Syntheserouten genutzt, um zu immer ausgeklügelteren Nanogelen zu gelangen. Nanostrukturierte, temperaturempfindliche Hydrogele konnten z. B. durch Immobilisierung eines Netzwerks von Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAAm) an porösem Silicagel und Hydroxyapatit erhalten werden.<sup>[44,45]</sup> Richtering und Mitarbeiter synthetisierten temperaturempfindliche Kern-Schale-Partikel durch schichtweise Abscheidung von Polyelektrolyten auf der Oberfläche von anionischem PNIPAAm-*co*-PMA-Nanogel.<sup>[46,47]</sup> Das sequenzielle Aufbringen von Schichten kann auch genutzt werden, um magnetische Nanopartikel in die Oberfläche von Nanogelen einzubringen.<sup>[48]</sup>

Die Gruppen um Levon und Hennink haben kürzlich eine weitere Art von Hybridnanogelen eingeführt, die mit einer Lipiddoppelschicht umhüllt sind.<sup>[49,50]</sup> Sie beluden Liposomen

mit wasserlöslichen Monomeren, die anschließend photochemisch polymerisiert wurden, um mit vernetztem Polyacrylamid (PAA) gefüllte Liposomen zu erhalten. Yan et al. berichteten über die Herstellung katalytisch aktiver Nanogele durch die Polymerisation von PAA und *N,N*-Methylenbisacrylamid auf der Oberfläche von Meerrettichperoxidase und boviner Carboxyanhydrase.<sup>[51,52]</sup> Beide Enzyme behielten nach der Immobilisierung in den Nanogelpartikeln ihre katalytische Aktivität und wiesen eine hohe thermische Stabilität auf. In anderen Arbeiten berichteten Oishi et al. über die Synthese von PEGylierten Nanogelen mit eingeschlossenen Metallnanopartikeln.<sup>[53,54]</sup> Diese Hybridnanogele, die Platin-Nanopartikel (<2 nm) enthalten, weisen eine pH-abhängige katalytische Aktivität auf und könnten zum Auffangen reaktiver Sauerstoffspezies in biologischen und medizinischen Anwendungen genutzt werden. Analoge Nanogele mit Gold-Nanopartikeln (ca. 6 nm) zeigten eine Verschiebung der Oberflächenplasmonenresonanz(SPR)-Bande in Abhängigkeit vom pH-Wert. Solche Nanogele könnten Anwendung als SPR-Sonde in Sensoren finden. Abschließend wurde die photochemische Polymerisation ohne Emulgatoren in wässriger Lösung auf der Oberfläche von superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln eingesetzt, um superparamagnetische Nanopartikelkomposite zu erhalten,<sup>[55,56]</sup> die zum Beispiel in der Mikrowellen-Ablationstherapie eingesetzt werden könnten.<sup>[57]</sup>

Entwicklungen in der Herstellung von chemisch oder physikalisch vernetzten Nanogelen werden wohl zukünftig von Mikrofluidiktechniken beeinflusst werden, mit deren Hilfe bereits Hydrogele auf Mikrometermaßstab sowie Nanomaterialien unterschiedlicher Größe, Form und Morphologie erhalten wurden.<sup>[58,59]</sup>

### 3. Chemische Modifizierung von Nanogelen für den zielgerichteten Wirkstofftransport

Eine mögliche Verwendung für nanoskalige Trägersysteme ist der gezielte Transport eines Wirkstoffs in erkranktes Gewebe nach systemischer Verabreichung. Hiermit sind eine Reihe entscheidender Fragen verbunden, vor allem 1) zur Opsonisierung und Agglutination durch Wechselwirkung des Nanoträgers mit Serumproteinen, 2) zur Ausscheidung des Nanoträgers durch das retikuloendotheliale System oder die Glomeruli der Niere und 3) zur nichtspezifischen Anreicherung in Organen und Geweben. Um Wechselwirkungen mit Serumproteinen zu vermeiden und eine lange Zirkulation zu ermöglichen, wird die Oberfläche der Nanoträger oft mit inerten hydrophilen Polymeren wie PEG modifiziert.<sup>[60]</sup> Wirkstoffbeladene PEG-*cl*-PEI-Nanogele haben zum Beispiel eine Kern-Schale-Architektur, wobei der Kern von PEG-Ketten umhüllt ist.<sup>[61]</sup> In gleicher Weise können PEG-Ketten während einer Emulsionspolymerisation an PMA-Nanogele gebunden werden.<sup>[62]</sup> Nanogele mit vernetzten Kernen und PEG-Hüllen können auch durch Selbstorganisation von Polyelektrolytmicellen und anschließende Vernetzung des Kerns erhalten werden.<sup>[40]</sup>

Eine aktuelle Untersuchung beschreibt die Pharmakokinetik und Bioverteilung von vernetzten Nanogelzylinern auf

PEG-Basis (ca. 200 nm), die mithilfe der PRINT-Technik erhalten wurden.<sup>[43]</sup> Die Partikel wurden recht schnell aus dem Blut ausgeschieden ( $t_{1/2} = 17$  min) und in der Leber angereichert. Dieses Ergebnis war nicht überraschend, da die Nanogele relativ kurze PEG-Ketten (ca. 1 kDa) aufwiesen, während die optimale Umhüllung von Nanopartikeln für eine lange Zirkulationsdauer im Blut zwischen 2 und 5 kDa PEG betragen sollte.<sup>[63]</sup>

Die „Nanogeloberfläche“ kann mit biologischen Funktionen modifiziert werden, um einen ortsspezifischen Transport der Nanogele im Körper zu erzielen. So haben wir biotinmarkiertes PEG-*cl*-PEI-Nanogel über (Strept-)Avidin mit biotinylierten Liganden (Transferrin oder Insulin) modifiziert.<sup>[64]</sup> Ebenso wurde die Biotingruppe an OH-funktionalisierte Poly[oligo(ethylenoxid)-methylmethacrylat]-Nanogele gebunden.<sup>[21]</sup> Jedoch ist die Biotin-(Strept-)Avidin-Konjugation wegen der biologischen Aktivität von Biotin für praktische Anwendungen ungeeignet. Eine direkte Konjugation der Gruppe für den gezielten Transport an das Nanogel wird deshalb bevorzugt. Nach Aktivierung mit Carbodiimid wurden zum Beispiel 1–5 % der primären Aminogruppen eines PEG-*cl*-PEI-Nanogels mit Folsäure modifiziert.<sup>[61]</sup> Die resultierenden folatmodifizierten Nanogele wiesen einen deutlich verbesserten Transport durch polarisierte Caco-2-Zellmonoschichten auf, die als In-vitro-Modell des Magen-Darm-Epithels dienten. In anderen Arbeiten zeigten folatmodifizierte Polymethacrylat-Mikrogele eine erhöhte und selektive Aufnahme in Tumorzellen, die den Folatrezeptor (FR) überexprimierten.<sup>[65]</sup> Um die Zugänglichkeit des FR für die Folatmoleküle zu gewährleisten, empfehlen verschiedene Autoren die Insertion eines Polymerlinkers (z.B. aus PEG) zwischen der Folatgruppe und dem Wirkstoffträger.<sup>[66]</sup> So wurden die terminalen Aminogruppen von PEG in einem Poly(aminoPEG-cyanacrylat-*co*-hexadecylcyanacrylat)-Nanogel mit Folsäure modifiziert.<sup>[67]</sup> Diese folatmodifizierten Nanogele wiesen ebenfalls eine gesteigerte Anreicherung in FR-überexprimierenden Krebszellen auf.

Nanogele wurden auch mit humanem Transferrin (hTf), einem Protein, das in Tumoren angereichert wird, verknüpft.<sup>[68]</sup> Hier wurden die Aminogruppen von hTf zuerst mit dem heterodifunktionellen Reagens Sulfosuccinimidyl-4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat in wässrigem Medium zu einem hTF-Maleimid-Derivat umgesetzt. Durch Reaktion mit 2-Iminothiolan (Traut-Reagens) wurden in einem zweiten Schritt Thiolgruppen in das PEG-*cl*-PEI-Nanogel eingeführt. Die abschließende Reaktion zwischen Maleimid-hTf und den Thiolgruppen des Nanogels führte zur Bildung eines hTf-modifizierten Nanogels mit einer einstellbaren Zahl an hTf-Molekülen pro Partikel (4 bis 12). Aufgrund seiner Größe wird konjugiertes hTf an der Nanogeloberfläche exponiert, was die Wechselwirkung mit zellulären Transferrin-Rezeptoren erleichtert.

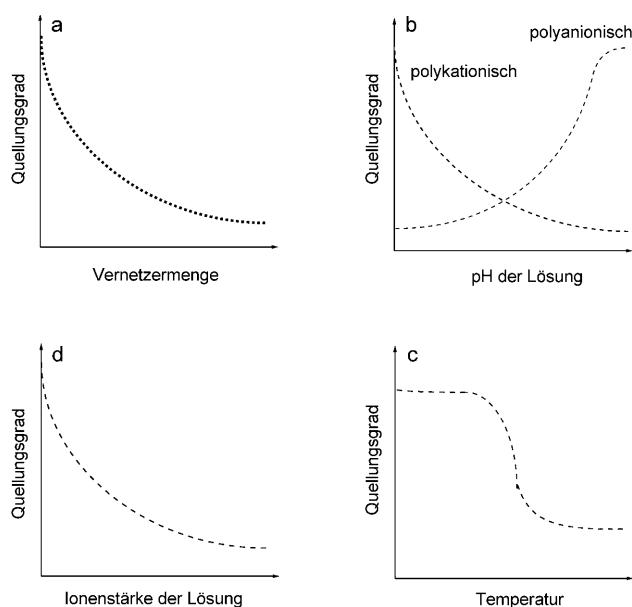
Zusätzlich können Peptidliganden über difunktionelle PEG-Linker an das Nanogel gebunden werden.<sup>[28]</sup> Beispielsweise wurde ein Peptid mit terminalem Cysteinrest mit einem Maleimid-PEG-*N*-hydroxysuccinimid-Linker verknüpft. Das Produkt wurde anschließend über die Aminogruppen mit PEI verbunden, sodass ein Nanogel mit einstellbarer Peptiddichte erhalten werden konnte. Des Weiteren wurde ein Mono-*N*-

acetylcystamin-PEG-Linker nach Aktivierung durch 1,1'-Carbonyldiimidazol in das Nanogel eingeführt. Die Thiolgruppen des Nanogels wurden mithilfe von Dithiothreitol freigesetzt und mit thiolspezifischen Derivaten (z.B. Maleimid-Derivaten) zur Reaktion gebracht, sodass Protein/Peptid-modifizierte Nanogele erhalten wurden.<sup>[69]</sup>

Zusammengefasst lässt sich die Oberfläche von Nanogelen mit den verschiedensten Funktionalitäten zum gezielten Transport modifizieren. Erste Ergebnisse deuten an, dass diese Methoden für den Transport von Nanogelen zu ausgewählten Zellrezeptoren verwendet werden können.

## 4. Quellung: die wichtigste Eigenschaft der Nanogele

Nanogele sind weiche Nanomaterialien. Die Quellung der Nanogele in wässriger Umgebung wird beeinflusst durch 1) deren Aufbau (chemische Struktur des Polymers, Vernetzungsgrad, Ladungsdichte in Polyelektrolytgele), und 2) Umgebungsparameter wie pH-Wert, Ionenstärke und Struktur der niedermolekularen Gegenionen für Polyelektrolytgele sowie die Temperatur bei temperaturabhängigen Gelen (Abbildung 5). Die Größe von Hydrogelpartikeln wird



**Abbildung 5.** Faktoren, die das Quellen von Nanogelen beeinflussen. a) Eine Erhöhung des Vernetzungsgrads reduziert das Quellen eines aus hydrophilem Polymer bestehenden Nanogels. b) Mit steigendem pH-Wert kollabieren Gele mit schwach basischen Gruppen, während solche mit sauren Gruppen quellen. c) Eine Steigerung der Ionenstärke vermindert das Quellen von Nanogelen aus Polyelektrolyten. d) Nanogele aus Polymeren mit einer unteren kritischen Entmischungstemperatur (LCST) kollabieren, sobald die Temperatur die LCST überschreitet.

durch das Gleichgewicht zwischen osmotischem Druck und Elastizität der Polymere bestimmt.<sup>[70]</sup> Bei Hydrogelen aus Polyelektrolyten ergibt sich der osmotische Druck aus der Differenz der Konzentrationen der Ionen innerhalb des

Gelpartikels und in dessen Umgebung. Die ionisierten Gruppen ziehen hydratisierte Gegenionen an. Dies begünstigt die Quellung des Gels, während die Entropieelastizität der Polymerketten sich der Quellung entgegensetzt. Für schwache Polyelektrolytgele hängt die Ionisierung vom pH-Wert ab. Eine Reduzierung der Zahl an Gegenionen und der Gesamtladung durch pH-Änderungen führt zur Schrumpfung der Gele, weil der osmotische Druck abnimmt; dabei kann die Schrumpfung nur bis zum Ausschlussvolumen der Polymerketten erfolgen. Vernetzte PEG-*b*-PMA-Nanogele schrumpfen zum Beispiel bei einer Senkung des pH-Werts von 9 auf 5 infolge der Protonierung der Carboxylatgruppen von PMA.<sup>[41]</sup> PEG-*cl*-PEI-Nanogele schrumpfen dagegen bei Erhöhung des pH-Werts von 8.5 auf 10 durch Deprotonierung der Ammoniumgruppen von PEI.<sup>[71]</sup>

Das Quellen von Hydrogelen aus Polyelektrolyten hängt auch von der Ionenstärke ab. So wird bei kationischen PAETMAC-Nanogelen das Quellen bei hoher Ionenstärke durch die Vernetzerkonzentration gesteuert, während es bei niedriger Ionenstärke sowohl durch die Vernetzungsdichte als auch durch die Ladungskonzentration beeinflusst wird.<sup>[14]</sup> Generell kann davon ausgegangen werden, dass der Quellungsgrad mit höherer Vernetzung abnimmt.<sup>[14,41]</sup> Dies wurde exemplarisch an vernetzten PEG-*b*-PMA-Nanogelen nachgewiesen.<sup>[32]</sup>

Die Wechselwirkungen des Lösungsmittels mit den Polymerketten von Nanogelen können in bestimmten Fällen eine ausgeprägte Temperaturabhängigkeit aufweisen, was zum Quellen oder zum Kollaps der Gele führen kann. Da zum Beispiel die PPG-Segmente in Pluronic-Polymeren eine untere kritische Entmischungstemperatur (lower critical solution temperature, LCST) haben, sind die entsprechenden Hydrogelen thermisch schaltbar. So quellen etwa 120 nm kleine Nanogelpartikel beim schnellen Abkühlen unter die LCST auf über 400 nm an.<sup>[72]</sup> Die Temperaturabhängigkeit des Quellens wurde auch bei Nanogelen aus *N*-Isopropylacrylamid-Copolymeren (NIPAAm) beschrieben.<sup>[45,73]</sup> Diese Reaktion auf die Umgebung kann auch zur Entwicklung von schaltbaren Wirkstoffträgern genutzt werden. Ein aktuelles Beispiel ist ein mit Phenylboronsäure konjugiertes PNIPAAm-Nanogel, dessen Quellverhalten von der Glucosekonzentration abhängt.<sup>[74]</sup> Einer der Vorteile von feindispersierten Hydrogelen ist die im Allgemeinen sehr schnelle Reaktion auf sich verändernde Umgebungsbedingungen,<sup>[75]</sup> was die Aufnahme und Freigabe von Wirkstoffen für pharmazeutische Anwendungen erleichtert. Dagegen können nichtdispersierte Hydrogelen bis zum Erreichen des Quellengleichgewichts mehrere Tage benötigen. In ausgewählten Fällen kann das Beladen der Hydrogelen mit Wirkstoff zusätzlich zu Volumenschwund führen. Der Grund für dieses Phänomen können elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen und/oder Wasserstoffbrücken sein, die der Wirkstoff mit den Hydrogelketten bildet. Diese Wechselwirkungen reduzieren die „Löslichkeit“ der Hydrogelketten und führen zum Schrumpfen und Kollabieren des Gels. Zusammengefasst sind das Quellen und Kollabieren der Nanogele einzigartige Eigenschaften für die Optimierung der Wirkstoffbeladung und -freigabe (siehe auch Abschnitt 5).

## 5. Beladen von Nanogelen mit Wirkstoffen und deren Freisetzung

Nanogele können biologisch aktive Stoffe durch 1) physikalische Wechselwirkungen, 2) kovalente Konjugation oder 3) Selbstorganisation aufnehmen. Physikalische Wechselwirkungen konnten genutzt werden, um Insulin in Cholesterin-modifizierte Pullulan-Nanogele<sup>[8]</sup> oder siRNA in thiolkonjugierte HA-Nanogele einzubringen.<sup>[30]</sup> Die Wirkstoffbeladung durch physikalische Wechselwirkungen konnte auch bei Dextranen mit Poly-D- und L-milchsäure-Seitenketten durch deren Komplexierung zu monodispersen, biologisch abbaubaren Nanogelpartikel mit durchschnittlichen Durchmessern von 70 nm erreicht werden.<sup>[76]</sup> Hydrophile Dextransketten sind in diesen Nanogelen durch teilweise kristalline, hydrophobe Bereiche aus nichtkovalent gebundenen Komplexen der Polymilchsäure-Stereoisomere verbunden.

In den hydrophoben Domänen der Nanogele können hydrophobe Moleküle eingelagert werden. Zum Beispiel wurde Prostaglandin E2 in einem Nanogel aus Cholesterin-modifiziertem Pullulan gelöst.<sup>[77]</sup> Auch Doxorubicin konnte in amphiphile vernetzte Nanogele aus Pluronic F127 oder Poly[oligo(ethylenoxid)-methylmethacrylat] eingebracht werden.<sup>[21]</sup> Dabei sollte beachtet werden, dass bei der Beladung mithilfe rein hydrophober Wechselwirkungen häufig nur geringe Wirkstoffmengen aufgenommen werden.

Ein Beispiel für die kovalente Anbindung des Wirkstoffs in Nanogelen ist das Einbringen von Cisplatin in PEG-*b*-PMA-Nanoge.<sup>[79,80]</sup> Diese Nanoge bestehen aus einem vernetzten anionischen PMA-Kern und einer nichtionischen PEG-Hülle. In wässriger Umgebung reagiert Cisplatin mit den Carboxylatgruppen im Kern des Gels, was zum Kollaps des beladenen Kerns führt.

Bei einer weiteren Möglichkeit zur Verkapselung wurde das Enzym zunächst mit *N*-Hydroxysuccinimidocrolyat modifiziert. In einem zweiten Schritt wurde dieses modifizierte Enzym durch Polymerisation von Acrylamid in verdünnter wässriger Lösung verkapselt.<sup>[51,52]</sup> Eine Copolymerisation in inverser Mikroemulsion ermöglichte es, modifiziertes  $\alpha$ -Chymotrypsin in PAA-Nanogele einzubringen.<sup>[13]</sup> Solche Nanogele, die kovalent gebundene Proteine enthalten, können die thermische Stabilität und Haltbarkeit ihrer Fracht erhöhen.<sup>[56]</sup>

Durch Selbstorganisation von Polyelektrolytnanogelen mit gegensätzlich geladenen, löslichen Stoffen können Nanogele mit einem sehr hohen Gehalt an biologisch aktivem Wirkstoff erhalten werden. Dieser Mechanismus eignete sich für Kombinationen aus verschiedenen Nanogelen und gegensätzlich geladenen Tensiden, Polyelektrolyten, Polynucleotiden und Proteinen in wässriger Lösung.<sup>[1,69,71,81,82]</sup>

Die Selbstorganisation solcher Materialien zeichnet sich gewöhnlich durch eine hohe Bindungscooperativität und -effizienz aus. Bei der Bindung eines anionischen Tensids wie Natriumtetradecylsulfat mit kationischen PEG-*cl*-PEI-Nanogelen liegt die kritische Assoziationskonzentration (cac) zum Beispiel um zwei Größenordnungen unterhalb der kritischen Micellbildungskonzentration (cmc) des Tensids allein.<sup>[71]</sup> Diese Differenz liegt in der elektrostatischen Wechselwirkung der hydrophilen geladenen Kopfgruppen des

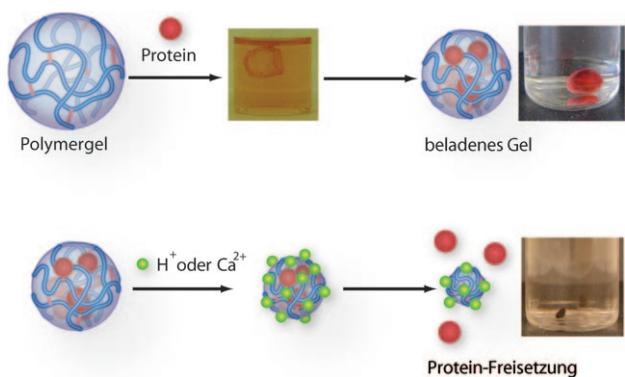
Tensids mit den PEI-Ketten des Nanogels begründet. Gela-dene und amphiphile biologisch aktive Moleküle wie Natri-umoleat, Indometacin oder Retinsäure konnten ebenfalls in PEG-*cl*-PEI-Nanogele eingebracht werden.<sup>[71]</sup> Mit Retinsäure beladene Nanogele bildeten zum Beispiel bei physiologi-schem pH-Wert und physiologischer Ionenstärke stabile Di-spersionen, die gefriergetrocknet, gelagert und wieder gelöst werden konnten. Hydrophobe Domänen, die durch Kom-plexierung von Tensiden in PEG-*cl*-PEI-Nanogelen entste-hen, können außerdem als nichtwässrige Reservoirs für die Solubilisierung von wasserunlöslichen Molekülen dienen. Da die Kombination aus elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen Wirkstoff-Nanogel-Formulierungen sta-bilisiert, können solche Nanogele auch mit nur schwach ge-ladenen Anionen wie 5'-Triphosphaten von Nucleosidanalogia wie Fludarabin, Zidovudin, Cytarabin und Floxuridin effektiv beladen werden.<sup>[29,38,61]</sup>

Hierbei sei auf eine kürzlich erschienene Übersicht be-züglich dieser Art von Nanoformulierung hingewiesen.<sup>[83]</sup> Zusammenfassend bilden Polyelektrolytnanogele eine flexi-ble Plattform für die Beladung mit verschiedensten niedermolekularen Wirkstoffen durch eine Kombination von elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrücken.

Eine der wichtigsten Eigenschaften der nur schwach ver-netzten Polyelektrolytnanogele ist die Möglichkeit auch Biomakromoleküle entgegengesetzter Ladung aufzunehmen. Für gewöhnlich ist die Aufnahme von Biomakromolekülen in Hydrogelen durch das Ausschlussvolumen und die Vernet-zungsdichte sehr beschränkt. Tragen jedoch Biomakromole-kül und Polymernetzwerk gegensätzliche Ladungen, bilden sie bereitwillig Polyelektrolytkomplexe. Können die Bioma-kromoleküle das Nanogel durchdringen, wandert die zu-nächst oberflächlich gebildete Front von ionischen Komple-xen zwischen den Polymerketten in den Kern des Gels.<sup>[84]</sup> Durch diesen Effekt können auch deutlich größere Poly-elektrolytnetzwerke effizient mit Biomakromolekülen bela-den werden (Abbildung 6).<sup>[85]</sup>

Dieses Prinzip wurde genutzt, um Polynucleotide in kationischen Nanogelen zu immobilisieren. Sowohl PEG-*cl*-PEI als auch PAETMAC wurden erfolgreich eingesetzt, um An-tisense-Oligonucleotide aufzunehmen.<sup>[1,14]</sup> Die Zugabe von Oligonucleotiden zu PEG-*cl*-PEI-Nanogeldispersionen führte bei physiologischem pH-Wert zu einer raschen Bildung der Polyelektrolytkomplexe zwischen PEI und den Oligonu-cleotiden. Dieser Vorgang wurde von einer Verringerung des Nanogelvolumens um den Faktor 10 begleitet, weil die La-dungen innerhalb des Netzwerks neutralisiert wurden. Be-merkenswerterweise wurde eine fast vollständige Aufnahme mit einer Beladung von 15 bis 30 Gew.-% des Oligonucleotids in das Nanogel beobachtet. Diese Komplexe waren auch in Gegenwart von negativ geladenen Serumproteinen stabil. Dies wird auf einen ausgeprägteren kooperativen Effekt zwischen den Oligonucleotiden und den Polykationen im Vergleich zur Protein-Oligonucleotid-Wechselwirkung zu-rückgeführt.<sup>[86]</sup>

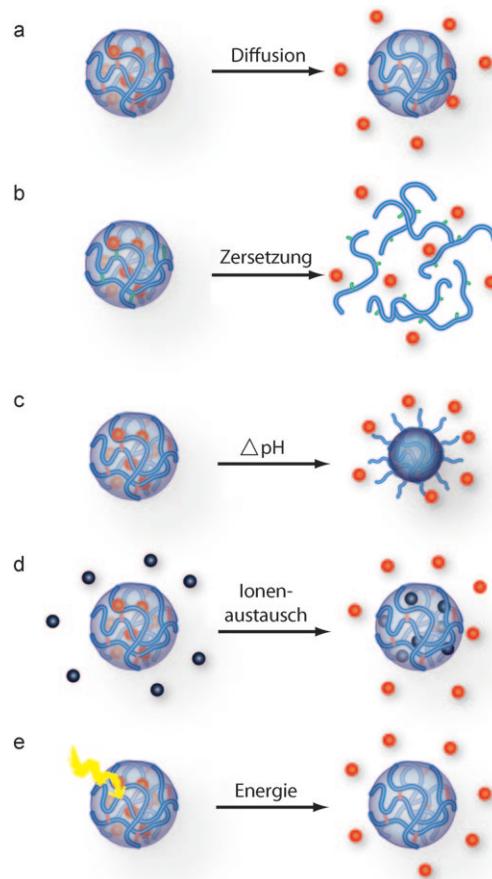
Generell kann mit hydrophilen Nanogelen eine höhere Beladung erwartet werden als mit anderen pharmazeutischen Trägersystemen wie Polymermicellen, Liposomen und biolo-



**Abbildung 6.** Beladung und Freisetzung von Biomakromolekülen in vernetzten Polymerhydrogelen. Ein vernetztes Gel aus neutralen PEG- und anionischen PAA-Polymerketten wird in eine Lösung des kationischen Proteins Cytochrom c eingetaucht. Aufgrund der Coulomb-Wechselwirkung zwischen dem Protein und den PAA-Ketten wird das Gel spontan mit Cytochrom c beladen. Die anfänglich rötliche Farbe der Cytochrom-c-Lösung verblasst nach dessen Aufnahme in das Gel, das seinerseits kollabiert und die rote Farbe annimmt. Beim Ansäuern oder bei der Zugabe von  $Ca^{2+}$ -Ionen wird das Protein durch Protonierung der Carboxylatgruppen der PAA-Ketten bzw. durch die kompetitive Bindung der  $Ca^{2+}$ -Ionen an die Carboxylatgruppen freigesetzt. In beiden Fällen färbt sich die Lösung erneut rot, während das Gel weiter kollabiert.

gisch abbaubaren Nanopartikeln. Der Hauptgrund hierfür liegt darin, dass gequollene Nanogele vor allem aus Wasser bestehen und somit ein größeres Volumen für den einzubringenden gelösten Stoff bereitstellen, was für die Aufnahme von niedermolekularen Wirkstoffen und insbesondere von Biomakromolekülen von Bedeutung ist. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Beladung in der Regel durch Selbstorganisation unter relativ milden Bedingungen geschieht. Dies ist sehr wichtig, um die biologische Aktivität von empfindlichen Wirkstoffen und Biomakromolekülen wie Proteine und Polypeptide zu bewahren.

Diese biologisch aktiven Komponenten können aus dem Nanogel durch 1) einfache Diffusion, 2) Abbau des Nanogels, 3) Veränderung des pH-Werts, 4) Austausch der Gegenionen in physiologischer Umgebung oder 5) eine durch Energieeintrag induzierte Veränderung der Umgebung oder des Gels freigesetzt werden (Abbildung 7). Als Beispiel kann hier die diffusionskontrollierte Freisetzung von Doxorubicin aus Pluronic-Hydrogelen dienen.<sup>[87]</sup> Ähnliche Freisetzungsmechanismen werden von Polymermicellen genutzt, die bereits in klinischen Studien untersucht werden.<sup>[88]</sup> Gleichzeitig wächst das Interesse an Nanogelen, die ihre biologisch aktive Fracht erst abladen, nachdem sie am Zielort ein entsprechendes Signal erhalten haben. Wie bereits erwähnt, können hier pH-Änderungen oder eine reduzierende Umgebung die Freisetzung bewirken. So sind etwa Nanogele auf PAA-Basis, die über Acetalgruppen vernetzt wurden, beim extrazellulären pH-Wert von 7.4 stabil, zerfallen aber rasch bei pH 5.0 und geben dabei das eingeschlossene Protein frei.<sup>[17]</sup> Ähnlich werden PEG-*cl*-PEI-Nanogele, die Disulfidvernetzungen aufweisen, in Gegenwart von Reduktionsmitteln rasch abgebaut.<sup>[28,29]</sup> Analog wurde berichtet, dass Poly[oligo(ethylenoxid)-methylmethacrylat]-Nanogele mit Disulfidbrücken in Gegenwart von Glutathion, einem häufig in Zellen vorkom-



**Abbildung 7.** Wirkstoff-Freisetzung aus Nanogelen. a) Diffusion des Wirkstoffs aus dem Nanogel. b) Wirkstoff-Freisetzung durch Abbau von Polymerketten oder Lösen der Vernetzung. c) Änderung des pH-Werts führt zur Deionisierung des Polymerenetzwerks und zur Freisetzung eines elektrostatisch gebundenen Wirkstoffs. d) Mehrwertige niedermolekulare Ionen oder Polyionen können Wirkstoffe mit gleichen Ladungsvorzeichen aus elektrostatischen Komplexen mit gegensätzlich geladenen Nanogelen verdrängen. e) Die Zufuhr von Energie führt zu Strukturänderungen im Gel oder zum Abbau des Gels und induziert dadurch die Wirkstoff-Freisetzung.

menden Tripeptid, rasch abgebaut wurden.<sup>[21]</sup> Der Abbau solcher Nanogele führte zur Freisetzung der gebundenen niedermolekularen Komponenten Rhodamin 6G und Doxorubicin. In einer anderen Arbeit wurden disulfidverbrückte HA-Nanogele durch Zugabe von Glutathion aufgelöst und siRNA freigesetzt.<sup>[30]</sup> In jedem Fall kann die Freisetzungskinetik über die Vernetzung gesteuert werden.

Polyelektrolythydrogеле, die Gastmoleküle über elektrostatische Wechselwirkungen binden, können diese ebenfalls nach Einwirkung externer Reize freisetzen. Beispielsweise können pH-empfindliche Nanogele auf PAA-Basis entgegengesetzt geladene Proteine wegen des niedrigeren pH-Werts in soliden Tumoren oder in Endosomen freisetzen.<sup>[10,73,89,90]</sup> Für die Freisetzung von Nucleotiden aus kationischen PEG-*cl*-PEI-Nanogelen wurde ein anderer Mechanismus vorgeschlagen.<sup>[91]</sup> In diesem Fall können im Nanogel immobilisierte, negativ geladene Biomakromoleküle durch Anionen aus der Zelle ersetzt werden. Die Wechselwirkung solcher Nanogele mit Zellmembranen kann so die Freiset-

zung von anionischen 5'-Triphosphaten von Nucleosidanalogen (NATP) auslösen, worauf in Abschnitt 6 näher eingegangen werden soll.<sup>[91]</sup>

Zusammen genommen können die in Abbildung 7 gezeigten Ansätze sehr nützlich sein, um die Wirkstoff-Freisetzung aus Nanogelen zu steuern. Im Fall nichtvernetzter Polymermicellen ist die Wirkstoff-Freisetzung durch zwei Faktoren maßgeblich beeinflusst.<sup>[92]</sup> Zum einen ist von Bedeutung, wie stark der Wirkstoff mit dem Micellinneren wechselwirkt (ob durch hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkungen), was durch den Verteilungskoeffizienten zwischen Micelle und Umgebung ausgedrückt werden kann. Zum anderen ist die Wechselwirkung der Polymerketten untereinander entscheidend, was durch die cmc ausgedrückt wird. Beide Faktoren werden im Zusammenhang der „kinetischen“ und der „thermodynamischen“ Stabilität diskutiert.<sup>[88,93]</sup> Wegen der geringen Größe der Micellen ist die Diffusion von Wirkstoffen aus der Micelle in der Regel nicht geschwindigkeitsbestimmend (zumindest für niedermolekulare Verbindungen). Dadurch sind thermodynamische und kinetische Stabilität der wirkstoffbeladenen Micellen miteinander verbunden, d.h. je ausgeprägter die Wechselwirkungen, desto langsamer die Freisetzung. In aller Regel sind Polymermicellen instabiler als Liposomen oder Nanopartikel aus abbaubaren Polymeren, sodass die Wirkstoff-Freisetzung schneller stattfindet. Nanogele können die Lücke zwischen diesen Trägersystemen schließen. Über den Vernetzungsgrad und die Verwendung abbaubarer Vernetzer kann die Freisetzung gezielt beeinflusst und gegenüber Umgebungsreizen sensibilisiert werden. Darüber hinaus bietet diese Technik die Möglichkeit, den zeitlichen Verlauf der Wirkstoff-Freisetzung zu kontrollieren. Im Unterschied zu Liposomen und unlöslichen Nanopartikeln quellen die Nanogele in dem Maß, wie ihre Beladung freigesetzt wird. Dies führt möglicherweise zu einer verlangsamten Freisetzung des im Inneren verbleibenden Wirkstoffs. Dieser Effekt könnte genutzt werden, um eine schubweise Freisetzung zu verhindern oder sogar eine Freisetzungskinetik nullter Ordnung am Ort der Erkrankung zu erreichen.<sup>[74,94]</sup>

## 6. Therapie mit Nanogelen

Beachtliche Fortschritte konnten bei der Anwendung von Nanogelen für die Pharmakotherapie mit niedermolekularen Therapeutika erzielt werden. Wie bereits erwähnt, konnte Retinsäure erfolgreich in PEG-*cl*-PEI-Nanogelen immobilisiert werden.<sup>[71]</sup> Auf ähnliche Weise gelang es, Valproinsäure zu formulieren.<sup>[69]</sup> In diesem Fall wurde der Transport von Valproinsäure enthaltenen Nanogelen durch die Blut-Hirn-Schranke (BBB) in vitro untersucht. Der Transport des Wirkstoffs über Monoschichten von Mikrogefäßendothelzellen des Rinderhirns (BBMEC) war im Fall der Nanogel-Formulierung gegenüber dem freien Wirkstoff um mindestens 70% erhöht. Dieses vielversprechende Ergebnis zeigt, dass Nanogele für den Transport von Wirkstoffen in das Gehirn sehr hilfreich sein könnten.

In einer anderen Arbeit wurde *N*-Hexylcarbamoyl-5-fluoruracil, eine Vorstufe für den Wirkstoff 5-Fluoruracil, in mit

Polysorbat 80 umhüllten Nanogelen aus PNIPPAm-*co*-Poly(*N*-vinylpyrrolidon) (PNIPAAm-*co*-PVP) verkapselt.<sup>[95]</sup> Die Freisetzung des Wirkstoffs war vom pH-Wert und von der Temperatur abhängig.<sup>[96]</sup> Es wurde gezeigt, dass diese Nanogele sich im Gehirn von Kaninchen anreicherten. Eine weitere Studie belegte, dass PNIPAAm-*co*-PVP-Nanogele mit Arjunglucosid I, einem Wirkstoff gegen die Leishmaniose, beladen werden konnten.<sup>[97]</sup> Diese Formulierung zeigte eine erhöhte therapeutische Wirksamkeit gegen Parasiten und reduzierte die Leber- und Nierentoxizität gegenüber der Verabreichung des freien Wirkstoffs.

Eine weitere vielversprechende Anwendung liegt im Bereich der Therapie mit NATPs. Diese nucleosidbasierten Zytostatika werden normalerweise über spezifische Nucleosidtransporter in die Zelle aufgenommen. In der Zelle werden sie durch 1) Phosphorylierung in Nucleosid-5'-phosphate durch intrazelluläre Nucleosidkinasen, 2) Bildung von Nucleosid-5'-diphosphaten, 3) Umwandlung von Ribonucleotiden in Desoxyribonucleotide durch Nucleosidreduktasen und schließlich 4) Synthese von NATP aktiviert.<sup>[98]</sup> Die zuletzt genannten NATPs sind die eigentlichen aktiven Moleküle, welche die DNS-Replikation und -Transkription unterbinden. Die niedrige Effizienz der NATP-Bildung in vivo ist einer der Hauptgründe, warum viele Kandidaten in präklinischen oder klinischen Entwicklungsphasen zurückgezogen werden. Durch die Verwendung von PEG-*cl*-PEI-Nanogelen besteht aber nun die Möglichkeit, die aktiven NATPs direkt in Krebszellen zu schleusen.<sup>[83]</sup> In Nanogel verpackte NATPs zeigten eine erhöhte Zelltoxizität in vielen Tumorzelllinien und verzögerten das Tumorwachstum im Brustkrebs-Tiermodell.<sup>[99]</sup> Weiterhin zeigte ein als Nanogel formuliertes antivirales NATP, 5'-triphosphoryliertes Ribavirin, in mit Influenza A infizierten MDCK-Zellen eine höhere Aktivität als ein nichtphosphoryliertes Analogon.<sup>[29]</sup> Interessanterweise wurde für diese Formulierung auch eine deutlich verringerte Toxizität gegen Mitochondrien beobachtet.

## 7. Biomakromoleküle in Nanogelen

In verschiedenen Beispielen wurde der Transport von Biomakromolekülen mit Nanogelen in vitro und in vivo beschrieben.<sup>[1]</sup> Bemerkenswert ist der Transport in Nanogelen eingeschlossener Oligonucleotide durch zelluläre Barrieren. Insbesondere führte die Verkapselung von Phosphorthioat-Oligonucleotiden in PEG-*cl*-PEI-Nanogelen zu einem deutlichen Anstieg des transzellulären Transports der Nucleotide in einem In-vitro-Modell des Magen-Darm-Epithels (polarierte Caco-2-Zellmonoschichten).<sup>[11]</sup> Die Permeabilität der Monoschichten gegenüber <sup>3</sup>H-Mannit, einem Marker für parazellulären Transport, war dabei nicht verändert, was darauf hinweist, dass die beladenen Nanogele durch die Zellen hindurch transportiert wurden und nicht passiv zwischen den Zellen hindurch diffundierten. Außerdem konnte das als Nanogel formulierte Oligonucleotid im Unterschied zum freien Oligonucleotid effektiv vor dem Abbau im Zellinneren geschützt werden. Zusammengefasst ergibt dies ein vielversprechendes Potenzial für Nanogele als Träger für die orale Verabreichung von Oligonucleotiden.

Darüber hinaus wurde in einer weiteren Studie der Transport solcher Formulierungen durch die Blut-Hirn-Schranke (BBB) untersucht.<sup>[64]</sup> Auch hier konnte gezeigt werden, dass Oligonucleotide mithilfe von Nanogelen effektiv durch polarisierte BBMEC-Zellmonoschichten als In-vitro-BBB-Modell transportiert werden. Dieser Transport wurde durch eine Oberflächenmodifikation der Nanogele mit Rindertransferrin oder -insulin verstärkt. Beide Proteine binden an spezifische Rezeptoren auf der vaskulären Seite des Endothels im Gehirn und erleichtern so den Transport der beladenen Nanogele durch die BBB. Auch hier wurden die Oligonucleotide im Nanogel über einen transzellulären Transportmechanismus intakt zur anderen Seite geschleust. Versuche zur Bioverteilung im Mausmodell haben des Weiteren gezeigt, dass eine Stunde nach der intravenösen Injektion eine beinahe 15-fache Anreicherung der mit Oligonucleotid beladenen Nanogele im Vergleich zu freien Oligonucleotiden im Gehirn erreicht werden kann. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass kationische Nanogele gute Kandidaten für den Transport von Oligonucleotiden ins Gehirn darstellen.

Ähnlich den Oligonucleotiden kann Plasmid-DNS in kationischen Nanogelen immobilisiert, dadurch vor dem enzymatischen Abbau durch extrazelluläre und intrazelluläre Nucleaseen bewahrt und in Zellen geschleust werden. Somit könnten Nanogele auch für die Transfektion verwendet werden. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass Transferrin-modifizierte PEG-*cl*-PEI-Nanogele, die Plasmid-DNS enthielten, Zellen in serumhaltigem Medium transfizieren konnten.<sup>[69]</sup> Interessanterweise ist die Größe von „Supercoiled“-DNS vergleichbar zu derjenigen von Nanogelen, die im gequollenen Zustand einen hydrodynamischen Durchmesser zwischen 100 und 200 nm aufweisen. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass Plasmid-DNS sehr tief in solche Nanogele eindringen kann. Ein flexibles Polyelektrolytnetzwerk ist aber möglicherweise in der Lage, nach einer anfänglichen Bindung über ionische Wechselwirkungen die „Supercoiled“-DNS zu umhüllen.

Die pharmakologischen Effekte, die durch polymere Hilfstoffe und Nanomaterialien im Zusammenspiel mit Wirkstoffen ausgelöst werden können, finden in jüngster Zeit immer mehr Beachtung.<sup>[100]</sup> So wurde zum Beispiel gezeigt, dass synthetische Polymere mit einigen Wirkstofftransportsystemen wechselwirken und bestimmte zelluläre Signalwege aktivieren können. Dies verändert die Pharmakologie, Pharmakogenomik und Immunogenität biologisch aktiver Wirkstoffe.<sup>[79,80]</sup> Entsprechend wurden von Fréchet und Mitarbeitern säurelabile Nanogele zur Antigenpräsentation *in vitro* und zur Impfung *in vivo* eingesetzt.<sup>[17,19,101–103]</sup> Sie zeigten, dass Nanogele für die Erzeugung einer Immunantwort maßgeschneidert werden können, indem sie phagozytotischen Zellen des Immunsystems zugeführt werden. So wurde zum Beispiel beobachtet, dass Plasmid-DNS in säurelabilen vernetzten Nanogelen die Sekretion von Zytokin-IL-6 und die Immunstimulation von Makrophagen auslösen kann.<sup>[18]</sup> In einer anderen Arbeit wurden Nanogele mit Ovalbumin als Modellantigen beladen. Nach Inkubation mit dendritischen Zellen aus dem Knochenmark wurde eine verstärkte Präsentation von Ovalbuminfragmenten beobachtet.<sup>[101]</sup> Auch

Adjuvantien wie CpG-Oligonucleotide und Anti-Interleukin-10-Oligonucleotide können zusammen mit Protein-Antigenen abgegeben werden, wodurch die zelluläre Immunantwort maximiert wird.<sup>[103]</sup> Somit könnten Nanogele nützliche Vehikel für die Abgabe und Immunantwortmodulation in der Entwicklung von DNS- und Peptidimpfstoffen sein.

## 8. Zusammenfassung

Nanogele bilden eine eigene Klasse von hydrophilen dispergierten Wirkstoffträgern mit vielversprechenden Eigenschaften für die Immobilisierung von niedermolekularen Wirkstoffen und Biomakromolekülen. Die Vorteile dieser Systeme sind unter anderem einfache Formulierung, hohe Kapazität und Stabilität der resultierenden Dispersion. Die Mechanismen für das Quellen und den Kollaps der Nanogele sind einzigartig und bieten eine Reihe von Vorteilen, um eine optimale Wirkstoffbeladung und -freisetzung zu erreichen. Nanogelnetzwerke können auf äußere Reize reagieren, sehr rasch ihr Volumen ändern, und sie ermöglichen eine stimulierte Freisetzung ihrer Fracht, unter anderem hydrophobe oder geladene Wirkstoffe oder Biopolymere.

Des Weiteren können Nanogele chemisch modifiziert werden, um verschiedene Liganden für die zielgerichtete Pharmakotherapie einzubringen, einen Wirkstoff zielgenau freizusetzen oder die Herstellung von Kompositmaterialien zu ermöglichen. Praktische Studien deuten an, dass Nanogele für den effizienten Transport pharmazeutischer Wirkstoffe in Zellen sowie für einen verbesserten Transport über Zellbarrieren hinweg dienen können. Es ist klar, dass es keinen universellen Träger gibt, der alle Herausforderungen aktueller und zukünftiger Pharmakotherapien gleichzeitig bewältigen kann. In diesem Zusammenhang sind die Möglichkeiten der Nanogele wie die jeder anderen Klasse von Trägermaterialien in der Pharmazie nicht „unendlich“. Allerdings bedeutet für Menschen „unendlich“ oft nur „über das Vorstellungsvermögen hinaus“.

Wir hoffen, dass die zukünftigen Anwendungen der Nanogele als pharmazeutische Träger unsere Erwartungen übertreffen werden, und gehen davon aus, dass viele Wissenschaftler weltweit mit herausragenden Arbeiten dazu beitragen werden, praktische Anwendungen für diese neuartigen Träger zu entwickeln.

*Die Autoren sind dankbar für finanzielle Unterstützung durch die National Institutes of Health (CA102791 und NS050660 für S.V.V.; NS36229, NS051335, CA89225, CA116591 und RR021937 für A.V.K.), das US Department of Defense (USAMRMC 06108004 für A.V.K.) und die National Science Foundation (DMR 0513699 für A.V.K.). Unser herzlicher Dank gilt auch Daria Alakhova und Zagit Gaymalov, Doktoranden im UNMC Pharmaceutical Sciences Graduate Program, für ihre Hilfe beim Erstellen der Abbildungen in diesem Aufsatz.*

Eingegangen am 23. Januar 2009  
Online veröffentlicht am 27. Juni 2009

Übersetzt von Anita Schulz und Robert Luxenhofer, Dresden

- [1] S. V. Vinogradov, E. V. Batrakova, A. V. Kabanov, *Colloids Surf. B* **1999**, *16*, 291–304.
- [2] P. Lemieux, S. V. Vinogradov, C. L. Gebhart, N. Guerin, G. Paradis, H. K. Nguyen, B. Ochietti, Y. G. Suzdaltseva, E. V. Bartakova, T. K. Bronich, Y. St-Pierre, V. Y. Alakhov, A. V. Kabanov, *J. Drug Targeting* **2000**, *8*, 91–105.
- [3] J. Sunamoto, K. Akiyoshi, *Macromolecules* **1993**, *26*, 3062–3068.
- [4] N. Morimoto, U. Hasegawa, A. Sugawara, S. Yamane, K. Akiyoshi in *Nanotechnology in Carbohydrate Chemistry* (Hrsg.: H. Yuassa), Transworld Research Network, Trivandrum, Indien, **2006**, S. 67–85.
- [5] S. V. Vinogradov, T. K. Bronich, A. V. Kabanov, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 135–147.
- [6] S. Nayak, L. A. Lyon, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7862–7886; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7686–7708.
- [7] J. K. Oh, R. Drumright, D. J. Siegwart, K. Matyjaszewski, *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33*, 448–477.
- [8] K. Akiyoshi, S. Kobayashi, S. Shichibe, D. Mix, M. Baudys, S. W. Kim, J. Sunamoto, *J. Controlled Release* **1998**, *54*, 313–320.
- [9] S. Yu, P. Yao, M. Jiang, G. Zhang, *Biopolymers* **2006**, *83*, 148–158.
- [10] S. Yu, J. Hu, X. Pan, P. Yao, M. Jiang, *Langmuir* **2006**, *22*, 2754–2759.
- [11] S. Daoud-Mahammed, P. Couvreur, R. Gref, *Int. J. Pharm.* **2007**, *332*, 185–191.
- [12] P. Speiser in *Reverse Micelles* (Hrsg.: P. L. Luisi, B. E. Straub), Plenum, New York, **1984**, S. 339–346.
- [13] Y. L. Khmelnitsky, I. N. Neverova, A. V. Gedrovich, V. A. Polyakov, A. V. Levashov, K. Martinek, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 751–757.
- [14] K. McAllister, P. Sazani, M. Adam, M. J. Cho, M. Rubinstein, R. J. Samulski, J. M. DeSimone, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 15198–15207.
- [15] N. Sahiner, W. T. Godbey, G. L. McPherson, V. T. John, *Colloid Polym. Sci.* **2006**, *284*, 1121–1129.
- [16] I. Kaneda, A. Sogabe, H. Nakajima, *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, *275*, 450–457.
- [17] N. Murthy, M. Xu, S. Schuck, J. Kunisawa, N. Shastri, J. M. Frechet, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 4995–5000.
- [18] S. L. Goh, N. Murthy, M. Xu, J. M. Fréchet, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 467–474.
- [19] Y. J. Kwon, S. M. Standley, S. L. Goh, J. M. Fréchet, *J. Controlled Release* **2005**, *105*, 199–212.
- [20] J. K. Oh, C. Tang, H. Gao, N. V. Tsarevsky, K. Matyjaszewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5578–5584.
- [21] J. K. Oh, D. J. Siegwart, H. I. Lee, G. Sherwood, L. Peteanu, J. O. Hollinger, K. Kataoka, K. Matyjaszewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5939–5945.
- [22] C. Donini, D. N. Robinson, P. Colombo, F. Giordano, N. A. Peppas, *Int. J. Pharm.* **2002**, *245*, 83–91.
- [23] W. E. Hennink, C. F. van Nostrum, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 13–36.
- [24] D. M. Xu, J. H. Yu, Y. B. Liu, H. W. Sun, J. Y. Xu, K. L. Sheng, S. D. Yao, Y. H. Xu, H. L. Lu, *Int. J. Nanosci.* **2006**, *5*, 753–756.
- [25] D. M. Xu, S. D. Yao, Y. B. Liu, K. L. Sheng, J. Hong, P. J. Gong, L. Dong, *Int. J. Pharm.* **2007**, *338*, 291–296.
- [26] M. Gupta, A. K. Gupta, *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2004**, *7*, 38–46.
- [27] M. Gupta, A. K. Gupta, *J. Controlled Release* **2004**, *99*, 157–166.
- [28] S. V. Vinogradov, E. Kohli, A. Zeman, A. V. Kabanov, *Polym. Prepr. Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.* **2006**, *47*, 27–28.
- [29] E. Kohli, H. Y. Han, A. D. Zeman, S. V. Vinogradov, *J. Controlled Release* **2007**, *121*, 19–27.
- [30] H. Lee, H. Mok, S. Lee, Y. K. Oh, T. G. Park, *J. Controlled Release* **2007**, *119*, 245–252.
- [31] H. Mok, T. G. Park, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 1369–1372.
- [32] Q. Ma, E. E. Remsen, T. Kowalewski, K. L. Wooley, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4627–4628.
- [33] Q. Ma, E. E. Remsen, C. G. Clark, Jr., T. Kowalewski, K. L. Wooley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5058–5063.
- [34] D. J. Pochan, Z. Chen, H. Cui, K. Hales, K. Qi, K. L. Wooley, *Science* **2004**, *306*, 94–97.
- [35] Z. Chen, H. Cui, K. Hales, Z. Li, K. Qi, D. J. Pochan, K. L. Wooley, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8592–8593.
- [36] S. Harrisson, K. L. Wooley, *Chem. Commun.* **2005**, 3259–3261.
- [37] M. J. Joralemon, R. K. O'Reilly, C. J. Hawker, K. L. Wooley, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16892–16899.
- [38] S. V. Vinogradov, E. Kohli, A. D. Zeman, *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 920–930.
- [39] W. C. Lee, Y. C. Li, I. M. Chu, *Macromol. Biosci.* **2006**, *6*, 846–854.
- [40] T. K. Bronich, P. A. Keifer, L. S. Shlyakhtenko, A. V. Kabanov, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8236–8237.
- [41] S. Bontha, A. V. Kabanov, T. K. Bronich, *J. Controlled Release* **2006**, *114*, 163–174.
- [42] J. P. Rolland, B. W. Maynor, L. E. Euliss, A. E. Exner, G. M. Denison, J. M. DeSimone, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10096–10100.
- [43] S. E. Gratton, P. D. Pohlhaus, J. Lee, J. Guo, M. J. Cho, J. M. DeSimone, *J. Controlled Release* **2007**, *121*, 10–18.
- [44] Y. Shin, J. H. Chang, J. Liu, R. Williford, Y. Shin, G. J. Exarhos, *J. Controlled Release* **2001**, *73*, 1–6.
- [45] Y. Shin, J. Liu, J. H. Chang, G. J. Exarhos, *Chem. Commun.* **2002**, 1718–1719.
- [46] J. E. Wong, C. B. Müller, A. Laschewsky, W. Richtering, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 8527–8531.
- [47] J. E. Wong, M. L. Díez-Pascual, W. Richtering, *Macromolecules* **2009**, *42*, 1229–1238.
- [48] J. E. Wong, A. K. Gaharwar, D. Müller-Schulte, D. Bahadur, W. Richtering, *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *324*, 47–54.
- [49] S. Kazakov, K. Levon, *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 4713–4728.
- [50] J. P. Schillemans, F. M. Flesch, W. E. Hennink, C. F. van Nostrum, *Macromolecules* **2006**, *39*, 5885–5890.
- [51] M. Yan, J. Ge, Z. Liu, P. Ouyang, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11008–11009.
- [52] M. Yan, Z. Liu, D. Lu, Z. Liu, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 560–565.
- [53] M. Oishi, N. Myagawa, T. Sakura, Y. Nagasaki, *React. Funct. Polym.* **2007**, *67*, 662–668.
- [54] M. Oishi, H. Hayashi, T. Uno, T. Ishii, M. Iijima, Y. Nagasaki, *Macromol. Chem. Phys.* **2007**, *208*, 1172–1182.
- [55] H. Sun, J. Yu, P. Gong, D. Xu, J. Hong, C. Zhang, S. Yao, *Int. J. Nanosci.* **2006**, *5*, 253–258.
- [56] J. Hong, P. Gong, D. Xu, L. Dong, S. Yao, *J. Biotechnol.* **2007**, *128*, 597–605.
- [57] A. Jordan, R. Scholz, K. Maier-Hauff, F. K. van Landeghem, N. Waldoefner, U. Teichgraeber, J. Pinkernelle, H. Bruhn, F. Neumann, B. Thiesen, A. von Deimling, R. Felix, *J. Neurooncol.* **2006**, *78*, 7–14.
- [58] S. Xu, Z. Nie, M. Seo, P. Lewis, E. Kumacheva, H. A. Stone, P. Garstecki, D. B. Weibel, I. Gitlin, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 734–738; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 724–728.
- [59] H. Zhang, E. Tumarkin, R. Peerani, Z. Nie, R. M. Sullan, G. C. Walker, E. Kumacheva, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12205–12210.
- [60] G. E. Francis, C. Delgado, D. Fisher, F. Malik, A. K. Agrawal, *J. Drug Targeting* **1996**, *3*, 321–340.
- [61] S. V. Vinogradov, A. D. Zeman, E. V. Batrakova, A. V. Kabanov, *J. Controlled Release* **2005**, *107*, 143–157.

- [62] H. Hayashi, M. Iijima, K. Kataoka, Y. Nagasaki, *Macromolecules* **2004**, *37*, 5389–5396.
- [63] M. L. Immordino, F. Dosio, L. Cattel, *Int. J. Nanomed.* **2006**, *1*, 297–315.
- [64] S. V. Vinogradov, E. V. Batrakova, A. V. Kabanov, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 50–60.
- [65] S. Nayak, H. Lee, J. Chmielewski, L. A. Lyon, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10258–10259.
- [66] T. Shiokawa, Y. Hattori, K. Kawano, Y. Ohguchi, H. Kawakami, K. Toma, Y. Maitani, *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 2018–2025.
- [67] B. Stella, V. Marsaud, S. Arpicco, G. Geraud, L. Cattel, P. Couvreur, J. M. Renoir, *J. Drug Targeting* **2007**, *15*, 146–153.
- [68] S. V. Vinogradov, A. V. Kabanov, *Polym. Prepr. Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.* **2004**, *228*, 296.
- [69] S. V. Vinogradov, *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 4703–4712.
- [70] J. Ricka, T. Tanaka, *Macromolecules* **1984**, *17*, 2916–2921.
- [71] T. Bronich, S. Vinogradov, A. V. Kabanov, *Nano Lett.* **2001**, *1*, 535–540.
- [72] S. H. Lee, S. H. Choi, S. H. Kim, T. G. Park, *J. Controlled Release* **2007**, *125*, 25–32.
- [73] I. Varga, I. Szalai, R. Meszaros, T. Gilanyi, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 20297–20301.
- [74] Y. Zhang, Y. Guan, S. Zhou, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3842–3847.
- [75] G. M. Eichenbaum, P. F. Kiser, S. A. Simon, D. Needham, *Macromolecules* **1998**, *31*, 5084–5093.
- [76] K. Nagahama, Y. Mori, Y. Ohya, T. Ouchi, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2135–2141.
- [77] N. Kato, U. Hasegawa, N. Morimoto, Y. Saita, K. Nakashima, Y. Ezura, H. Kurosawa, K. Akiyoshi, M. Noda, *J. Cell Biochem.* **2007**, *101*, 1063–1070.
- [78] D. Missirlis, N. Tirelli, J. A. Hubbell, *Langmuir* **2005**, *21*, 2605–2613.
- [79] T. K. Bronich, S. Bontha, L. S. Shlyakhtenko, L. Bromberg, T. A. Hatton, A. V. Kabanov, *J. Drug Targeting* **2006**, *14*, 357–366.
- [80] W. Jin, P. Xu, Y. Zhan, Y. Shen, E. A. Van Kirk, B. Alexander, W. J. Murdoch, L. Liu, D. D. Isaak, *Drug Delivery* **2007**, *14*, 279–286.
- [81] K. Ogawa, S. Sato, E. Kokufuta, *Langmuir* **2005**, *21*, 4830–4836.
- [82] K. Ogawa, S. Sato, E. Kokufuta, *Langmuir* **2007**, *23*, 2095–2102.
- [83] S. V. Vinogradov, *Expert Opin. Drug Delivery* **2007**, *4*, 5–17.
- [84] V. A. Kabanov, V. B. Skobeleva, V. B. Rogacheva, A. B. Zezin, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 1485–1490.
- [85] K. T. Oh, T. K. Bronich, V. A. Kabanov, A. V. Kabanov, *Bio-macromolecules* **2007**, *8*, 490–497.
- [86] S. V. Vinogradov, T. K. Bronich, A. V. Kabanov, *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 805–812.
- [87] D. Missirlis, R. Kawamura, N. Tirelli, J. A. Hubbell, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *29*, 120–129.
- [88] A. V. Kabanov, V. Y. Alakhov, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2002**, *19*, 1–72.
- [89] C. Chang, Z. C. Wang, C. Y. Quan, H. Cheng, S. X. Cheng, X. Z. Zhang, R. X. Zhuo, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2007**, *18*, 1591–1599.
- [90] M. Oishi, S. Sumitani, Y. Nagasaki, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1379–1382.
- [91] S. V. Vinogradov, E. Kohli, A. D. Zeman, *Mol. Pharm.* **2005**, *2*, 449–461.
- [92] A. V. Kabanov, I. R. Nazarova, I. V. Astafieva, E. V. Batrakova, V. Y. Alakhov, A. A. Yaroslavov, V. A. Kabanov, *Macromolecules* **1995**, *28*, 2303–2314.
- [93] C. Allen, D. Maysinger, A. Eisenberg, *Colloids Surf. B* **1999**, *16*, 3–27.
- [94] E. Y. Ng, W. K. Ng, S. S. Chiam, *J. Med. Syst.* **2008**, *32*, 85–92.
- [95] S. Soni, A. K. Babbar, R. K. Sharma, A. Maitra, *J. Drug Targeting* **2006**, *14*, 87–95.
- [96] H. Chen, Y. Gu, Y. Hub, Z. Qian, *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **2007**, *61*, 303–313.
- [97] R. Tyagi, S. Lala, A. K. Verma, A. K. Nandy, S. B. Mahato, A. Maitra, M. K. Basu, *J. Drug Targeting* **2005**, *13*, 161–171.
- [98] C. M. Galmarini, J. R. Mackey, C. Dumontet, *Lancet Oncol.* **2002**, *3*, 415–424.
- [99] C. M. Galmarini, E. Kohli, A. D. Zeman, G. Warren, S. V. Vinogradov, *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *10*, 3373–3380.
- [100] A. V. Kabanov, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2006**, *58*, 1597–1621.
- [101] Y. J. Kwon, E. James, N. Shastri, J. M. Fréchet, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 18264–18268.
- [102] Y. J. Kwon, S. M. Standley, A. P. Goodwin, E. R. Gillies, J. M. Fréchet, *Mol. Pharm.* **2005**, *2*, 83–91.
- [103] S. M. Standley, I. Mende, S. L. Goh, Y. J. Kwon, T. T. Beaudette, E. G. Engleman, J. M. Fréchet, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 77–83.