

Die Zukunft der Partikelreplikation in nicht benetzenden Templaten (PRINT)

Jing Xu, Dominica H. C. Wong, James D. Byrne, Kai Chen, Charles Bowerman und Joseph M. DeSimone*

Kolloide · Nanomedizin · Nanopartikel ·

Softlithographie · Wirkstofftransport

Die Partikelreplikation in nicht benetzenden Templaten (PRINT) ist ein kontinuierliches, hochauflösendes Roll-to-Roll-Abgussverfahren zur Herstellung von präzise definierten Mikro- und Nanopartikeln. Die Technik greift Lithographietechniken aus der Mikroelektronik-industrie auf und kombiniert diese mit den Roll-to-Roll-Verfahren der Photofilmindustrie. Das Resultat ist eine exzellente und in dieser Form beispiellose Steuerung von Größe, Form, chemischer Zusammensetzung, Beladung, Modul und Oberflächeneigenschaften der Partikel. Zudem ist PRINT mit der GMP (Good Manufacturing Practice) kompatibel und daher auch für die großtechnische Partikelherstellung geeignet. In diesem Kurzaufsatz beschreiben wir unsere neuesten Arbeiten zur Anwendung der PRINT-Technologie in den Bio- und Materialwissenschaften.

1. Einleitung

Die Vorgehensweisen bei der Herstellung kolloidaler Partikel lassen sich in zwei Kategorien unterteilen: Bottom-up und Top-down. Bottom-up-Methoden nutzen schwache und nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen Molekülen

für eine Selbstorganisation zu Partikeln wie Micellen,^[1] Vesikeln,^[2] Liposomen^[3] und Polymersomen.^[4] Methoden dieser Art wurden im Bereich der Nanomedizin intensiv untersucht und können beachtliche Erfolge beim Wirkstoff- und Gentransport vorweisen. Gut ein Dutzend liposomatische Wirkstoffe wurden bereits für den klinischen Einsatz zugelassen, und weitere befinden sich in verschiedenen Stadien der klinischen Prüfung.^[5] Trotz vieler Vorteile der Bottom-up-Methoden gibt es jedoch nach wie vor Einschränkungen, z.B. Formulierungsinstabilitäten, breite Größenverteilungen und begrenzte Vielfalt an Partikelformen.^[6] Bei Top-down-Methoden werden hingegen makroskopische Materialien zu mikro- oder nanometergroßen Partikeln verarbeitet, z.B. durch Zerkleineren, Mahlen und Emulgieren.^[7] Jedoch bieten auch diese Techniken nur begrenzte Steuerungsmöglichkeiten für Partikelgröße und -form. Photolithographie,^[8] Mikrofluidiksynthesen^[9] und Abgusstechniken^[10] stellen fortgeschrittenere Formen von Top-down-Herstellungsverfahren dar und wurden zur Herstellung von Partikeln für verschiedenste Anwendungen genutzt. In diesem Kurzaufsatz konzentrieren wir uns auf die PRINT-Technologie (Partikelreplikation in nicht benetzenden Templaten; particle replication in nonwetting templates), eine einzigartige Abgusstechnik auf der Basis der Softlithographie, die eine Erzeugung von exakt definierten Partikeln ermöglicht.

Die PRINT-Technologie wurde in der Folge der Entwicklung einer neuen Klasse von Fluorpolymeren, den photohärtbaren Perfluorpolyethern (PFPE), entworfen. PFPEs wurden für die Herstellung von mikrofluidischen Kanälen als Ersatzmaterial für Polydimethylsiloxan (PDMS) entwickelt,

[*] D. H. C. Wong, K. Chen, Prof. J. M. DeSimone
Department of Chemistry, University of North Carolina
Chapel Hill, NC 27599 (USA)
Dr. J. Xu, Dr. C. Bowerman, Prof. J. M. DeSimone
Lineberger Comprehensive Cancer Center, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599 (USA)
J. D. Byrne, Prof. J. M. DeSimone
Eshelman School of Pharmacy, University of North Carolina
Chapel Hill, NC 27599 (USA)
Prof. J. M. DeSimone
Department of Pharmacology, Carolina Center of Cancer Nanotechnology Excellence, Institute for Advanced Materials, Institute for Nanomedicine, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599 (USA)
und
Department of Chemical and Biomolecular Engineering, North Carolina State University, Raleigh, NC 27695 (USA)
und
Sloan-Kettering Institute for Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY 10021 (USA)
E-Mail: desimone@email.unc.edu

das in Gegenwart bestimmter organischer Lösungsmittel zur Quellung neigt. Auch als Matrix für Musterbildungsprozesse härtbarer Verbindungen geringer Molmasse erwiesen sich PFPEs als vorteilhaft gegenüber PDMS, das durch solche Verbindungen oft ebenfalls zur Quellung gebracht wird. PFPEs besitzen ausgezeichnete Quellbeständigkeit gegenüber organischen Molekülen mit geringem Molekulargewicht^[11] und ermöglichen die Herstellung von hochgenauen Mustern mit einer Auflösung von unter 100 nm.^[12] Von besonderem Interesse sind die einzigartigen Eigenschaften der PFPEs, wie eine extrem geringe Oberflächenenergie, ein geringes Modul, eine hohe Gasdurchlässigkeit und geringe Toxizität, was das System für die Erzeugung von isolierten mikro- und nanometergroßen Partikeln geeignet macht.^[10c] Auf der Grundlage dieser Eigenschaften wurde der PRINT-Prozess zur Herstellung monodisperser Partikel entwickelt. Im Unterschied zu anderen Herstellungstechniken für Mikro- oder Nanopartikel erlaubt PRINT eine vollständige Steuerung der physikochemischen Eigenschaften des Partikels. Diese Plattformtechnologie könnte somit für Anwendungen sowohl in den Bio- als auch Materialwissenschaften wichtig werden, z.B. Wirkstofftransport, Elektronik, Optik, Sensorik und Bildgebung.^[13]

2. Das PRINT-Verfahren

Abbildung 1a zeigt schematisch den Ablauf eines typischen PRINT-Verfahrens. Ein beliebig gemusterter Siliciumwafer (grau) wird dabei zunächst mit einer konventionellen photolithographischen Technik hergestellt und im PRINT-Verfahren als Urschablone eingesetzt. In den letzten Jahren wurde die PRINT-Technik von kleinformativen Laborsystemen hin zu einem automatisierten, kontinuierlichen Roll-to-Roll-Prozess entwickelt, der eine für vorklinische Studien und klinische Prüfungen geeignete Partikelproduktion ermöglicht (Abbildung 1b).

Mit dem PRINT-Verfahren können wohldefinierte Mikro- und Nanopartikel hergestellt werden, wobei die bekannten Probleme anderer Partikelherstellungsstrategien (molekulare Selbstorganisation, Emulgier-, Fällungs- und Koazervationstechniken) umgangen werden.^[14,15] Dank der großen Fortschritte bei den konventionellen Lithographieverfahren gelingt eine präzise Schablonenherstellung, von denen das PRINT-Verfahren enorm profitiert. Die Zusam-

mensetzung der mit dem PRINT-Verfahren hergestellten Partikel kann auf einfache Weise eingestellt werden, und es wurden Partikel aus verschiedensten Materialien hergestellt, z.B. Hydrogele wie vernetzte Poly(ethylenglykole) (PEG) und Poly(silylether),^[10c,16] thermoplastische Polymere wie Poly(milchsäure) (PLLA) und Poly(milch-co-glykolsäure) (PLGA),^[10c,17] biologische Präparate wie Insulin und Albumin sowie reine niedermolekulare Verbindungen wie Zucker und niedermolekulare Wirkstoffe.^[18] Mehrphasige und regiospezifisch funktionalisierte Partikel können ebenfalls mittels PRINT hergestellt werden (Abbildung 2). Unsere Gruppe hat eine Strategie zur Kombination zweier unterschiedlicher Zusammensetzungen in einem einzigen Partikel entwickelt, um endmarkierte Partikel, zweiphasige Janus-Partikel und mehrphasige, formspezifische Partikel herzustellen.^[19] Oberflächeneigenschaften von PRINT-Partikeln können ebenfalls einfach modifiziert werden, und auch Positivität, Textur und Modul der Partikel lassen sich durch sorgfältiges Design der Matrixformulierung gezielt einstellen. In diesem Kurzaufsatz werden die jüngsten Fortschritte der PRINT-Technologie in den Bio- und Materialwissenschaften sowie Perspektiven für zukünftige Entwicklungen vorgestellt.

3. Biowissenschaften

Entwicklung und Synthese von Wirkstoffträgern auf der Basis von Mikro- und Nanopartikeln sind seit vielen Jahren im Fokus der Forschung. Ziel ist es, die bekannten Probleme konventioneller Wirkstoffformulierungen, wie geringe Wirksamkeit oder unerwünschte Nebenwirkungen, zu überwinden.^[3c,27] Bei der Entwicklung nanopartikulärer Wirkstofftransportsysteme müssen mehrere kritische Faktoren berücksichtigt werden, wie Form und Größe des Partikels, Partikelmatrix, Oberflächenchemie und Wirkstofftransport durch die Matrix. PRINT ermöglicht eine unabhängige Steuerung aller Parameter der Partikelsynthese und wurde dementsprechend ausführlich eingesetzt, um den Einfluss des Partikeldesigns auf die Bioverteilung und Pharmakokinetik,^[25,28,29] die differenzielle Lungendeposition und die zelluläre Internalisierung von Partikeln zu untersuchen.^[24,30,31] Zudem können PRINT-Partikel vielfältige Lasten transportieren, wie z.B. Chemotherapeutika, kurze interferierende RNA (siRNA), RNA-Replikons und Kontrastmittel, indem diese einfach in das flüssige Präpartikelmaterial inkorporiert werden.

3.1. Transport von kleinen Molekülen und Prodrugs

Um die therapeutische Wirksamkeit von hoch toxischen, niedermolekularen Wirkstoffen zu erhöhen, besteht ein Ansatz darin, die Wirkstoffe in Nanoträger zu verpacken.^[27,32] Ein klinisch relevantes Beispiel dafür ist Doxil, eine Liposomformulierung von Doxorubicin, die verglichen mit freiem Doxorubicin eine geringere Kardiotoxizität zeigt.^[3b] Nanoträger haben das Potenzial, die therapeutische Wirksamkeit durch Erhöhen der Wirkstoffkonzentration in erkrankten Geweben und Verlängerung der Wirkstofffreisetzung bei



Joseph DeSimone studierte Chemie am Ursinus College (B.S. 1986) und promovierte 1990 an der Virginia Tech. Er ist Chancellor's Eminent Professor of Chemistry an der UNC-Chapel Hill und William R. Kenan Jr. Professor of Chemical Engineering an der NC State University sowie Direktor des Frank Hawkins Kenan Institute of Private Enterprise an der UNC-CH. Er ist Mitglied der National Academy of Sciences und der National Academy of Engineering. Seine Arbeiten sind in mehr als 290 wissenschaftlichen Publikationen und mehr als 130 Patenten dokumentiert.

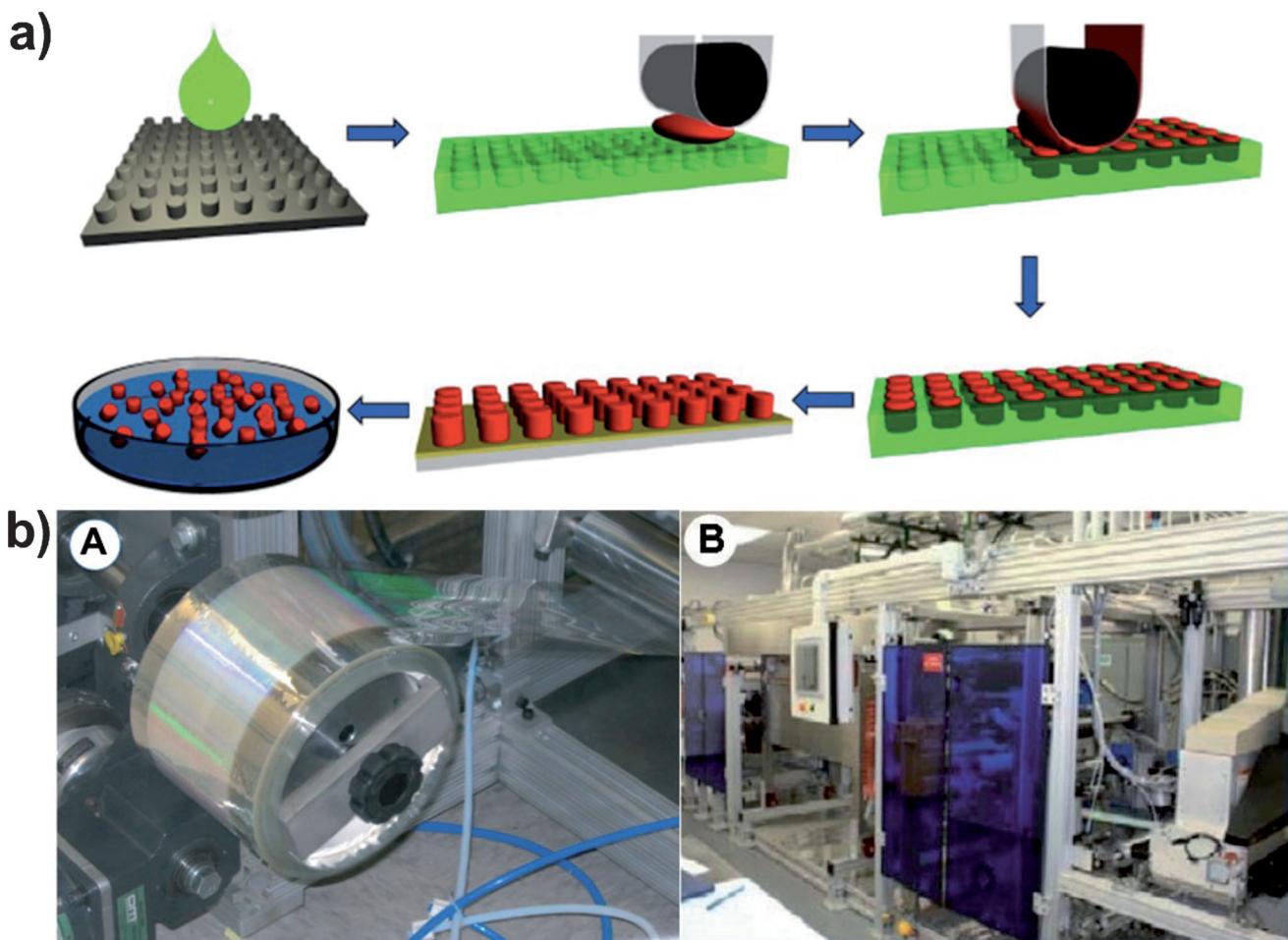


Abbildung 1. a) Anfertigung einer PRINT-Abgussform und Herstellung von PRINT-Partikeln. Ein Siliciumwafer mit mikro- und nanometergroßen Mustern (grau) wird nahezu vollständig mit einer flüssigen PFPE-Vorstufe (grün) bedeckt, die auf fast allen Oberflächen einen positiven Spreitkoeffizienten aufweist. Nach der Photohärtung erhält man eine elastomere PRINT-Form, deren Mikro-/Nanomuster dem negativen Abdruck des Siliciumwafers entspricht. Die Vertiefungen werden mithilfe eines Roll-to-Roll-Verfahrens mit einem flüssigen Präpartikelmaterial (rot) gefüllt, wobei der Bereich um die Vertiefungen herum unbenetzt bleibt. Das Roll-to-Roll-Verfahren ist eine Folientechnik mit einem hochenergetischen Polyethylenterephthalat(PET)-Gegenbogen. Die Flüssigkeit in den Vertiefungen kann durch verschiedene Prozesse (Photohärtung, Verglasung durch Befüllen bei erhöhter Temperatur und Abkühlen, Lösungsmittelverdampfung) verfestigt werden. Der verfestigte Abdruck (rot) wird durch Aufbringen einer Haftschiicht (gelb) aus der Form herausgezogen; die Haftschiicht hat eine höhere Oberflächenenergie als die Form. Schließlich werden die Partikel durch Auflösen der Haftschiicht in freier Form erhalten. b) PRINT-Apparaturen: A) Herstellung dünner Abgussformen. B) Kontinuierliches Roll-to-Roll-PRINT-Verfahren. Abdruck nach Lit. [14] mit Genehmigung von Future Medicine Ltd.

gleichzeitiger Verringerung der Wirkstoffexposition auf gesunde Zellen zu erhöhen.^[3c,33] Zum Transport von Docetaxel, Camptothecin, Desatinib und Gemcitabin untersuchten wir unter Verwendung des PRINT-Prozesses zwei verschiedene Partikelmatrices: PLGA, ein lipophiler, biologisch abbaubarer thermoplastischer Kunststoff, sowie auf vernetztem PEG basierende Hydrogelmaterialien.

PLGA wurde in mehreren Studien verwendet, um Therapeutika physikalisch einzuschließen und wieder freizusetzen.^[7a,34] Mit Docetaxel beladene PLGA-Partikel wurden unter Verwendung von Emulsions-,^[35] Mikrofluidik-,^[36] Filmrehydrierungs-^[37] und Ultraschalltechniken hergestellt.^[38] Die Beladung von PLGA-Partikeln mit Docetaxel lag im Bereich von 0.5 bis 15 %, wobei die Verkapselungseffizienz für den Wirkstoff zwischen 11 und 95 % betrug. Der PRINT-Prozess ermöglichte eine Beladung von zylindrischen PLGA-Partikeln (Durchmesser $d = 200 \text{ nm}$; Höhe $h =$

200 nm) mit 40 % Docetaxel bei einer Verkapselungseffizienz für den Wirkstoff von 90 %.^[17] Die In-vitro-Wirksamkeit von PRINT-PLGA-Partikeln, die verschiedene Konzentrationen Docetaxel (0–40 %) enthielten, gegenüber der Eierstockkrebs-Zelllinie SKOV3 wurde mit der klinisch verabreichten Form von Docetaxel, Taxotere, verglichen. Die nicht mit Wirkstoff beladenen Partikel erwiesen sich als nicht toxisch, und mit Docetaxel beladene Partikel zeigten eine dosisabhängige Zytotoxizität. PRINT-PLGA-Partikel, die 10 bzw. 20 % Docetaxel enthielten, waren etwas weniger toxisch als Taxotere, während Partikel mit 30 bzw. 40 % Docetaxel bei äquivalenten Dosen toxischer waren. Die mit 40 % Docetaxel beladenen PRINT-PLGA-Partikel hatten einen IC_{50} -Wert, der um fast eine Größenordnung höher lag als der von Taxotere und 30-mal höher als der von mit 10 % Docetaxel beladenen Partikeln. Diese Studie zeigte, dass Docetaxel in PRINT-PLGA-Partikeln mit außergewöhnlich hohen Bela-

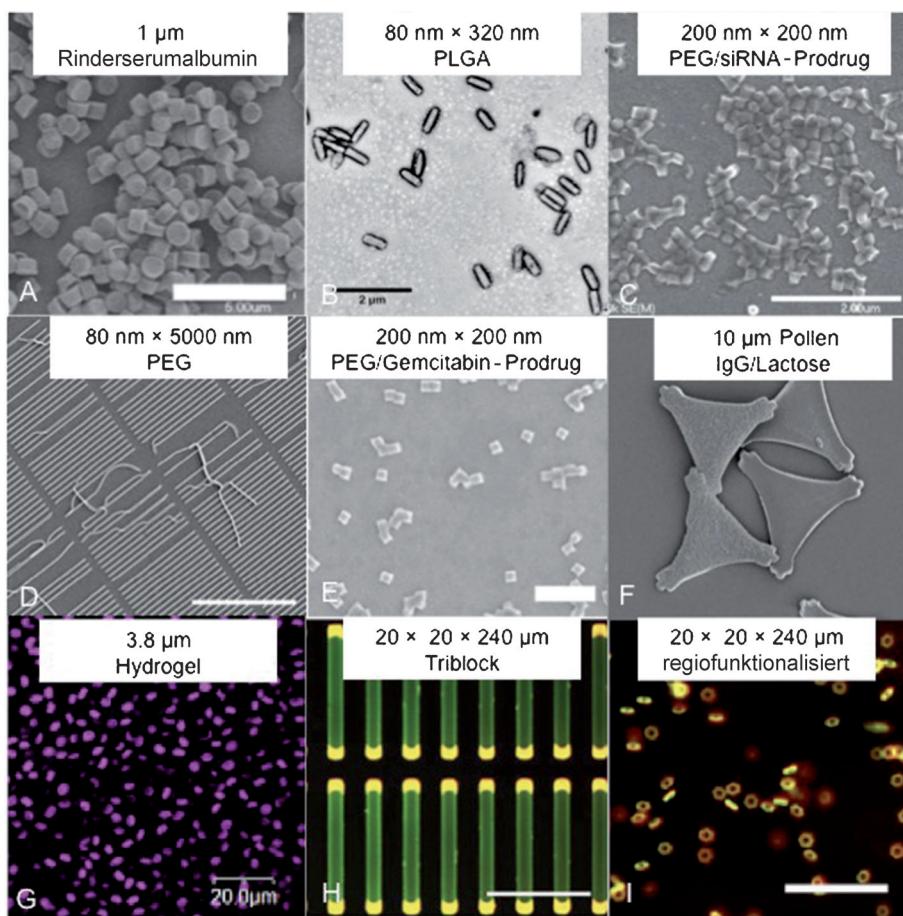


Abbildung 2. Rasterelektronen- und lichtmikroskopische Aufnahmen, die die Fähigkeit des PRINT-Verfahrens zur Synthese von Partikeln mit verschiedenen Formen, Größen und Zusammensetzungen demonstrieren. Wiedergabe von (A)^[20], (B)^[21], (C)^[22], (D)^[16b], (E)^[23], (F)^[24], (G)^[25], (H)^[26] und (I)^[19] mit Genehmigung.

dungen verkapselt und in seiner aktiven Form freigesetzt werden kann. Die Ergebnisse deuten auch darauf hin, dass eine höhere Wirkstoffbeladung die Wirksamkeit des Wirkstoffs bei geringeren Dosen erhöhen kann. Darüber hinaus zeigten In-vivo-Studien, dass aus PLGA-PRINT-Partikeln freigesetztes Docetaxel eine erhöhte Plasmaexposition und eine bessere Tumorbelieferung als freies Docetaxel erreichte.^[39] Zukünftige Arbeiten werden sich auf die Optimierung des Systems hinsichtlich der In-vivo-Wirksamkeit konzentrieren.

In das biokompatible Hydrogel PEG können Prodrugs durch kovalente Verknüpfung mit der PEG-Matrix eingebaut werden.^[40] Der niedrigere pH-Wert an Tumorstellen und in Tumorzellen kann für die Freisetzung des Wirkstoffs in seiner aktiven Form am Ort des Tumors genutzt werden. Unsere Arbeitsgruppe hat eine neue Klasse von Prodrug-Linkerchemie basierend auf Bis(dialkyl)silylthern entwickelt, die die Möglichkeit bietet, die Wirkstofffreisetzung in sauren Umgebungen durch Variation der Alkylsubstituenten am Silicium abzustimmen.^[16a, 23] Mit Silylthern funktionalisiertes Camptothecin, Desatinib und Gemcitabin wurden jeweils synthetisiert und mittels radikalischer Polymerisationsmethoden in PRINT-PEG-Hydrogelpartikel eingebaut (Abbildung 3). Die Freisetzungsgeschwindigkeiten des Wirkstoffs

aus zylindrischen Partikeln ($d = 200 \text{ nm}$; $h = 200 \text{ nm}$) stiegen mit abnehmender Größe des Substituenten am Siliciumatom (Ethyl $>$ Isopropyl $>$ *tert*-Butyl), wobei das Prodrug mit dem größten Substituenten keine merkliche Zersetzung mit der Zeit zeigte. Zellvermehrungsexperimente ergaben, dass die Partikel, die das Ethyl- und Isopropyl-basierte Prodrug Gemcitabin enthielten, gegenüber LNCaP-Krebszellen toxisch waren, während Partikel, die das *tert*-Butyl-basierte Prodrug enthielten, die gleiche Zytotoxizität zeigten wie die reinen Partikel, was belegt, dass der Wirkstoff zwar eingebaut werden kann, aber nicht innerhalb eines relevanten Zeitraums wieder freigesetzt wird. Die Substituenten am Siliciumatom können verändert werden, um die gewünschte Wirkstofffreisetzungskinetik zu erreichen. Außerdem erlauben die Silylther-basierten Prodrugs bei Bindungsspaltung eine Freisetzung des Wirkstoffs in seiner Originalform unter Erzeugung von nicht toxischen, wasserlöslichen Polymeren.

Das PRINT-Verfahren ermöglicht einen Plug-and-Play-Ansatz für den Transport kleiner Moleküle und erlaubt die freie Wahl der Partikelmatrix entsprechend der Art des Wirkstoffs sowie eine gesteuerte Wirkstoffbeladung und -freisetzung. Insbesondere ermöglicht die Verwendung von Prodrugs eine präzise Wirkstofffreisetzung aus Partikeln als Reaktion auf Veränderungen in der chemischen Umgebung.

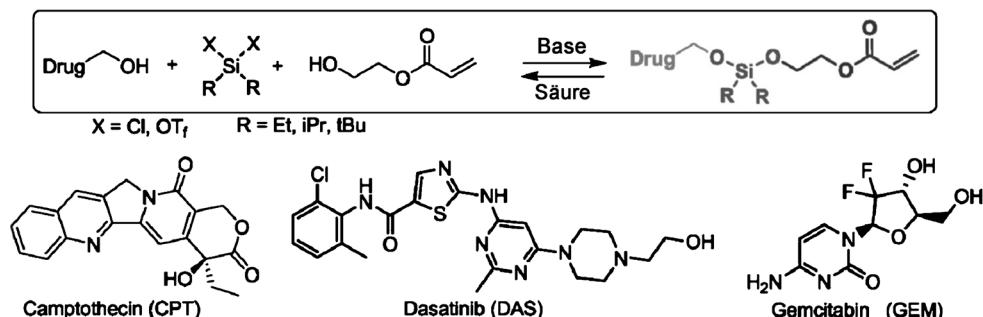


Abbildung 3. Prodrugs von Camptothecin, Dasatinib und Gemcitabin als unsymmetrische, difunktionelle Silylether (ABS). Jedes ABS-Prodrug besteht aus drei Teilen: 1) einem Chemotherapeutikum, 2) einer Silylether-Verknüpfung und 3) einem polymerisierbaren Monomer für den Partikel-einbau. Abdruck nach Lit. [23]; Copyright 2012, American Chemical Society.

Das Verhalten wirkstoffbeladener Partikel gegenüber einer Reihe von In-vivo-Tumormodellen ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

3.2. Schutz und Transport von Biopharmazeutika

Die Vielseitigkeit des PRINT-Verfahrens zeigt sich auch in der Fähigkeit, Therapeutika auf der Basis von kurzer interferierender RNA (siRNA) und RNA-Replikons zu transportieren. Das RNA-Therapeutikum siRNA besitzt erhebliches Potenzial bei der Behandlung von Krankheiten wie Brustkrebs oder Prostatakrebs, indem die Genexpression von Zielproteinen ausgeschaltet und so die Möglichkeit der „Therapie des Untherapierbaren“ eröffnet wird.^[41,42] Ein RNA-Replikon kann für therapeutisch erwünschte Proteine in hohen Konzentrationen im Zytosol von Zellen kodieren und ist daher recht vielversprechend als Auslöser für Immunantworten gegen zahlreiche Krankheiten, angefangen von Influenza bis hin zu verschiedenen Krebserkrankungen.^[43] Ein idealer Träger sollte die RNA schützen, zum interessierenden Ort transportieren, eine Internalisierung durch die Zielzellen erreichen und die RNA im Zytosol mit minimaler Toxizität freisetzen können. Mithilfe des PRINT-Verfahrens haben wir ein siRNA-PLGA-Lipid-Nanopartikelssystem und ein Prodrug-siRNA-PEG-Nanopartikelssystem zum Transport von siRNA sowie ein vernetztes Rinderserumalbumin(BSA)-Partikelssystem zum Transport des RNA-Replikons entwickelt.

Die überwiegende Mehrheit der in der Literatur beschriebenen Strategien zum Transport von siRNA betrifft die Bildung von Polyplexen. Mittels einer Schmelzverfestigungsmethode wurden 1–2 Gew.-% siRNA in zylindrische PLGA-Partikel ($d = 80 \text{ nm}$; $h = 320 \text{ nm}$) mit einer Verkapselfungs effizienz zwischen 20 und 40 % eingebaut.^[21] Die Partikel wurden mithilfe einer Lösung kationischer Lipide (DOTAP/DOPE 50:50 Gew.-%; DOTAP = 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan, DOPE = Dioleoylphosphatidylethanolamin) aus der Adhäsionsschicht gewonnen. Oberflächenmodifizierungen mit kationischem Lipid erleichtern die Zellinternalisierung und Transfektion. Beschichten der Partikel mit kationischen Lipiden erhöhte das Zeta-Potential der Partikel ($-3.45 \pm 1.9 \text{ mV}$ ohne Lipidbeschichtung gegenüber

$+5.29 \pm 1.5 \text{ mV}$ mit Lipidbeschichtung), und farbstoffmarkierte siRNA-haltige Partikel mit Lipidbeschichtung wurden von verschiedenen Zelllinien, einschließlich HeLa/Luc, PC3, DU145 und Raw264.7, bereitwillig internalisiert. Bei LNCaP- und HepG2-Zellen zeigte sich eine geringere Effizienz bei der Partikelaufnahme, was wahrscheinlich eine Folge der langen Verdopplungszeit dieser Zelllinien ist. Luciferase-siRNA-Knockdown-Studien zeigten, dass die lipidbeschichteten PLGA-Partikel in der Lage waren, Luciferase-siRNA zu transportieren und die Luciferase-Expression in HeLa/Luc-Zellen mit minimaler Toxizität wirksam auszuschalten. Weitere Studien ergaben, dass die siRNA-PLGA-Lipidpartikel eine therapeutisch relevante KIF11-siRNA zu drei Prostatakrebs-Zelllinien (LNCaP, PC3 und DU145) transportieren konnten. Quantitative Echtzeit-PCR zeigte eine statistisch signifikante Verringerung des KIF11-mRNA-Niveaus bei allen drei mit KIF11-siRNA-PLGA-Partikeln dosierten Prostatakrebs-Zelllinien, während die mit Kontroll-siRNA beladenen Partikel keinerlei Verringerung des KIF11-mRNA-Niveaus zeigten.

Es gibt nur wenige Berichte über hydrogelbasierte Partikel zum Transport von siRNA. Die Beispiele beschränken sich auf emulsionsbasierte Herstellungstechniken und Basenpaarung zwischen komplementären siRNA-Strängen.^[44] Das PRINT-Verfahren erlaubt nun den direkten physikalischen Einschluss von siRNA in PEG-Hydrogelpartikel.^[22] Wir konnten mit monodispersen, zylindrischen PEG-Partikeln ($d = 200 \text{ nm}$; $h = 200 \text{ nm}$), die mit elektrostatisch eingeschlossener siRNA hergestellt wurden, eine signifikante Abschaltung von siRNA erreichen. Nachfolgende Bemühungen zur Modulierung des In-vivo-Verhaltens durch Konjugation von dirigierenden Liganden an die Partikeloberfläche führten jedoch zu einer erheblichen vorzeitigen Freisetzung von siRNA.

Um diese vorzeitige Freisetzung von siRNA während der Konjugation von dirigierenden Liganden zu verringern, wurde die siRNA unter Verwendung einer Prodrug-Strategie in die Hydrogelmatrix einpolymerisiert. Die siRNA wurde mit einem photopolymerisierbaren Acrylat derivatisiert, das eine abbaubare Disulfidverknüpfung für einen reversiblen, kovalenten Einbau in die PRINT-Hydrogel-Nanopartikel trug (Abbildung 4). Die zeitabhängige Freisetzung der siRNA aus den Prodrug-siRNA-PRINT-Hydrogelpartikeln wurde unter

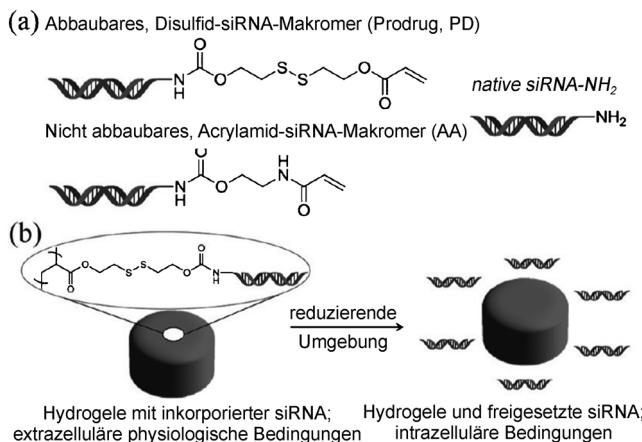


Abbildung 4. a) Strukturen von abbaubaren und nicht abbaubaren siRNA-Makromeren sowie nativer siRNA. b) Verhalten des pro-siRNA-Hydrogels unter physiologischen und intrazellulären Bedingungen. Abdruck nach Lit. [22]; Copyright 2012, American Chemical Society.

physiologischen und reduzierenden Bedingungen bestimmt. Die siRNA wurde bei 37°C in PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) mehr als 48 h lang in den Hydrogelpartikeln zurückgehalten; beim Inkubieren in einer reduzierenden Umgebung (5 mM Glutathion) wurde die siRNA jedoch rasch aus den Prodrug-siRNA-Hydrogelpartikeln freigesetzt. Außerdem war die in PRINT-Hydrogelpartikel geladene Prodrug-siRNA bei Inkubation in Serum mehr als 48 h vor einem Abbau durch RNasen geschützt. Prodrug-siRNA enthaltende Hydrogelpartikel lösten wirksam ein dosisabhängiges Ausschalten der Luciferase-Expression in HeLa/Luc-Zellen aus, während Kontrollpartikel keine signifikante Genabschaltung bewirkten. Die Transfektionseffizienz von komplexierter siRNA, PEGylierten Partikeln und Prodrug-siRNA-Hydrogelen war vergleichbar.

Der Transport von RNA-Replikons erfolgt meist mit virusähnlichen Partikeln (VLPs) als vorherrschender Technik.^[45] Hinsichtlich einer Steuerung von Größe, Form und Oberflächenchemie wäre ein nichtvirales Transportsystem vorteilhaft. Der Transport eines RNA-Replikons, also hochmolekularer (8–10 kb), einsträngiger RNA, wurde unter Verwendung einer Rinderserumalbumin(BSA)-Matrix erreicht.^[20] Proteinmatrices für den Wirkstofftransport sind aufgrund ihrer biologischen Abbaubarkeit, biologischen Verträglichkeit und Zugänglichkeit für Oberflächenmodifizierungen äußerst nützlich. Bei der Herstellung von zylindrischen Proteinpartikeln ($d=1\text{ }\mu\text{m}$; $h=1\text{ }\mu\text{m}$) mit Lactose und Glycerin als Additive wurde eine Schmelzverfestigungsstrategie eingesetzt. Die BSA-Partikel wurden mit reduktiv labilem Dithiobis(ethyl-1*H*-imidazol-1-carboxylat) (DIC) vernetzt, was die proteinbasierten Partikel vorübergehend unlöslich in wässrigen Lösungen machte, bis sie in eine reduzierende Umgebung eingebracht wurden. Um die Fähigkeit der Partikel zum Transport von Beladungen in einer reduzierenden Zellumgebung zu demonstrieren, wurde ein RNA-Replikon gewählt, das für das Chloramphenicolacetyltransferase(CAT)-Protein kodiert. Der erfolgreiche Transport dieser RNA in das Zytosol von Vero-Zellen sollte eine

Expression von CAT-Protein ergeben, das unter Verwendung von antigenspezifischen Antikörpern mittels ELISA nachgewiesen werden kann. Dabei wurde TransIT-mRNA-Transfektionsreagens (TransIT) mit BSA-Partikeln vermischt, um eine positive Oberflächenladung auf den BSA-Partikeln einzuführen und so die Zellaufnahme und die Freilassung aus dem Endosom zu verbessern. Die mit TransIT beschichteten BSA-Partikel wurden bereitwillig internalisiert, und das CAT-Protein wurde erzeugt (Abbildung 5). Die Produktion des CAT-Proteins nach Transport durch PRINT-Partikel war vergleichbar mit der Produktion bei Verwendung des Transfektionsmittels TransIT allein.

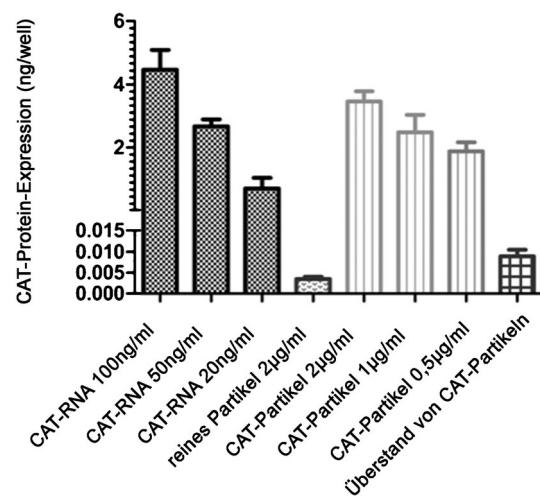


Abbildung 5. Durch Vero-Zellen (2×10^4 Zellen pro Vertiefung) erzeugtes CAT-Protein, gemessen mittels ELISA. Schwarz gepunktet: CAT-RNA-Standards mit TransIT; grau gepunktet: unbehandelte Partikel mit TransIT; gestrichelt: CAT-RNA enthaltende BSA-Partikel mit TransIT (2, 1 und 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Partikel entsprechen 30, 15 bzw. 7.5 ng mL^{-1} RNA); kariert: Überstand von Partikeln, die 4 h lang in PBS bei 37°C mit TransIT inkubiert wurden. Abdruck nach Lit. [20]; Copyright 2012, American Chemical Society.

Zusätzlich zum Einbringen einer Ladung in die PRINT-Partikel können biologische Präparate auch durch Absorption auf der Partikeloberfläche geschützt und transportiert werden. Es ist seit langem bekannt, dass in Partikelform gegebene Antigene im Vergleich zu löslichen Antigenen Antikörpertiter erhöhen. Die verbesserte Präsentation der Impfstoffantigene im Immunsystem wurde mit einem auf PRINT-Partikeln basierenden System erreicht, bei dem ein kommerzieller, trivalenter, injizierbarer Influenzaimpfstoff elektrostatisch an die Oberfläche von kationischen PLGA-Partikeln gebunden wurde.^[46]

Diese Ergebnisse zeigen, dass PRINT-Partikel die sensible biopharmazeutische Beladung sehr gut schützen und transportieren können. Die Beladung kann je nach deren Natur und chemischer Zusammensetzung der Partikel in Prodrugform, entweder physikalisch verkapselt oder absorbiert, eingebaut werden. Der nächste Schritt ist eine weitere Optimierung des Partikeldesigns für einen erfolgreichen

RNA-Transport in vivo und einen Antigentransport für die Impfstoffentwicklung.

4. Materialwissenschaften

Neben den vielfältigen Anwendungen in den Biowissenschaften eröffnet die PRINT-Technologie auch beträchtliche Möglichkeiten für die Materialwissenschaft. Ein Beispiel sind Anwendungen in der Entwicklung von Mikrolinsen und Solarzellen.^[47,48] Ein besonders interessanter Bereich ist die Herstellung von Mikro- und Nanopartikeln zur Untersuchung der kolloidalen Selbstorganisationen. Ähnlich wie Atome größere Strukturen wie Moleküle, Polymere und Kristalle aufbauen, können kolloidale Partikel zu größeren Strukturen wie Cluster oder Ketten angeordnet werden, wenn die kurz- und langreichweitigen Wechselwirkungen zwischen Partikeln in einem ausgewogenen Verhältnis stehen.^[49] Dies hat weitreichende Auswirkungen auf das Verständnis von Bindungen auf atomarem Niveau und erweist sich zunehmend als hilfreich bei der Entwicklung von Katalysatoren sowie optischen, plasmonischen und elektronischen Funktionseinheiten.^[50] Unsymmetrische und anisotrope Partikel haben im Bereich der Photonik viel Aufmerksamkeit auf sich gezogen, wo andere Phasen mit einer komplexeren Symmetrie als kubisch flächenzentriert, hexagonal dicht gepackt oder kubisch innenzentriert erwünscht sind.^[51,52] Während die Herstellung und Selbstorganisation von anorganischen, anisotropen Partikeln gut untersucht ist, bleiben hinsichtlich der Organisation von Polymerpartikeln noch einige Fragen offen. Dies mag an einem Mangel an effizienten und skalierbaren Herstellungsprozessen liegen, die den Anforderungen an Partikelmonodispersität und Formkontrolle für eingehende Untersuchungen genügen. Mit der Entwicklung von PRINT lassen sich diese Beschränkungen jedoch umgehen, was eine spannende Möglichkeit zur Untersuchung von multifunktionellen, einzigartig geformten Partikeln bietet.

4.1. Partikelorganisation durch elektrische und magnetische Felder

Die Dielektrophorese (DEP), d. h. die Wechselwirkung von Flüssigkeiten oder Partikeln mit inhomogenen, alternierenden elektrischen Feldern, ist eine leistungsstarke Methode, um Partikel *in situ* durch gerichtete Selbstorganisation anzugeordnen.^[53] In den meisten Beispielen für eine elektrophoretische Organisation wurden sphärische Partikel angeordnet, jedoch hat man in jüngerer Zeit auch nichtsphärische Partikel betrachtet, deren gezielte Anordnung in spezifische Richtungen vielversprechend ist, um verbesserte mechanische und elektrische Eigenschaften zu erhalten.^[54,55]

Da die PRINT-Technik die Herstellung anisotroper Partikel mit einer großen Vielfalt an Formen und Größen erlaubt, erschien es naheliegend, die Methode zur Untersuchung der Selbstorganisation verschiedener organischer Partikel zu nutzen.^[56] Wir haben stab-, scheiben-, bumerangförmige und sechskantige Partikel aus Trimethylolpropanethoxyltriacylat hergestellt und in einer wässrigen

Lösung von Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB) suspendiert. Bei Anwendung eines inhomogenen, alternierenden elektrischen Feldes zwischen zwei planaren Elektroden wurden die Partikel polarisiert und in Richtung der Region mit der höchsten Feldintensität ausgerichtet. Bei diesem Prozess reorientierten sich die Partikel und zeigten eine Anordnung, in der ihre längste Achse parallel zum angelegten Feld ausgerichtet ist (Abbildung 6a). Bei allen Partikelformen, mit Ausnahme der Bumerangpartikel, wurde eine Kettenbildung beobachtet.

Aufbauend auf dieser Arbeit haben wir magnetische Polymerkompositpartikel hergestellt, indem wir superparamagnetische und ferromagnetische Magnetitnanopartikel in PEG-Hydrogelpartikel inkorporiert haben.^[57] Partikel, die aus Fe₃O₄-Nanopartikeln eingebettet in ein PEG-Netzwerk

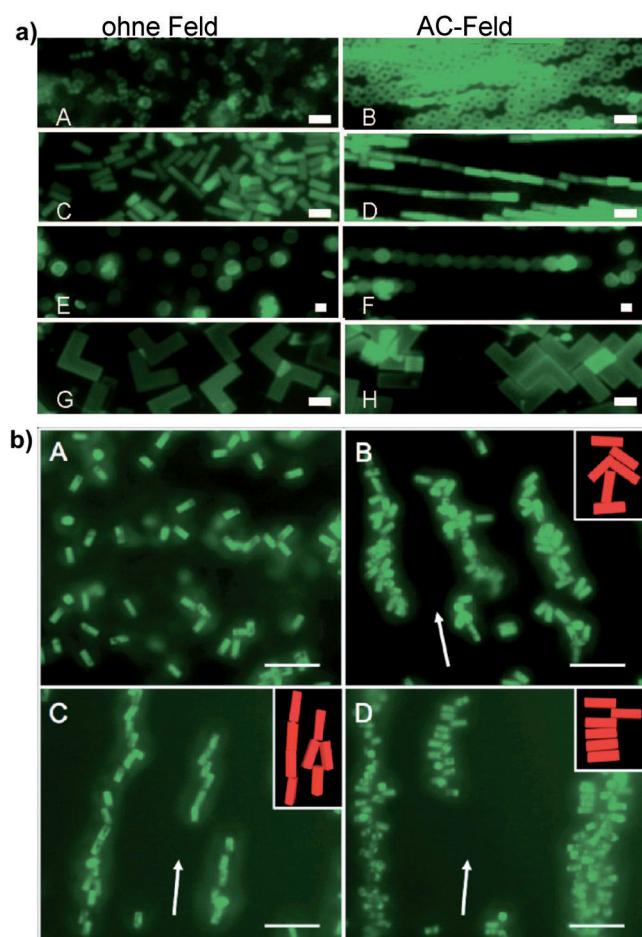


Abbildung 6. a) Fluoreszenzaufnahmen von zufällig verteilten (A, C, E, G) und im elektrischen Feld ausgerichteten Partikeln (B, D, F, H). Abdruck nach Lit. [56]; Copyright 2008, American Chemical Society. b) Fluoreszenzaufnahmen von selbstorganisierten Magnetit-Polymer-Kompositpartikeln: A) Blockförmige Kompositpartikel in Abwesenheit eines Magnetfelds; B) Partikel ohne lineare Magnetit-Aggregate bilden im Magnetfeld ungeordnete Ketten, C) Partikel mit linearen Magnetit-Aggregaten parallel und D) senkrecht zur Länge der Kompositpartikel bilden einigermaßen geordnete Ketten mit einer Kopf-an-Schwanz- bzw. Seite-an-Seite-Ausrichtung. Die Einschübe dienen einer klareren Darstellung. Maßstab jeweils 20 µm. Die Pfeile geben die Richtung des angelegten Magnetfelds an. Abdruck nach Lit. [57]; Copyright 2010, American Chemical Society.

bestanden, wurden in Form von Nanoreis, Nanowürmern, mikrometergroßen Blöcken und mikrometergroßen Bumerangs hergestellt. Die PRINT-Technik ermöglichte dabei auf einzigartige Weise eine Manipulation der Ausrichtung der Fe_3O_4 -Nanopartikel innerhalb dieser Partikel. Vor der Polymerisation der PEG-Monomere im Herstellungsschritt kann das Magnetit permanent in verschiedene Richtungen in Bezug auf die Achse des Kompositpartikels ausgerichtet werden, was bei der Festlegung der Partikeldynamik in Magnetfeldern eine maßgebliche Rolle spielt.

Mit Fe_3O_4 -Nanopartikeln beladene Blockpartikel wurden in hohen Konzentrationen in Wasser dispergiert, und je nach Richtung der langen Achse der Fe_3O_4 -Nanopartikel in der Matrix wurden drei verschiedene Formen von Kettenbildung der Blockpartikel im Magnetfeld beobachtet (Abbildung 6b). Proben mit Magnetit-Aggregaten, die entlang der langen Achse der Partikel ausgerichtet waren, bildeten Ketten, bei denen alle Partikel entlang des Magnetfelds ausgerichtet waren. Proben mit linearen Fe_3O_4 -Aggregaten, die entlang der kurzen Achse der Partikel ausgerichtet waren, bildeten Ketten aus gestapelten Kompositpartikeln. Proben mit nicht ausgerichtetem Magnetit zeigten schließlich eine Kettenbil-

dung ohne spezifische Orientierung der Partikel. So ermöglicht uns das PRINT-Verfahren, über das erste Beispiel von form- und größenspezifischen, magnetischen Polymerkompositnanopartikeln zu berichten, die unter Verwendung eines Top-down-Verfahrens hergestellt wurden.

4.2. Organisation über Van-der-Waals-Wechselwirkungen

Es wurde bereits gesagt, dass Diblock- und Triblockpartikel mittels verschiedener Methoden synthetisiert werden können.^[58] Die PRINT-Technologie zeigt jedoch mehr Flexibilität bei der Steuerung von Zusammensetzung, Größe und Form von Diblock- und Triblockpartikeln. So wurde mithilfe dieses Verfahrens die Synthese von anisotropen, amphiphilen Stäben aus organischen Materialien mit einstellbaren Multiphasen erreicht.^[26] Es können amphiphile, stabförmige Diblock-, Triblock- und Multiblockpartikel hergestellt werden, die aus der hydrophoben Verbindung Trimethylolpropanethoxylatatriacrylat und der hydrophilen Verbindung Poly(ethylenglykol)diacrylat bestehen (Abbildung 7). Hierbei ist hervorzuheben, dass das hydrophil/hydrophob-Ver-

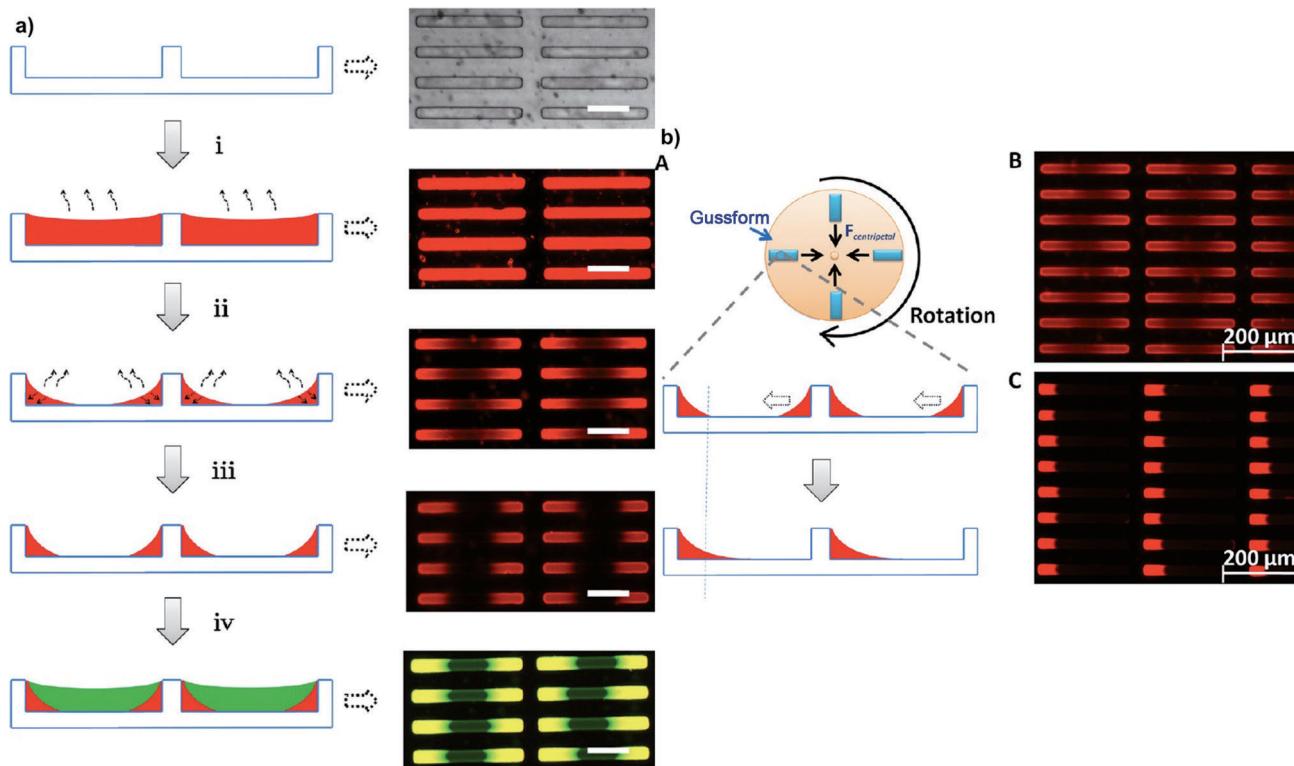


Abbildung 7. a) Prinzip der Bildung von Dreiblockstäben mit den zugehörigen mikroskopischen Aufnahmen der Formen in jedem Schritt. Die Herstellung der Dreiblockpartikel beginnt mit dem Füllen der Form mit einer verdünnten Lösung des hydrophilen Monomers in DMF (i). Mit dem Entfernen des Lösungsmittels durch Verdampfen wird das verbliebene Monomer durch Kapillarkräfte an beiden Enden der rechteckigen Formvertiefung nach oben gezogen (ii) und anschließend einer UV-Lichtquelle mit niedriger Intensität ausgesetzt, wodurch das Monomer in ein weiches Gel umgewandelt wird (iii). Das zweite hydrophobe Monomer wird zugegeben, um den verbliebenen Raum in der Mitte der Vertiefung zu füllen (iv). Die endgültige Monomerzusammensetzung wird durch Bestrahlen mit intensiver UV-Strahlung vollständig gehärtet. b) Prinzip der Bildung von Zweiblockstäben: A) Unsymmetrische Zweiblockpartikel wurden hergestellt, indem die Form um eine Achse senkrecht zur Formebene rotiert wurde. B) Die Form wurde zunächst mit dem hydrophilen Monomer gefüllt. C) Die Zentrifugalkräfte ziehen die hydrophile Monomerzusammensetzung an das äußere Ende der Formvertiefung. Anschließend wird das hydrophobe Monomer verwendet, um den freien Raum aufzufüllen, was bei vollständiger Photohärtung zu einer Reihe verschiedener amphiphiler Zweiblockstäbe führt. Abdruck nach Lit [26]; Copyright 2012, American Chemical Society.

hältnis der Triblock- und Diblockstrukturen durch Veränderung der Konzentration der anfänglichen Monomerlösung exakt eingestellt werden kann.

Darüber hinaus wurde die Selbstorganisation dieser amphiphilen Triblock- und Diblockpartikel an der Wasser/Perfluordecalin(PFD)-Grenzfläche untersucht (Abbildung 8). Die Triblockpartikel bevorzugten eine Seite-an-Seite-Anordnung und bildeten so geordnete Bandstrukturen an der Grenzfläche und verhielten sich wie Bolaamphiphile. Diblockpartikel, die eine unsymmetrische Struktur ähnlich der von molekularen Tensiden aufwiesen, organisierten sich an der Wasser/PFD-Grenzfläche in einer zweidimensionalen Doppelschichtstruktur. Diese neue Arbeit beleuchtet sehr schön die Beziehung zwischen Partikelarchitektur und deren Selbstorganisationsverhalten.

Die vorgenannten Arbeiten zeigen die Vielseitigkeit von PRINT hinsichtlich der Möglichkeit, die kolloidale Ausordnung von einzigartigen organischen Partikeln zu untersuchen. Die hier diskutierten Arbeiten stellen nur eine kleine Auswahl dar, die das Potenzial von PRINT in Bezug auf dessen erheblichen Einfluss auf Anwendungen sowie das grundlegende Verständnis von materialwissenschaftlichen Prinzipien beleuchten. Da die Herstellung von PRINT-Partikeln mit eingebetteten Janus- und magnetischen Nanopartikeln einen Herstellungsweg umfasst, der leicht von der üblichen PRINT-

Methode abweicht, müssten für eine skalierbare Herstellung dieser Partikelarten erhebliche Veränderungen vorgenommen werden. Derzeit entwickeln wir andere Strategien zur Herstellung ähnlicher anisotroper Partikel, die in einem kontinuierlichen Roll-to-Roll-Prozess skalierbar sein könnten.

5. Zusammenfassung und Ausblick

In der Biologie und Materialwissenschaft wächst zunehmend die Erkenntnis, dass Partikelgröße, chemische Zusammensetzung und Oberflächeneigenschaften von Partikeln eine entscheidende Rolle spielen. PRINT bietet nun die erste GMP-kompatible Möglichkeit zur Herstellung monodisperser Partikel aus einem weiten Bereich an Matrizes bei vollständiger Kontrolle der physikochemischen Eigenschaften des Partikels. Wir haben eine breite Vielfalt von einzigartigen Mikro- und Nanopartikeln entwickelt und untersuchen derzeit deren Potenzial für Anwendungen beim Wirkstofftransport und für die kolloidale Selbstorganisation.

Im Abschnitt über Biowissenschaften haben wir gezeigt, dass die PRINT-Technologie fein und vielseitig genug für den Transport einer breiten Vielfalt von aktiven Therapeutika ist, einschließlich niedermolekularer Wirkstoffe, siRNA und

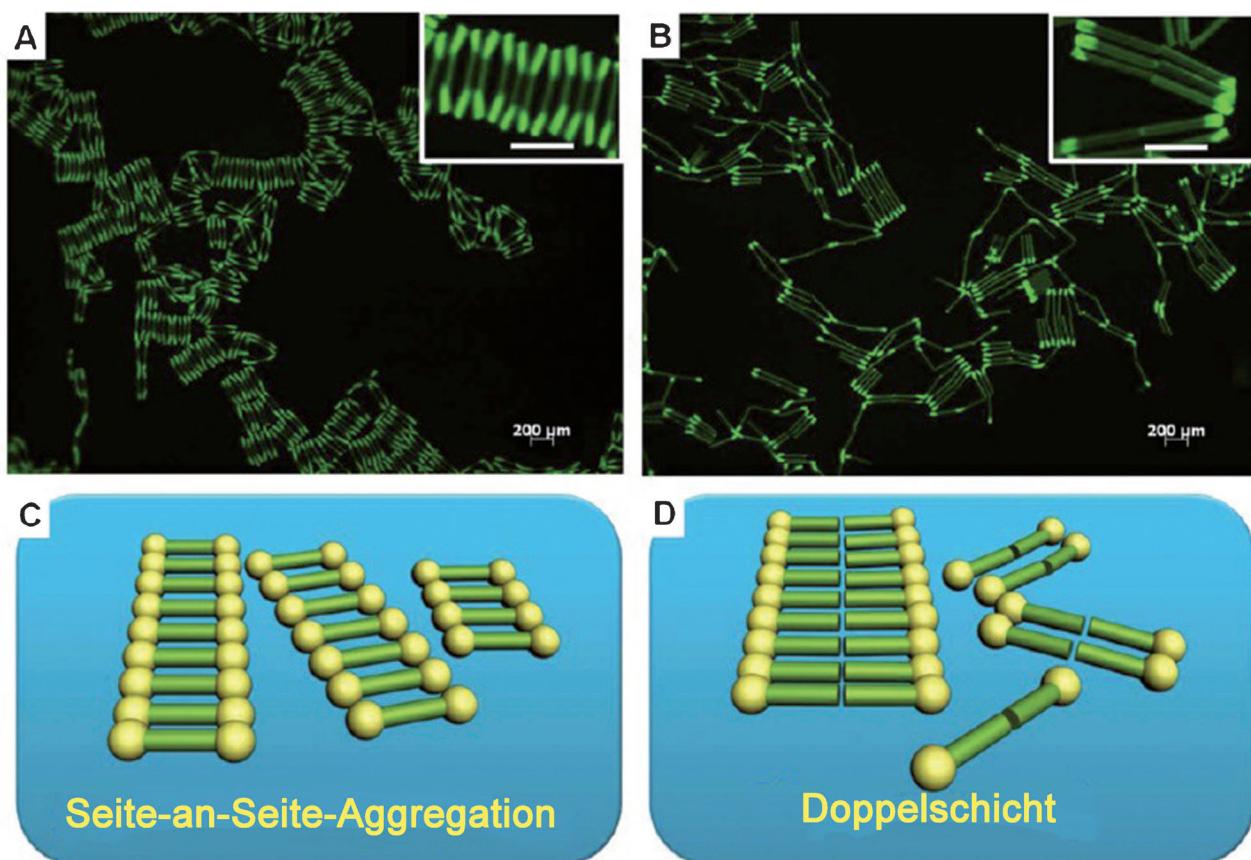


Abbildung 8. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen verschiedener Partikel, die sich an der Wasser/PFD-Grenzfläche organisiert haben. A) Hydrophile/hydrophobe/hydrophile ABA-Dreiblockpartikel. B) Zweiblockpartikel. Der Maßstab in den Einschüben entspricht 200 µm. Darstellung der Selbstorganisationsmodelle für Partikel an der Wasser/Öl-Grenzfläche: C) Dreiblock- und D) Zweiblockpartikel. Abdruck nach Lit. [26]; Copyright 2012, American Chemical Society.

RNA-Replikons. Im Hinblick auf den Transport von bio-pharmazeutischen Substanzen liegt der Schwerpunkt unserer Arbeit auf der Verwendung von Reportergen, Proteinen oder Peptiden zur Optimierung des Systems für einen erfolgreichen Transport *in vivo*. Der Schwerpunkt zukünftiger Arbeiten wird auf der Verwendung der PRINT-Partikel für den In-vivo-Transport von Therapeutika oder Kontrastmitteln in den Bereichen Prävention, Nachweis, Diagnose und Behandlung von Krankheiten liegen. Mittelfristig erwarten wir die Entwicklung von Partikelsystemen für spezifische Erkrankungen und spezifische therapeutische Ziele. Dabei werden PRINT-Partikel für eine gegebene therapeutische Anwendung speziell entwickelt, um Zell- oder Gewebeselektivität sowie gewünschte Freisetzungssprofile zu erreichen. Schließlich könnten die einzigartigen Eigenschaften der PRINT-Technologie einen grundlegenden Wandel in der Entwicklung und Verabreichung von Wirkstoffen herbeiführen.

Im Abschnitt über Materialwissenschaften haben wir Strategien für die Erzeugung von Partikeln mit einzigartigen Größen, Formen und Zusammensetzungen sowie deren gezielte Anordnung mittels elektrischer Felder, Magnetfelder oder über Van-der-Waals-Wechselwirkungen vorgestellt. In weiteren Studien werden wir uns mit dem Einfluss der verschiedenen chemischen Zusammensetzungen, Größen und Formen auf die Partikelmanipulation beschäftigen. Neben der Grundlagenforschung sind wir auch an der Anwendung dieser Partikel für Entwicklungen im Bereich der Katalyse sowie für optische, plasmonische und elektronische Funktionseinheiten interessiert. Hier wird sich unsere Aufmerksamkeit insbesondere auf Anwendungen richten, bei denen Wechselwirkungen formspezifischer Partikeln vorteilhaft eingesetzt werden können, insbesondere beim Design neuer, leichter, hochfester struktureller Komposite.

Diese Arbeit wurde durch folgende Institutionen unterstützt: Liquidia Technologies, Carolina Center for Cancer Nanotechnology Excellence (U54A151652), University Cancer Research Fund, Pioneer Award der NIH (IDP10D006432), R01 (R01EB009565), National Science Foundation (DMR-0923604 und DMR-0906985). Wir danken Crista Farrell für Vorschläge zum Manuscript.

Eingegangen am 15. November 2012
Online veröffentlicht am 13. Mai 2013

Übersetzt von Dr. Christiane Feldmann-Leben, Ettlingen.

- [1] a) Y. Bae, S. Fukushima, A. Harada, K. Kataoka, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4788–4791; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4640–4643; b) K. K. Perkin, J. L. Turner, K. L. Wooley, S. Mann, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1457–1461.
- [2] a) X. Guo, F. C. Szoka, *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 335–341; b) J. Du, S. P. Armes, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12800–12801.
- [3] a) R. W. Malone, P. L. Felgner, I. M. Verma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 6077–6081; b) M. E. O'Brien, N. Wigler, M. Inbar, R. Rosso, E. Grischke, A. Santoro, R. Catane, D. G. Kieback, P. Tomczak, S. P. Ackland, F. Orlandi, L. Mellars, L. Allard, C. Tendler, *Ann. Oncol.* **2004**, *15*, 440–449; c) O. C. Farokhzad, R. Langer, *ACS Nano* **2009**, *3*, 16–20.

- [4] a) F. Meng, Z. Zhong, J. Feijen, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 197–209; b) D. A. Christian, S. Cai, D. M. Bowen, Y. Kim, J. D. Pajerowski, D. E. Discher, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *71*, 463–474.
- [5] H. I. Chang, M. K. Yeh, *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 49–60.
- [6] a) C. R. Dass, P. F. M. Choong, *J. Controlled Release* **2006**, *113*, 155–163; b) M. L. Immordino, P. Brusa, S. Arpicco, B. Stella, F. Dosio, L. Cattel, *J. Controlled Release* **2003**, *91*, 417–429.
- [7] a) M. Senthilkumar, P. Mishra, N. K. Jain, *J. Drug Targeting* **2008**, *16*, 424–435; b) S. A. Shoyele, *Methods Mol. Biol.* **2008**, *437*, 149–160.
- [8] a) J. H. Jang, C. K. Ullal, S. E. Kooi, C. Koh, E. L. Thomas, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 647–651; b) J. H. Moon, A. J. Kim, J. C. Crocker, S. Yang, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 2508–2512.
- [9] a) P. J. A. Kenis, R. F. Ismagilov, G. M. Whitesides, *Science* **1999**, *285*, 83–85; b) I. Cohen, H. Li, J. L. Hougland, M. Mrksich, S. R. Nagel, *Science* **2001**, *292*, 265–267.
- [10] a) L. C. Glangchai, M. Caldorera-Moore, L. Shi, K. Roy, *J. Controlled Release* **2008**, *125*, 263–272; b) J. J. Guan, N. Ferrell, L. J. Lee, D. J. Hansford, *Biomaterials* **2006**, *27*, 4034–4041; c) 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.
- [11] J. P. Rolland, R. M. Van Dam, D. A. Schorzman, Q. Sr, J. M. DeSimone, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8349–8349.
- [12] J. P. Rolland, E. C. Hagberg, G. M. Denison, K. R. Carter, J. M. DeSimone, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 5920–5923; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5796–5799.
- [13] a) S. E. Gratton, S. S. Williams, M. E. Napier, P. D. Pohlhaus, Z. Zhou, K. B. Wiles, B. W. Maynor, C. Shen, T. Olafsen, E. T. Samulski, J. M. DeSimone, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1685–1695; b) M. J. Hampton, J. L. Templeton, J. M. DeSimone, *Langmuir* **2010**, *26*, 3012–3015; c) S. S. Williams, S. Retterer, R. Lopez, R. Ruiz, E. T. Samulski, J. M. DeSimone, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 1421–1428.
- [14] W. Jeong, M. E. Napier, J. M. DeSimone, *Nanomedicine* **2010**, *5*, 633–639.
- [15] J. Wang, J. D. Byrne, M. E. Napier, J. M. DeSimone, *Small* **2011**, *7*, 1919–1931.
- [16] a) M. C. Parrott, J. C. Luft, J. D. Byrne, J. H. Fain, M. E. Napier, J. M. DeSimone, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17928–17932; b) F. R. Kersey, T. J. Merkel, J. L. Perry, M. E. Napier, J. M. DeSimone, *Langmuir* **2012**, *28*, 8773–8781.
- [17] E. M. Enlow, J. C. Luft, M. E. Napier, J. M. DeSimone, *Nano Lett.* **2011**, *11*, 808–813.
- [18] J. Y. Kelly, J. M. DeSimone, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5438–5439.
- [19] H. Zhang, J. K. Nunes, S. E. A. Gratton, K. P. Herlihy, P. D. Pohlhaus, J. M. DeSimone, *New J. Phys.* **2009**, *11*, 075018.
- [20] J. Xu, J. Wang, J. C. Luft, S. Tian, G. Owens, Jr., A. A. Pandya, P. Berglund, P. Pohlhaus, B. W. Maynor, J. Smith, B. Hubby, M. E. Napier, J. M. DeSimone, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8774–8777.
- [21] W. Hasan, K. Chu, A. Gullapalli, S. S. Dunn, E. M. Enlow, J. C. Luft, S. Tian, M. E. Napier, P. D. Pohlhaus, J. P. Rolland, J. M. DeSimone, *Nano Lett.* **2012**, *12*, 287–292.
- [22] S. S. Dunn, S. Tian, S. Blake, J. Wang, A. L. Galloway, A. Murphy, P. D. Pohlhaus, J. P. Rolland, M. E. Napier, J. M. DeSimone, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7423–7430.
- [23] M. C. Parrott, M. Finniss, J. C. Luft, A. Pandya, A. Gullapalli, M. E. Napier, J. M. DeSimone, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7978–7982.
- [24] A. Garcia, P. Mack, S. Williams, C. Fromen, T. Shen, J. Tully, J. Pillai, P. Kuehl, M. Napier, J. M. DeSimone, B. W. Maynor, J. Drug Delivery **2012**, *2012*, 941243.

- [25] T. J. Merkel, K. Chen, S. W. Jones, A. A. Pandya, S. Tian, M. E. Napier, W. E. Zamboni, J. M. Desimone, *J. Controlled Release* **2012**, *162*, 37–44.
- [26] J. Y. Wang, Y. Wang, S. S. Sheiko, D. E. Betts, J. M. DeSimone, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5801–5806.
- [27] R. Langer, *Science* **1990**, *249*, 1527–1533.
- [28] T. J. Merkel, S. W. Jones, K. P. Herlihy, F. R. Kersey, A. R. Shields, M. Napier, J. C. Luft, H. Wu, W. C. Zamboni, A. Z. Wang, J. E. Bear, J. M. DeSimone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 586–591.
- [29] S. E. A. Gratton, P. D. Pohlhaus, J. Lee, J. Guo, M. J. Cho, J. M. DeSimone, *J. Controlled Release* **2007**, *121*, 10–18.
- [30] S. E. A. Gratton, P. A. Ropp, P. D. Pohlhaus, J. C. Luft, V. J. Madden, M. E. Napier, J. M. DeSimone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 11613–11618.
- [31] J. Wang, S. Tian, R. A. Petros, M. E. Napier, J. M. Desimone, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11306–11313.
- [32] M. R. Green, G. M. Manikhas, S. Orlov, B. Afanasyev, A. M. Makinson, P. Bhar, M. J. Hawkins, *Ann. Oncol.* **2006**, *17*, 1263–1268.
- [33] T. J. Merkel, J. M. DeSimone, *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3*, 73ps8.
- [34] F. Yan, C. Zhang, Y. Zheng, L. Mei, L. Tang, C. Song, H. Sun, L. Huang, *Nanomedicine* **2010**, *6*, 170–178.
- [35] T. Musumeci, C. A. Ventura, I. Giannone, B. Ruozzi, L. Montenegro, R. Pignatello, G. Puglisi, *Int. J. Pharm.* **2006**, *325*, 172–179.
- [36] R. Karnik, F. Gu, P. Basto, C. Cannizzaro, L. Dean, W. Kyei-Manu, R. Langer, O. C. Farokhzad, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 2906–2912.
- [37] H. C. Shin, A. W. G. Alani, D. A. Rao, N. C. Rockich, G. S. Kwon, *J. Controlled Release* **2009**, *140*, 294–300.
- [38] X. Wang, Y. G. Wang, X. M. Chen, J. C. Wang, X. Zhang, Q. Zhang, *J. Controlled Release* **2009**, *139*, 56–62.
- [39] K. S. Chu, W. Hasan, S. Rawal, M. D. Walsh, E. M. Enlow, J. C. Luft, A. S. Bridges, J. L. Kuijer, M. E. Napier, W. C. Zamboni, J. M. Desimone, *Nanomedicine*, im Druck.
- [40] S. S. Banerjee, N. Aher, R. Patil, J. Khandare, *J. Drug Delivery* **2012**, *2012*, 103973.
- [41] S. Abbasi, A. Paul, S. Prakash, *Cell Biochem. Biophys.* **2011**, *61*, 277–287.
- [42] J. Li, Y.-C. Chen, Y.-C. Tseng, S. Mozumdar, L. Huang, *J. Controlled Release* **2010**, *142*, 416–421.
- [43] a) G. Zimmer, *Viruses* **2010**, *2*, 413–434; b) H. Ying, T. Z. Zaks, R. F. Wang, K. R. Irvine, U. S. Kammula, F. M. Marincola, W. W. Leitner, N. P. Restifo, *Nat. Med.* **1999**, *5*, 823–827.
- [44] a) S. H. Lee, B. H. Chung, T. G. Park, Y. S. Nam, H. Mok, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1014–1025; b) K. Raemdonck, T. G. Van Thienen, R. E. Vandebroucke, N. N. Sanders, J. Demeester, S. C. De Smedt, *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 993–1001.
- [45] R. M. Kofler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 1951–1956.
- [46] A. L. Galloway, A. Murphy, J. M. Desimone, J. Di, J. P. Herrmann, M. E. Hunter, J. P. Kindig, F. J. Malinoski, M. A. Rumley, D. M. Stoltz, T. S. Templeman, B. Hubby, *Nanomedicine* **2012**, *9*, 523–531.
- [47] D. H. Ko, J. R. Tumbleston, K. J. Henderson, L. E. Euliss, J. M. DeSimone, R. Lopez, E. T. Samulski, *Soft Matter* **2011**, *7*, 6404–6407.
- [48] M. J. Hampton, S. S. Williams, Z. Zhou, J. Nunes, D. H. Ko, J. L. Templeton, E. T. Samulski, J. M. DeSimone, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 2667–2673.
- [49] F. Li, D. P. Josephson, A. Stein, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 378–409; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 360–388.
- [50] Y. N. Xia, B. Gates, Y. D. Yin, Y. Lu, *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 693–713.
- [51] K. P. Velikov, T. van Dillen, A. Polman, A. van Blaaderen, *Appl. Phys. Lett.* **2002**, *81*, 838–840.
- [52] S. C. Glotzer, M. J. Solomon, *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 557–562.
- [53] D. A. van den Ende, S. E. van Kempen, X. Wu, W. A. Groen, C. A. Randall, S. van der Zwaag, *J. Appl. Phys.* **2012**, *111*, 124107.
- [54] a) C. Park, R. E. Robertson, *Mater. Sci. Eng. A* **1998**, *257*, 295–311; b) C. Park, J. Wilkinson, S. Banda, Z. Ounaies, K. E. Wise, G. Sauti, P. T. Lillehei, J. S. Harrison, *J. Polym. Sci. Part B* **2006**, *44*, 1751–1762.
- [55] a) V. Tomer, C. A. Randall, G. Polizos, J. Kostelnick, E. Manias, *J. Appl. Phys.* **2008**, *103*, 034115; b) S. A. Wilson, G. M. Maistros, R. W. Whatmore, *J. Phys. D* **2005**, *38*, 175–182.
- [56] K. P. Herlihy, J. Nunes, J. M. Desimone, *Langmuir* **2008**, *24*, 8421–8426.
- [57] J. Nunes, K. P. Herlihy, L. Mair, R. Superfine, J. M. DeSimone, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 1113–1119.
- [58] a) S. Jiang, Q. Chen, M. Tripathy, E. Luijten, K. S. Schweizer, S. Granick, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 1060–1071; b) T. J. Merkel, K. P. Herlihy, J. Nunes, R. M. Orgel, J. P. Rolland, J. M. DeSimone, *Langmuir* **2010**, *26*, 13086–13096.