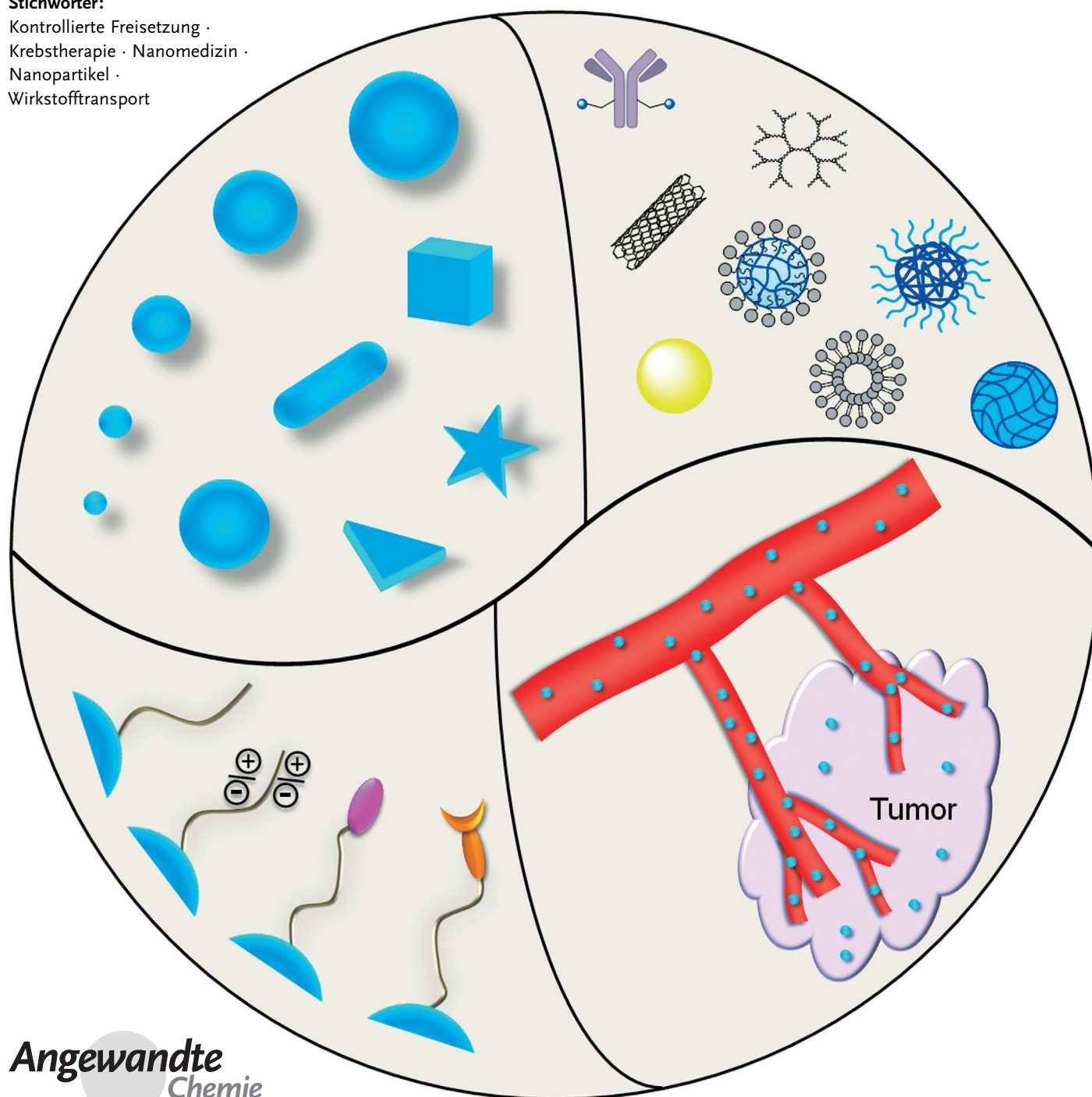


Maßgeschneiderte Nanopartikel für den Wirkstofftransport in der Krebstherapie

Tianmeng Sun, Yu Shrike Zhang, Bo Pang, Dong Choon Hyun, Miaoxin Yang und Younan Xia*

Stichwörter:

Kontrollierte Freisetzung ·
Krebstherapie · Nanomedizin ·
Nanopartikel ·
Wirkstofftransport



Das Interesse der Medizin an der Nanotechnologie hat in kurzer Zeit stark zugenommen. Die Nanotechnologie könnte Lösungen für viele Probleme bieten, die mit herkömmlichen Therapeutika einhergehen, wie etwa eine schlechte Wasserlöslichkeit (zumindest was die meisten Antitumormittel angeht), fehlende Tumorspezifität, nichtspezifische Verteilung, systemische Toxizität und ein geringer therapeutischer Index. In den letzten Jahrzehnten wurden beachtliche Fortschritte bei der Entwicklung und Anwendung von technischen Nanopartikeln gemacht, um Krebs wirksamer zu behandeln. Zum Beispiel gelang der Einbau von Therapeutika in Nanopartikel, die hinsichtlich Größe, Form und Oberflächeneigenschaften optimiert wurden, um deren Löslichkeit zu verbessern, die Halbwertszeit im Blutkreislauf zu verlängern, ihre Bioverteilung zu verbessern und ihre Immunogenität zu verringern. Außerdem wurden auch die pathophysiologischen Bedingungen, wie etwa die bessere Permeabilität und der Retentionseffekt sowie die räumlichen Schwankungen des pH-Werts genutzt, um einen Transport von Nanopartikeln und ihrer Beladung zu Tumoren zu fördern. Ferner wurden tumordirigierende Liganden (z. B. kleine organische Moleküle, Peptide, Antikörper und Nucleinsäuren) an die Oberfläche von Nanopartikeln addiert, um Krebszellen spezifisch durch selektive Bindung an oberflächenexprimierten Rezeptoren anzusteuern. Es wurde gezeigt, dass viele Arten von therapeutischen und/oder diagnostischen Substanzen (z. B. Kontrastmittel) mithilfe der gleichen Träger transportiert werden können, was Kombinations-therapien und ein Auslesen der Behandlungseffizienz in Echtzeit ermöglicht. Es ist davon auszugehen, dass sich passgenau hergestellte Nanopartikel als nächste Generation von Mitteln zur Krebstherapie und vielen anderen biomedizinischen Anwendungen entwickeln werden.

1. Einleitung

2012 starben weltweit 8.2 Millionen Menschen an Krebs, der damit eine der Haupttodesursachen darstellt.^[1] In den letzten Jahrzehnten wurden beachtliche Durchbrüche erzielt, die unser Verständnis über den Ursprung und die Entwicklung von Krebs vorangebracht haben, was wiederum zu besseren Methoden sowohl in der Diagnose als auch bei der Therapie führte.^[2] Obwohl die Gesamtmortalität von Krebs zum ersten Mal seit fünf Jahrzehnten eine abnehmende Tendenz zeigt, ist die Rate mit 20.2% noch immer sehr hoch.^[3] Allein in den Vereinigten Staaten verursachte Krebs 2013 rund 580 350 Todesfälle bei 1 660 290 diagnostizierten Erkrankungen.^[4] Ein Hauptgrund für diese hohe Mortalitätsrate liegt darin, dass wir nicht vermögen, die Therapeutika einzig an die Tumorstellen zu transportieren, ohne dabei schwere Nebenwirkungen an gesunden Geweben und Organen zu induzieren.^[5] Zusätzlich zu chirurgischen Eingriffen beruhen aktuelle Krebsbehandlungen im Wesentlichen auf Bestrahlung und Chemotherapie, die auch „normale“ Zellen abtöten und beim Patienten Toxizität verursachen. Daher wäre es äußerst wünschenswert, hochwirksame The-

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	12521
2. Verschiedene Arten von Antitumorwirkstoffen	12523
3. Verfahren zur kontrollierten Freisetzung	12526
4. In-vitro- und In-vivo-Transport	12532
5. Perspektiven beim Design von Nanopartikelträgern	12544
6. Fallstudien	12548
7. Zusammenfassung und Ausblick	12558

rapeutika zu entwickeln – sogenannte „Zauberkugeln“ –, die biologische Schranken überwinden, zwischen bösartigen und gutartigen Zellen unterscheiden, selektiv die karzinogenen Gewebe ansteuern und „intelligent“ auf die heterogene und komplexe Mikroumgebung innerhalb eines Tumors reagieren können, um das Therapeutikum bedarfsgerecht im optimalen Dosierungsbereich freizusetzen.^[6]

Von der Nanomedizin – also der Anwendung der Nanotechnologie auf die Medizin – wird nun erwartet, dass sie uns beim Erreichen dieser Ziele

behilflich sein wird. Nach mehreren Jahrzehnten der technologischen Entwicklungen rücken nun vielversprechende Wirkstofftransportsysteme ins Rampenlicht, die auf maßgeschneiderten Nanopartikeln basieren.^[7] Wie in Abbildung 1 gezeigt, können für den Wirkstofftransport verwendete Nanopartikel ohne Weiteres entweder aus weichen (organischen und polymeren) oder harten (anorganischen) Materialien hergestellt werden, wobei die Größen typischerweise im Bereich von 1–100 nm eingestellt werden und die Zusammensetzungen/Strukturen so aufgebaut werden, dass sie Antitu-

[*] Dr. T. Sun,^[+] Dr. Y. S. Zhang,^[+] B. Pang,^[+] Dr. D. C. Hyun,^[+] Prof. Y. Xia
The Wallace H. Coulter Department of Biomedical Engineering,
Georgia Institute of Technology and Emory University
Atlanta, GA 30332 (USA)
M. Yang, Prof. Y. Xia
School of Chemistry and Biochemistry
Georgia Institute of Technology
Atlanta, GA 30332 (USA)
E-Mail: younan.xia@bme.gatech.edu

[+] Diese Autoren haben gleichermaßen zu diesem Aufsatz beigetragen.

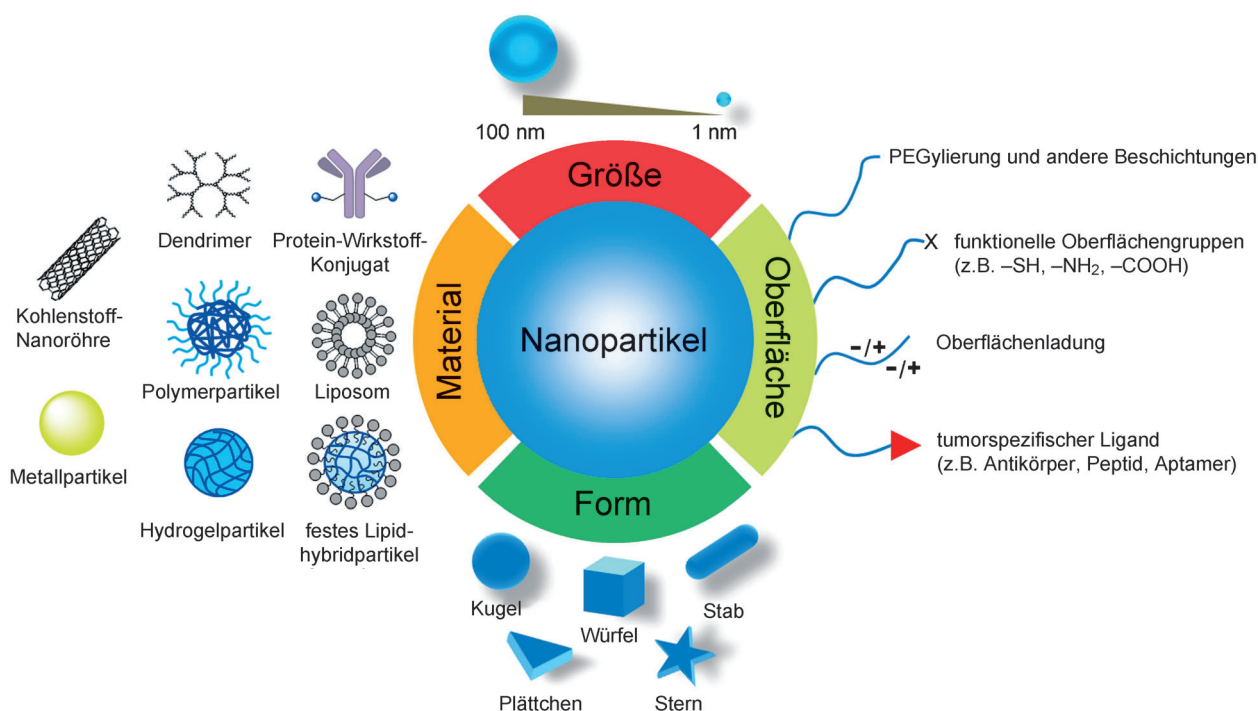


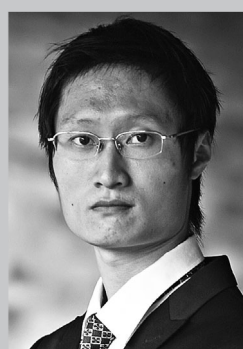
Abbildung 1. Zusammenstellung von Nanopartikeln, die als Wirkstofftransporter in der Krebstherapie untersucht wurden, sowie Darstellungen der biophysikochemischen Eigenschaften.

mormittel in einer Vielzahl von verschiedenen Konfigurationen aufnehmen.^[8] Die physikochemischen Eigenschaften

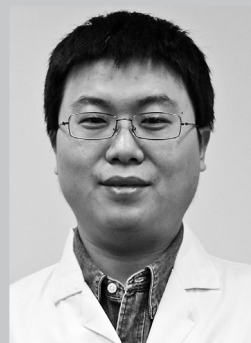
der Nanopartikel können ebenfalls passgenau eingestellt werden, indem die chemischen Zusammensetzungen,



Younan Xia studierte an der University of Science and Technology of China (B.S. 1987) sowie an der University of Pennsylvania (M.S. 1993) und promovierte 1996 an der Harvard University bei George M. Whitesides. 1997 begann er als Assistant Professor für Chemie an der University of Washington (Seattle), wo er 2002 zum Associate Professor und 2004 zum Professor ernannt wurde. Von 2007 hatte er die James M. McKelvey Professur für Advanced Materials im Department of Biomedical Engineering an der Washington University in St. Louis inne. Anfang 2012 wechselte er zur Georgia Tech, wo er den Brock Family Chair übernahm und GRA Eminent Scholar in Nanomedizin wurde. Seine Forschungsinteressen umfassen Nanomaterialien, Biomaterialien, Nanomedizin sowie regenerative Medizin.



Yu Shrike Zhang studierte Biomedical Engineering an der Southeast University (B.S. 2008). Er promovierte 2013 bei Prof. Younan Xia an der Georgia Tech und absolviert derzeit ein Postdoktorat bei Prof. Ali Khademhosseini an der Harvard Medical School, dem Brigham and Women's Hospital und der Harvard-MIT Division of Health Sciences and Technology. Seine Forschungsinteressen umfassen Biomaterialien, Gewebezüchtung, regenerative Medizin, Bildgebung und Nanomedizin.



Tianmeng Sun ist seit August 2012 Postdoktorand in der Arbeitsgruppe Xia an der Georgia Tech. Er studierte Life Sciences und Zellbiologie (B.S. 2006) und promovierte 2011 an der University of Science and Technology of China. In seiner Doktorarbeit lag der Schwerpunkt auf der Entwicklung von Nanopartikel-Transportsystemen für die Krebstherapie basierend auf siRNA und Chemotherapeutika. Seine aktuellen Forschungsinteressen gelten der Entwicklung von Nanomaterialien für die Krebs- und Atherosklerose-Behandlung.



Bo Pang studierte Maschinenbau (B.E. 2010) und Chemie (B.S. 2011) an der Peking University. Derzeit promoviert er im Rahmen eines gemeinsamen Doktorandenprogramms der Georgia Tech/Emory/Peking University unter der Leitung der Professoren Qiushi Ren und Younan Xia. Seine Forschungsinteressen gelten der Verwendung von Goldnanoköpfen für die Krebstherapie und nanopartikelbasierten Kontrastmitteln für PET und SPECT.

Größen, Formen, Strukturen, Morphologien und Oberflächeneigenschaften maßgeschneidert werden.^[2,7a,e,9] Für die Klinik wurden etliche solcher Transportsysteme für die Krebstherapie zugelassen, und viele weitere befinden sich derzeit in klinischen Studien oder vorklinischer Prüfung (siehe Tabelle 1). Es ist zu erwarten, dass nanopartikelbasierte Therapeutika die Behandlungsergebnisse bei onkologischen Erkrankungen signifikant verbessern werden, was zu deutlichen Umgestaltungen in der Pharmaindustrie führen dürfte.^[9]

Verglichen mit herkömmlichen Chemotherapeutika bietet der Transport von Antitumormitteln über eine nanopartikelbasierte Plattform viele attraktive Eigenschaften. Dazu gehören: 1) ein verbesserter Transport von schlecht wasserlöslichen Wirkstoffen und der Transport eines hochdosierten Therapeutikums in die Krebszellen, 2) ein besserer Schutz des Wirkstoffs vor harschen Umgebungsbedingungen (z.B. dem stark sauren pH-Wert im Magen oder den Lysosomen einer Zelle und den hohen Spiegeln von Proteasen oder anderen Enzymen im Blutstrom), bevor er sein Ziel erreicht hat, was zu einer verlängerten Plasmahalbwertszeit des Wirkstoffs im Blutkreislauf führt, 3) ein zielgerichteter Transport von Wirkstoffen auf eine zell- oder gewebespezifische Weise, sodass die Behandlungseffizienz maximiert wird, während systemische Nebenwirkungen gemildert werden, 4) eine kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen über einen kontrollierbaren Zeitraum mit genauen Dosen und sogar die Realisierung einer bedarfsgerechten Freisetzung unter Verwendung von aufwendigeren, stimulirespon-

siven Systemen und 5) ein gemeinsamer Transport von mehreren Arten von Wirkstoffen und/oder Diagnostika (z.B. Kontrastmitteln) für eine Kombinationstherapie (mit der möglicherweise Multiwirkstoffresistenzen überwunden werden können) sowie das Auslesen einer Behandlungseffizienz in Echtzeit.^[7h,37]

In diesem Aufsatz diskutieren wir zunächst die dringende Notwendigkeit von Nanopartikelträgern für den Transport von verschiedenen Arten (hydrophil, hydrophob und hoch geladen) von Antitumormitteln. Dann stellen wir eine Reihe von Strategien vor, die auf Diffusion, Erosion und stimuli-responsiver Auslösung zur Steuerung der Freisetzung der Wirkstoffe aus den Nanopartikelträgern basieren. Anschließend betrachten wir einige allgemeine Herausforderungen beim gezielten Transport von Nanopartikelträgern unter In-vitro- und In-vivo-Bedingungen, einschließlich Endozytose, intrazellulärem Transport, Bioverteilung, biologischer Verträglichkeit und Abbaubarkeit sowie systemischer Clearance. Es folgen einige Ausführungen zum Design, der Synthese/Herstellung und Funktionalisierung von Nanopartikelträgern, basierend auf den Anforderungen durch die verschiedenen Anwendungen. Schließlich erläutern wir anhand ausgewählter Beispiele von Nanopartikelträgern, darunter Proteinkonjugate, Liposome, Dendrimere sowie aus organischen Polymeren, Hydrogelen, Phasenwechselmaterialien und aus anorganischen Materialien bestehende Träger, wie das Konzept der Nanomedizin in materialtechnischer Hinsicht umgesetzt wurde.

2. Verschiedene Arten von Antitumorstoffen

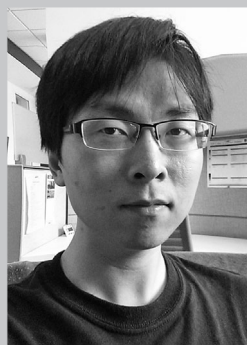
Tumortheraeutika können nach ihrer Löslichkeit in Wasser grob in zwei Hauptgruppen unterteilt werden, nämlich hydrophob und hydrophil. Alternativ können sie basierend auf ihren elektrostatischen Eigenschaften als hochgeladene oder neutrale Wirkstoffe klassifiziert werden (Tabelle 2). Bei der Auswahl oder dem Design von Nanopartikeln, die als Träger für eine spezifische Art von Wirkstoff verwendet werden sollen, ist entscheidend, die Eigenschaften und das Verhalten des Wirkstoffs zu kennen, um eine optimale Verkapselungseffizienz sowie das gewünschte Freisetzungsprofil zu erhalten. In diesem Abschnitt beleuchten wir anhand einer Reihe von Beispielen, welche Herausforderungen sich bei der Verwendung verschiedener Tumortheraeutika stellen, und diskutieren dann Strategien, die diese Hindernisse durch die Verwendung von maßgeschneiderten Nanopartikeln als Träger potenziell überwinden können.

2.1. Hydrophobe Wirkstoffe

Die meisten der derzeit klinisch eingesetzten Tumortheraeutika sind hydrophob, wie beispielsweise Paclitaxel, das weitverbreitet zur Behandlung von Eierstock-, Brust- und nichtkleinzelligem Lungenkrebs verwendet wird. Die Frage, wie ein hydrophober Wirkstoff effizient zu seinem Ziel transportiert werden kann, war stets eine Herausforderung und Gegenstand der Forschung. Der Grund hierfür liegt in



Dong Choon Hyun ist seit Oktober 2012 Postdoktorand in der Arbeitsgruppe von Prof. Xia am Georgia Institute of Technology. Er erwarb seinen B.S. (2006) und Ph.D. (2011) in Materialwissenschaften an der Yonsei University, Korea, mit Arbeiten zur Herstellung und Anwendung von mikro- und nanoskaligen Polymernmustern. Seine aktuellen Forschungen gelten der Konzipierung und Herstellung von biologisch abbaubaren Polymerpartikeln und deren Anwendungsmöglichkeiten beim Wirkstofftransport.



Miaoxin Yang studierte Pharmazie an der Shanghai Jiaotong University (B.S. 2006) und Chemie an Nanyang Technological University (M.S. 2009) sowie Biomedical Engineering an der Washington University in St. Louis (M.S. 2011). Nach zwei Jahren in der Forschung bei Philips begann er 2013 seine Promotion bei Younan Xia an der Georgia Tech. Seine Forschungsinteressen umfassen die Entwicklung von neuen Nanomaterialien für biomedizinische Anwendungen.

Tabelle 1: Nanopartikelbasierte Therapeutika in der klinischen Anwendung und in klinischen Studien.

Handelsname	Formulierung	Wirkstoff	Firma	Anwendung	Entwicklungsstadium
Abraxane	Albumin-gebundene Nanopartikel	Paclitaxel	Abraxis Bioscience, Inc.	Metastatischer Brustkrebs ^[10]	Zugelassen
Caelyx	PEGyliertes Liposom	Doxorubicin	Schering-Plough	Metastatischer Brust- und Eierstockkrebs, Kaposi-Sarkom ^[11]	Zugelassen
DaunoXome	Liposom	Daunorubicin	Galen Ltd	Kaposi-Sarkom ^[12]	Zugelassen
DepoCyt	Liposom	Cytarabin	Pacira Pharmaceuticals, Inc.	Lymphom ^[13]	Zugelassen
Doxil	Liposom	Doxorubicin	Sequus Pharmaceuticals, Inc.	Kaposi-Sarkom ^[14]	Zugelassen
Genexol-PM	mizellare Polymernanopartikel	Paclitaxel	Samyang Biopharmaceuticals	Brustkrebs ^[15]	Zugelassen
Marqibo	Liposom	Vincristinsulfat	Talon Therapeutics, Inc.	Lymphoblastische Leukämie ^[16]	Zugelassen
Myocet	Liposom	Doxorubicin	Zeneus Pharma Ltd	Metastatischer Brustkrebs ^[17]	Zugelassen
Oncaspar	PEGylierte Asparaginase	Asparaginase	Enzon Pharmaceuticals, Inc.	Akute lymphoblastische Leukämie ^[18]	Zugelassen
Zinostatin Stimamaler	Poly(styrol-co-maleinsäure)-konjugiertes Neocarzinostatin	Neocarzinostatin	Astellas Pharma, Inc.	Hepatozelluläres Karzinom ^[19]	Zugelassen
NK105	Mizellare Nanopartikel	Paclitaxel	Nippon Kayaku Co., Ltd	Brustkrebs ^[20]	Phase III
BIND-014	Polymermatrix	Docetaxel	BIND Therapeutics, Inc.	Prostatakrebs ^[21]	Phase II
Genexol-PM	Methoxy-PEG-PLA	Paclitaxel	Samyang Biopharmaceuticals	Eierstock- und Lungenkrebs ^[22]	Phase II
CRLX101	Cyclodextrin-PEG-Mizelle	Camptothecin	Cerulean Pharma, Inc.	Eierstock-/Eileiter-/Peritonealkrebs, Mastdarmkarzinom ^[23]	Phase I/II
CYT-6091	Goldnanopartikel	Tumornekrosefaktor- α	Cytimmune Sciences, Inc.	Bauchspeicheldrüsenkrebs, Melanom, Weichteilsarkom, Eierstock- und Brustkrebs ^[24]	Phase I/II
L-Annamycin	Liposom	Annamycin	Callisto Pharmaceuticals, Inc.	Akute lymphozytische Leukämie, akute myeloische Leukämie ^[25]	Phase I/II
NL CPT-11	Liposom	Irinotecan	University of California, San Francisco	Solider Tumor ^[26]	Phase I/II
Rexin-G	Pathotrope Nanopartikel	Dominant-negatives Cyclin-G1-Konstrukt	Epeius Biotechnologies	Brustkrebs, Osteosarkom ^[27]	Phase I/II
Anti-EGFR-Immunoliposom	Liposom	Doxorubicin	Universitätsspital, Schweiz	Solider Tumor ^[28]	Phase I
AuroLase	Goldnanopartikel		Nanospectra Biosciences, Inc.	Lungenkrebs, Kopf- und Nackenkrebs ^[29]	Phase I
BikDD-Nanopartikel	Liposom	Pro-apoptotisches Bik-Gen (<i>BikDD</i>) siRNA	National Cancer Institute	Bauchspeicheldrüsenkrebs ^[30]	Phase I
CALAA-01	Cyclodextrin-haltiges Polymer		Calando Pharmaceuticals, Inc.	Solider Tumor ^[31]	Phase I
CRLX301	Cyclodextrin-basiertes Polymer	Docetaxel	Cerulean Pharma, Inc.	Solider Tumor ^[32]	Phase I
DEP-Docetaxel	Dendrimer	Docetaxel	Starpharma Holdings, Ltd	Brust-, Prostata-, Lungen- und Eierstockkrebs ^[33]	Phase I
Docetaxel-PNP	Polymernanopartikel	Docetaxel	Samyang Biopharmaceuticals	Fortgeschrittene solide Malignitäten ^[34]	Phase I
TKM-080301	Lipidnanopartikel	siRNA	National Institutes of Health Clinical Center	Leberkrebs ^[35]	Phase I
C-Dots	PEG-beschichtetes SiO ₂		C-dots Development	Melanom ^[36]	IND-Zulassung

der Tatsache, dass hydrophobe Wirkstoffmoleküle möglicherweise nicht löslich genug sind, um die wässrige, eine Zelle umschließende Umgebung zu passieren (z. B. die Körper- und Gewebeflüssigkeiten in vivo) und dann durch die Zellmem-

bran zu dringen, um schließlich intrazelluläre Ziele zu erreichen. Außerdem kann ihre starke Neigung, bei intravenöser Verabreichung zu aggregieren, zu Komplikationen wie Embolien und lokaler Toxizität führen.^[51]

Tabelle 2: Derzeit im klinischen Einsatz befindliche Tumortheraeutika.^[a]

Wirkstoff	Klinische Anwendung
Hydrophob	
Adriamycin	ALL, AML, Wilms-Tumor, Neuroblastom, Weichteil- und Knochensarkome, Brust, Eierstock, Harnblase, Schilddrüsen, Magen und Morbus Hodgkin ^[38]
Cisplatin	Metastatische Hodentumore, metastatischer Brustkrebs, Glioblastom, Lungen, Lymphom, Analkanal ^[38]
Docetaxel	Brust, NSCLC, HRPc, gastrisches Adenokarzinom, SCCN ^[38]
Etoposid	SCLC, GCT, Lymphom, Ewing-Sarkom, Eierstock ^[39]
Methotrexat	Schwangerschaftschoriokarzinom, ALL, Brust, Epidermoidkarzinom des Kopfes und Halses, fortgeschrittene Mykose ^[38]
Paclitaxel	Fortgeschrittene Karzinome von Eierstock, Brust, Lunge, Magen, Kopf und Hals, GCT, Harnblase, Urothel ^[40]
Hydrophil	
Bevacizumab	Metastatisches CRC, NSCLC, metastatischer Brustkrebs, Glioblastom, Eierstock-, Nierenzellkarzinom ^[41]
Cetuximab	Metastatische kolorektale und nichtkleinzellige Lungenkarzinome ^[42]
Cyclophosphamid	Maligne Lymphome, Morbus Hodgkin, lymphozytisches Lymphom, CLL, CML, ALL, AML, Osteosarkom, GCT ^[43]
Gemcitabin	Brust, NSCLC, Bauchspeicheldrüse, Eierstock, Gallenblase, Lymphom, Harnblase ^[44]
Ibritumomab	B-Zellen-Non-Hodgkin-Lymphom ^[45]
L-Asparaginase	ALL ^[46]
Panitumumab	Metastatisches Kolorektalkarzinom ^[47]
Rituximab	CD20-positives B-Zellen-Non-Hodgkin-Lymphom ^[48]
Tositumomab	CD20-positives B-Zellen-Non-Hodgkin-Lymphom ^[49]
Transtuzumab	Metastatischer Brustkrebs ^[50]
Hoch geladen	
DNA	keine klinische Anwendung
siRNA/miRNA	keine klinische Anwendung

[a] ALL (akute lymphoblastische Leukämie), AML (akute myeloische Leukämie), CLL (chronische lymphozytische Leukämie), CML (chronische myeloische Leukämie), CRC (kolorektales Karzinom), GCT (Granulosazelltumor), HRPc (hormonrefraktäres Prostatakarzinom), NHL (Non-Hodgkin-Lymphom), NSCLC (nichtkleinzelliges Lungenkarzinom), SCCN (squamous cell carcinoma of the head and neck, Plattenepithelkarzinom), SCLC (kleinzelliges Lungenkarzinom).

Ein effektiver Ansatz zur Überwindung der schlechten Wasserlöslichkeit eines hydrophoben Wirkstoffs ist dessen Verkapselung in einem nanopartikelbasierten Träger. Die Hauptanforderung an den Träger ist eine gute Beladungskapazität für den hydrophoben Wirkstoff, was sich einfach durch die Verwendung eines hydrophoben oder amphiphilen Materials erfüllen lässt.^[37a] So wurden eine Vielzahl verschiedener Träger zum Transport von hydrophoben Wirkstoffen entwickelt, einschließlich solcher, die auf Polymermizellen oder Polymernanopartikeln basieren.^[2,52] Zum Beispiel zeigten Allen und Mitarbeiter, dass die Konzentration von ML220 (einem hoch hydrophoben Arylimidazol-Wirkstoff) in einem wässrigen Medium um das mehr als 50000-fache erhöht werden konnte, wenn es in einem Liposom-basierten Träger verkapselt wurde.^[53] Park und Mitarbeiter fanden, dass nanoskopische Mizellen auf der Basis von amphiphilen Blockcopolymeren als Träger zum Transport von schlecht wasserlöslichen Wirkstoffen (wie etwa Paclitaxel) dienen können, was die Wirkstoffkonzentration in einem wässrigen Medium signifikant um das mehr als 1000-fache erhöht.^[54] Eine ähnliche Verbesserung wurde auch mit festen Nanopartikeln beobachtet, die aus biologisch verträglichen und abbaubaren Polymeren hergestellt wurden.^[55]

2.2. Hydrophile Wirkstoffe

Hydrophile Wirkstoffe, einschließlich Biomakromolekülen (z.B. Proteine, Peptide und Nucleinsäuren)^[56] sowie

kleinen Molekülen,^[57] spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Behandlung von verschiedenen Krebsarten. Zum Beispiel wird Trastuzumab, ein monoklonaler Antikörper, der mit dem humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2) interferiert, bereits seit vielen Jahren routinemäßig zur Behandlung von Brustkrebs im frühen und metastasierenden Stadium eingesetzt. Ein anderes Beispiel ist Gemcitabin, ein Nucleosid-Analogon, das zur Behandlung von Blasen-, Bauchspeicheldrüsen-, Eierstock-, Brust- und nichtkleinzelligem Lungenkrebs eingesetzt wird. Der Einsatz von hydrophilen Wirkstoffen wird durch zahlreiche Hindernisse beeinträchtigt, wie etwa eine schlechte Aufnahme durch die Zellen aufgrund der Unfähigkeit, die lipidreichen, hydrophoben Zellmembranen zu passieren, eine geringe Bioverfügbarkeit als Folge ihrer geringen Stabilität gegen proteolytischen und hydrolytischen Abbau sowie eine kurze Halbwertszeit im Kreislaufsystem.^[56,58]

Um diese Hürden zu umgehen, wurden Nanopartikel als Träger untersucht, um hydrophile Wirkstoffe zu verkapseln und zu transportieren. Ähnlich wie bei hydrophoben Wirkstoffen stellt auch hier die Beladungseffizienz einen der Hauptaspekte dar, den es zu berücksichtigen gilt, da die Gesamtdosierung erhöht werden muss, wenn Nanopartikel mit geringen Wirkstoffgehalten verabreicht werden.^[59] Berücksichtigt man die hydrophobe Natur der meisten Materialien, die zur Herstellung der Träger verwendet werden, ist die Beladung solch eines Transportsystems mit hydrophilem Wirkstoff gelegentlich recht kompliziert, und zwar aufgrund der schlechten Mischbarkeit der beiden Phasen. Daher

wurden zahlreiche Ansätze entwickelt, um die Beladungseffizienz von hydrophilen Wirkstoffen zu verbessern. Zum Beispiel ersetzten Hall und Mitarbeiter 5-Fluoruracil (5-FU, ein hydrophiles Pyrimidin-Analogon zur Krebsbehandlung) durch 1-Alkylcarbonyloxymethyl (ein amphiphiles Prodrug von 5-FU) und erhöhten so die Wirkstoffbeladung von 3.68 % auf 47.23 %.^[60] Fattal und Mitarbeiter entdeckten, dass die Einstellung des pH-Werts der äußeren wässrigen Phase auf den isoelektrischen Punkt eines Proteinwirkstoffs die Wirkstoffbeladung erhöhen konnte.^[61] Xu und Mitarbeiter zeigten, dass die elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Lipidoiden und einem Proteinwirkstoff verstärkt werden konnten, um die Bildung von Protein-Lipidoid-Komplexen und so die intrazelluläre Freisetzung zu erleichtern.^[59c] Des Weiteren fanden McGinity und Mitarbeiter, dass ein weniger hydrophiles, organisches Lösungsmittel in der Ölphase die Freisetzung der eingekapselten hydrophilen Wirkstoffe in die äußere Wasserphase verhindern konnte.^[62] Einige dieser Modifizierungen tragen zudem dazu bei, die schlechte Verteilung einiger hydrophiler Wirkstoffe in Nanopartikeln zu umgehen, die häufig zu einer raschen Freisetzung des Wirkstoffs führt.^[63]

2.3. Hoch geladene Wirkstoffe

Auf DNA, siRNA und microRNA basierende Gen-Therapeutika stellen eine besondere Klasse von hydrophilen Wirkstoffen mit hohen Ladungsdichten dar. Von ihnen wird erwartet, dass sie als leistungsstarke Molekulartherapie zur Behandlung verschiedenster Krankheiten dienen werden.^[64] Diese Wirkstoffe weisen alle Eigenschaften eines hydrophilen Wirkstoffs auf, wie etwa geringe zelluläre Aufnahme und schneller Abbau im physiologischen Medium. Zusätzlich wird die systemische Verabreichung dieser Therapeutika durch Hemmnisse wie etwa eine schnelle Clearance durch das mononukleäre Phagozytensystem (MPS) und Nierenfiltration erschwert. Es ist zu betonen, dass in der Gentherapie bisher kein klinischer Erfolg erzielt wurde. In gewissem Sinne bleibt der effiziente Transport dieser hoch geladenen Substanzen durch geeignete Träger ein Haupthindernis, um einen therapeutischen Nutzen zu erzielen.^[65]

Derzeit basieren das Beladen und die Abgabe von Gen-Wirkstoffen auf den elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den hoch geladenen Nucleinsäuren und den Nanopartikelträgern. Da die Nucleinsäuren unter physiologischen Bedingungen gewöhnlich negativ geladen sind, sollten vernünftigerweise positiv geladene Träger verwendet werden, wie etwa Liposome oder aus kationischen Baueinheiten bestehende Polymerpartikel, um die Beladungseffizienz zu verbessern.^[66] Dazu haben Wang und Mitarbeiter ein positiv geladenes Mizellensystem entwickelt, das aus amphiphilen und kationischen Triblockcopolymeren besteht, die siRNA für einen intrazellulären Transport wirksam immobilisieren konnten.^[67] Unglücklicherweise verursachen einige dieser Nanopartikel mit Toxizität und Immun- oder Entzündungsantworten einhergehende Probleme,^[68] was beim Design der nächsten Generation von Trägern berücksichtigt werden muss. Eine direkte Konjugation eines Gen-Wirkstoffs an die

Oberfläche eines Nanopartikelträgers wurde als weiterer effektiver Ansatz vorgestellt.^[69] Durch die Immobilisierung von Nucleinsäuren auf der Oberfläche kann die Komplexität eines Beladungsprozesses im Vergleich zu Verkapselungsmethoden verringert werden. In einem Beispiel haben Mirkin und Mitarbeiter Au-Nanopartikel zunächst mit einer Schicht von kurzen DNA-Ketten beschichtet, die spezifisch entworfene Sequenzen enthielten. Unter Verwendung dieser DNA-beschichteten Au-Nanopartikel konnten sie dann eine Ziel-DNA oder eine interessierende siRNA für einen wirksamen Transport der Therapeutika immobilisieren.^[69]

3. Verfahren zur kontrollierten Freisetzung

Der Einbau von Wirkstoffmolekülen in einen Nanopartikelträger oder auf dessen Oberfläche ermöglicht eine kontrollierte Freisetzung, was im Vergleich zu herkömmlichen, auf freien Wirkstoffen basierenden Dosierungsformen viele Vorteile bietet. Zum Beispiel kann dies die zeitliche oder räumliche Präsentation eines Wirkstoffs im Körper verbessern, den Wirkstoff vor einem physiologischen Abbau oder Eliminierung schützen, die Toxizität gegenüber gesunden Geweben und Organen verringern und die Therapietreue des Patienten sowie die Nutzungsfreundlichkeit erhöhen. Es wurden große Anstrengungen beim Design und der Entwicklung von nanopartikelbasierten Systemen zur kontrollierten Freisetzung unternommen,^[70] und die Funktionsweise kann in zwei Hauptkategorien eingeteilt werden: verzögerte und stimuliresponsive (d.h. „intelligente“) Freisetzung. Hier werden wir nur die allgemeinen Grundlagen der kontrollierten Freisetzung diskutieren, die sich ohne Weiteres auf nanopartikelbasierte Träger übertragen lassen.

3.1. Verzögerte Freisetzung

Die verzögerte Freisetzung zielt darauf ab, einen Wirkstoff mit einer festgelegten Geschwindigkeit über einen längeren Zeitraum abzugeben. Diese Freisetzungsart ist kritisch bei Wirkstoffen, die nach der Verabreichung rasch metabolisiert und aus dem Körper ausgeschieden werden. Die verzögerte Freisetzung kann den Wirkstoff im Plasma oder Zielgewebe auf einem konstanten Spiegel halten, indem die Geschwindigkeit der Wirkstofffreisetzung an die Geschwindigkeit der Wirkstoffausscheidung angepasst wird. Im Falle einer Krebstherapie ist die Aufrechterhaltung einer Wirkstoffkonzentration innerhalb des therapeutischen Fensters für den Patienten von klinischem Nutzen.

Sobald sie in der wässrigen Körperflüssigkeit gelöst sind, können die meisten Wirkstoffe mit der Flüssigkeit transportiert werden, um rasch zu den Zielrezeptoren zu gelangen. Ein Ansatz zum Erreichen einer verzögerten Freisetzung ist, die Wirkstoffmoleküle über einen kontrollierbaren Zeitraum an einem Eintreten in die wässrige Umgebung zu hindern. Wie in Abbildung 2 gezeigt, kann diese Hinderung realisiert werden, indem die Diffusion der Wirkstoffmoleküle durch eine unlösliche Polymerschale oder Matrix gesteuert wird oder indem einfach die Abbaugeschwindigkeit des Trägers

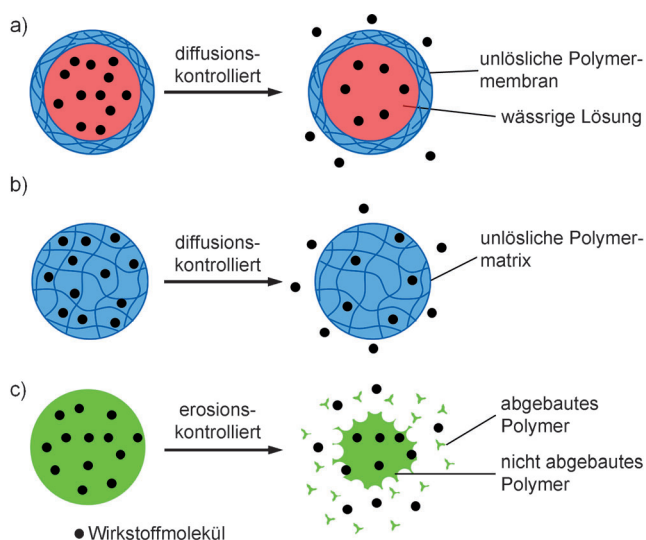


Abbildung 2. Darstellung der drei Hauptmechanismen zum Erreichen einer kontrollierten Wirkstofffreisetzung: a,b) Diffusion durch eine unlösliche Polymerschale oder -matrix und c) Erosion einer Polymermatrix. Wiedergabe nach Lit. [71b] mit freundlicher Genehmigung, Copyright 2010 Springer.

gesteuert wird.^[71] Die Freisetzungsmechanismen und die entsprechenden mathematischen Modelle wurden umfassend untersucht, und es existieren zahlreiche Übersichten dazu.^[72]

3.1.1. Diffusionskontrollierte Freisetzung

Bei der diffusionskontrollierten Freisetzung werden die in ein Nanopartikel geladenen Wirkstoffmoleküle durch eine Barriere, die von einem unlöslichen Material gebildet wird (typischerweise einem organischen Polymer), an einem Eintritt in die wässrige Umgebung gehindert. Im Allgemeinen kann eine diffusionskontrollierte Freisetzung unter Verwendung eines Reservoir- oder Matrix-basierten Systems realisiert werden.^[73] Wie der Name schon sagt, besteht ein reservoirbasiertes System aus einem den Wirkstoff enthaltenden Kern-Reservoir und einer das Reservoir umgebenden Membran (Abbildung 2a). Das Konzept dieses Freisetzungssystems kann ohne Weiteres auf nanoskopische Träger erweitert werden, indem man zu kolloidalen Hohlpartikeln übergeht.^[74] Typischerweise können die anfangs in das Reservoir geladenen Wirkstoffmoleküle nur durch die Membran nach außen diffundieren. Die Wirkstofffreisetzungsgeschwindigkeit wird durch die physikochemischen Eigenschaften der Membran und des geladenen Wirkstoffs sowie die Dicke der Membran bestimmt. Trotz der Einfachheit des Freisetzungsmechanismus und der Möglichkeit, einen stationären Freisetzungsprozess zu erreichen, weisen die Systeme auf Polymermembranbasis einen entscheidenden Nachteil auf, und zwar den eines unerwünschten Austritts aus kleinen Löchern und Rissen, die sich in der Membran bilden können.^[75] Kürzlich wurden aus anorganischen Materialien bestehende, hohle Nanopartikel für einen Wirkstofftransport bei der Krebstherapie entwickelt.^[76] Zum Beispiel konnten Fe_3O_4 -Hohl Nanopartikel mit Poren einer Größe von rund 3 nm Cisplatin durch

die Poren über einen diffusionskontrollierten, langsamen Prozess freisetzen. Die poröse Schale war mechanisch und physiologisch stabil.^[77]

Bei einem matrixbasierten System (Abbildung 2b), das am umfassendsten untersucht wurde, werden die Wirkstoffmoleküle gleichmäßig in dem Träger dispergiert, der aus einem wasserunlöslichen Polymer wie etwa Polyurethan (PUA) und Poly(methylmethacrylat) (PMMA) hergestellt wird. Dieses System zeigt typischerweise zu Beginn eine merkliche Freisetzung (sogenannter „Burst Release“, eine schlagartige Freisetzung), eine Folge der Desorption von auf der Oberfläche der Nanopartikel adsorbierten Wirkstoffmolekülen.^[78] Im Anschluss daran ist die Freisetzung verzögert, da es seine Zeit braucht, bis die Wirkstoffmoleküle innerhalb der Polymermatrix an die Oberfläche diffundiert sind. Dieser Verzögerungseffekt ist bei kugelförmigen Trägern ausgeprägter, da die Anzahl von verfügbaren Wirkstoffmolekülen mit dem Abstand von der Oberfläche abnimmt.^[71b,75] In einer Studie wurde gezeigt, dass PUA-Nanopartikel geladenes Doxorubicin im Verlauf einer 6-tägigen Inkubation nur zu 40 % freisetzen.^[79] Ebenso wurden über einen Zeitraum von 28 Tagen nur 35 % des verkapselten Docetaxel (Dtxl) aus PCL-Tween-80-Nanopartikeln freigesetzt.^[80]

3.1.2. Erosionskontrollierte Freisetzung

In den letzten Jahren haben aus erodierbaren oder abbaubaren Polymeren hergestellte Nanopartikelträger (Abbildung 2c) viel Aufmerksamkeit auf sich gezogen, da sie nach der vollständigen Freisetzung des Wirkstoffs keine Rückholung oder weitere Manipulation erfordern.^[80] Das Muster der Wirkstofffreisetzung kann gesteuert werden, indem die Erosionskinetik des Nanopartikels durch sorgfältige Auswahl von Polymeren und Verkapselungstechniken maßgeschneidert wird.^[81]

Zur Formulierung der erodierbaren Polymernanopartikel wurden zahlreiche biologisch abbaubare Polymere verwendet, und zwar sowohl synthetische als auch natürliche. Synthetische Polymere haben den Vorteil, dass sie vorher geladene Wirkstoffe über Zeiträume von Tagen bis hin zu mehreren Wochen verzögert freisetzen können. Repräsentative Beispiele umfassen Polyester wie z.B. Poly(milchsäure) (PLA), Poly(glycolsäure) (PGA) und Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA). Diese Polymere werden über die hydrolytische Spaltung der Esterbindung zwischen Milch- und Glycolsäure abgebaut, die ihrerseits ohne Weiteres vom Körper metabolisiert werden können und als Kohlendioxid und Wasser ausgeschieden werden.^[82] Während des Hydrolyseprozesses wird die Erosionsgeschwindigkeit dadurch bestimmt, wie gut die Wassermoleküle an die Polymermatrizes gelangen (d.h. von der Hydrophilie der Polymere). Des Weiteren hängt die Hydrolyse von den lokalen Konzentrationen von Protonendonoren und -akzeptoren ab. Da die abgebauten Monomere bestimmter Polymere (z.B. PLA, PGA und PLGA) saure Protonen liefern, kann ihre Abbaugeschwindigkeit bei Akkumulation dieser sauren Produkte selbstbeschleunigend sein.^[83] Die Geschwindigkeit der Polymererosion lässt sich auch durch die Zugabe von externen sauren oder basischen Hilfsstoffen regulieren.

Die Polymererosion kann über einen Oberflächen- oder Bulkmechanismus ablaufen.^[84] Oberflächenerosion findet statt, wenn die Erosion schneller ist als der Wasserdurchtritt in das Volumen des Polymers. Dies gilt als bevorzugter Erosionsmechanismus für den Wirkstofftransport, da unter Verwendung eines sehr dünnen Polymers oder durch Konstanthalten der Oberfläche des Trägers eine stabile Wirkstofffreisetzung reproduzierbar erreicht werden kann. Ein gutes Beispiel von an der Oberfläche erodierenden Polymeren ist Polyanhydrid,^[85] dessen außergewöhnliche Hydrophobie den Wasserdurchtritt verzögert, während dessen hoch labile Gruppen bei einer Begegnung mit Wassermolekülen rasch hydrolysieren.

Eine Bulkerosion findet statt, wenn Wassermoleküle schneller vom Polymer aufgesogen werden, als die Erosion verläuft.^[71] In diesem Fall treten in der ganzen Matrix Ketenspaltungen auf, was zu einem sehr komplexen Abbau-/Erosionsprozess beim Polymer führt. Polyester, die am häufigsten als biologisch abbaubare Polymere für eine kontrollierte Freisetzung verwendet werden, zeigen eine Bulkerosion. Die Freisetzung des Wirkstoffs aus solchen Bulkerosion zeigenden Polymeren verläuft gewöhnlich in drei Stufen.^[86] In der ersten Stufe wird Wirkstoff aus der Oberfläche oder aus Poren freigesetzt, die mit der Oberfläche verbunden sind. Während der zweiten Stufe wird der verbliebene Wirkstoff in einer langsamen bis mittleren Geschwindigkeit freigesetzt, während sich das Polymer allmählich abbaut. In der letzten Stufe wird der gefangene Wirkstoff bei vollständiger Zerstörung der Polymermatrix rasch freigesetzt.

In der Praxis ist die Freisetzung von Wirkstoffmolekülen aus Nanopartikeln, die aus einem erodierbaren Polymer hergestellt wurden, sehr viel komplexer als eine auf Diffusion basierende Freisetzung, da verschiedene Freisetzungsmechanismen gleichzeitig beteiligt sein können. Bei Nanopartikelformulierungen mit großen spezifischen Oberflächen hat sich gezeigt, dass Bulk- und Oberflächenerosion gleichzeitig auftreten. Eine weitere Diskussion dieses Systems in der Krebstherapie findet sich in Abschnitt 6.3.

3.2. Stimuliresponsive Freisetzung

Es gibt viele klinische Situationen, in denen Behandlungen erforderlich sind, die über eine nachhaltige, kontinuierliche Freisetzung von Wirkstoffen hinausgeht.^[87] Studien zur Chronopharmakologie deuten darauf hin, dass die Entstehung bestimmter Krankheiten, wie etwa die Tumorgenese oder das Fortschreiten von Krebs, eine starke zirkadiane Abhängigkeit zeigt.^[88] Die Behandlung solcher Krankheiten erfordert intelligente Kontrollen von Wirkstofffreisetzungsmustern und -profilen als Antwort auf die physiologischen Bedingungen *in vivo* oder auf externe Reize.^[89] Im Hinblick auf das biologische System können die zum Auslösen der Freisetzung eines Wirkstoffs genutzten Reize grob in entweder innere (z.B. Variation des pH-Werts oder der Konzentrationen von Ionen, kleinen Molekülen oder Enzymen)^[70e,90] oder äußere Reize (z.B. Licht, Ultraschall, elektrisches Feld, Magnetfeld und Wärme, die üblicherweise auch als physikalische Reize bezeichnet werden) unterteilt werden.^[70e,90d,91]

Im Prinzip kann die schnelle Reaktion eines Wirkstofftransportsystems auf einen Reiz zur Echtzeit-Manipulation der Wirkstoffdosierung und darüber hinaus für eine bedarfsgerechte Wirkstoffabgabe genutzt werden. Ein breites Spektrum von stimuliresponsiven Materialien sowie deren genaue Mechanismen bei der kontrollierten Freisetzung wurde an anderer Stelle umfassend besprochen.^[70d,92] In den folgenden Abschnitten betrachten wir lediglich einige beispielhafte stimuliresponsive Freisetzungssysteme, die in der Krebstherapie genutzt werden.

3.2.1. pH-Sensitive Freisetzung

Die Veränderung des pH-Werts im Zusammenhang mit einer pathophysiologischen Situation wie etwa Krebs oder einer Entzündung wurde bereits intensiv genutzt, um die Freisetzung eines Wirkstoffs in einem spezifischen Organ (z.B. dem gastrointestinalen Trakt oder der Vagina) oder im intrazellulären Kompartiment (z.B. Endosom oder Lysosom) auszulösen.^[70e] Viele Transportsysteme nutzen dabei die Unterschiede im pH-Wert, die zwischen gesunden Geweben (etwa 7.4) und der extrazellulären Umgebung fester Tumore (6.5–6.8) existieren. Ein Ansatz ist, als Nanopartikelträger Polymere mit funktionellen Gruppen zu verwenden, die als Reaktion auf eine pH-Veränderung ihre Ladungsdichte verändern können. Namhafte Beispiele umfassen Poly(acrylamid) (PAAm), Poly(acrylsäure) (PAA), Poly(methacrylsäure) (PMAA), Poly(methylacrylat) (PMA), Poly(diethylaminoethylmethacrylat) (PDEAEMA) und Poly(dimethylaminoethylmethacrylat) (PDMAEMA). Bei Verwendung dieser Polymere kann sich die Struktur und Hydrophobie der Nanopartikelträger aufgrund von Protonierung oder Deprotonierung ändern.^[93]

Abbildung 3 zeigt schematisch, wie sich die Polymerketten als Reaktion auf die Veränderung des pH-Werts entweder ausdehnen oder zusammenfallen, wodurch Veränderungen der elektrostatischen Wechselwirkungen verursacht werden, die wiederum eine pH-abhängige Freisetzung der Wirkstoffmoleküle ermöglichen.^[93d,e] Zum Beispiel können von Blockcopolymeren abgeleitete Mizellen den vorher geladenen Wirkstoff freisetzen, wenn der pH-Wert verändert wird (Abbildung 3a). Eine Möglichkeit, die Freisetzung auszulösen, ist die Verringerung der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen einem positiv geladenen Wirkstoff (wie etwa Doxorubicin) und einem gegensätzlich geladenen Blockcopolymer durch Protonierung der Carboxylatgruppen des Blockcopolymers.^[94] Gegenüber pH-Werten sensitive Polymerketten können auch in Liposome eingebaut werden, um die Durchlässigkeit der Phospholipid-Doppelschichten pH-abhängig zu machen (Abbildung 3b).^[93e] Zum Beispiel induziert die Protonierung von Poly-2-vinylpyridin(P2VP)-Blöcken bei pH 4.9 eine Ruptur der Membran von PEG-*b*-P2VP-Polymersomen, was die Freisetzung des verkapselten Wirkstoffs auslöst.^[95] Hydrogel-Nanopartikel können ebenfalls für eine pH-sensitive Freisetzung verwendet werden, wobei Veränderungen des Protonierungs-/Deprotonierungsgrads zu einem Aufquellen und/oder Schrumpfen führen, was die Freisetzung von Wirkstoffmolekülen auslöst (Abbildung 3c).^[96] Zum Beispiel haben Bae und Mitarbeiter die

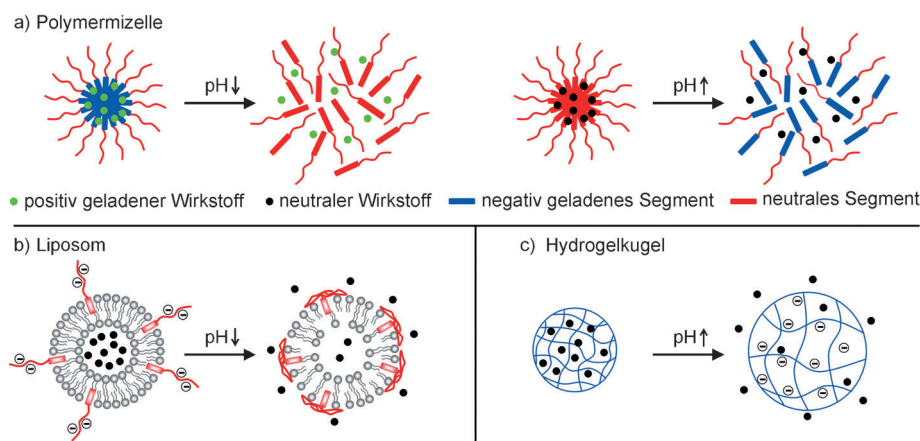


Abbildung 3. Durch pH-Änderung ausgelöste Wirkstofffreisetzung aus einer Polycarboxylat-haltigen Polymermizelle, einem Liposom und einer Hydrogelnanokugel. a) Protonierung (links) oder Deprotonierung (rechts) führt zur Zerstörung der Polymermizelle. b) Protonierung induziert den Kollaps der polyanionischen Ketten, wodurch die Liposomschale undicht wird und so den Ausstrom des Wirkstoffs aus dem Liposom begünstigt. c) Deprotonierung führt zu einem Aufquellen der Hydrogelmatrix, was eine Wirkstofffreisetzung aus der Nanokugel bewirkt. Wiedergabe nach Lit. [98a] mit freundlicher Genehmigung, Copyright 2012 Elsevier.

Synthese eines selbstorganisierten, pH-responsiven Hydrogels vorgestellt. Bei Beladung mit Doxorubicin zeigte dieses System eine Erhöhung der Toxizität bei pH 6,8, was ähnlich dem pH-Wert innerhalb des Tumorgewebes ist.^[97] Ein weiterer Ansatz ist der Einbau von spaltbaren Bindungen in den Nanopartikelträger. Die spaltbaren Bindungen können gespalten werden, um die Wirkstoffmoleküle, die an den Träger konjugiert oder darin verkapselt sind, direkt freizusetzen.^[69c,98] Abbildung 4 zeigt eine unvollständige Liste von spaltbaren Bindungen, die in ein Polymer eingebaut werden können. Im Falle von Polymer-Wirkstoff-Konjugaten wurden pH-sensitive Verbindungen wie etwa Hydrazon, Hydrazid und Acetal verwendet, um Wirkstoffmoleküle direkt an das Polymer zu binden. Dazu haben Ríhová und Mitarbeiter *N*-

(2-Hydroxypropyl)methacrylamid (HPMA) synthetisiert, ein mit Hydrazongruppen konjugiertes Polymer zur Bindung von Doxorubicin. Der Wirkstoff wurde bei pH 5 aus den Konjugaten freigesetzt.^[99] Ebenso wurde an ein mit Hydrazon verknüpft Dendrimer konjugiertes Doxorubicin auf eine pH-sensitive Weise freigesetzt. Die Freisetzung war bei pH 5 rasch beendet und erreichte innerhalb von 48 h 100%.^[100] Kratz und Mitarbeiter entwickelten ein sauer spaltbares Doxorubicin-Prodrug, das von dendritischem Polyglycerin abgeleitet wurde. Die Verwendung von Hydrazon-Bindungen führte zu einer dramatischen Veränderung der Wirkstofffreisetzung zwischen pH 5 und 6.^[101] Ein Polymer mit einem sauer abbaubaren Grundgerüst wurde über Terpolymerisation von PEG, Divinylether und Serinol erhalten. Die anhängenden Aminogruppen konnten für die Konjugation von Doxorubicin an das Polymergrundgerüst genutzt werden.^[102] In einem weiteren Beispiel wurden sauer abbaubare Bindungen wie z. B. labile Hydrazonbindungen genutzt, um die Freisetzung eines Wirkstoffs auszulösen. Solch ein Linker ermöglicht die Bindung von Doxorubicin an den hydrophoben Block eines amphiphilen Polymers.^[103]

3.2.2. Enzymsensitive Freisetzung

Enzyme führen in unserem Körper viele verschiedene, wichtige Funktionen aus. Zum Beispiel können sie Polymerketten kovalent verknüpfen, um selbstorganisierte Strukturen zu erzeugen. Sie können auch bestimmte Bindungen spalten, was einen Abbau oder eine Zerstörung der Strukturen verursacht.^[104] Letztere Enzymreaktionen können genutzt werden, um die Freisetzung eines Wirkstoffs auszulösen. Noch geschickter ist, dass die veränderte Expression eines spezifischen Enzyms im Zusammenhang mit einem pathologischen Zustand genutzt werden kann, um eine enzymvermittelte Wirkstofffreisetzung nur am gewünschten biologischen Ziel zu erreichen.^[69e]

Ein enzymsensitives Freisetzungssystem enthält entweder ein Gerüst, dessen Struktur gegen den Abbau durch ein spezifisches Enzym anfällig ist, oder eine Bindung zwischen dem Wirkstoff und dem Träger als Produkt einer enzymatischen Reaktion.^[69d] Am verbreitetsten werden für solche Anwendungen Hydrolasen eingesetzt, die kovalente Bindungen spalten oder bestimmte

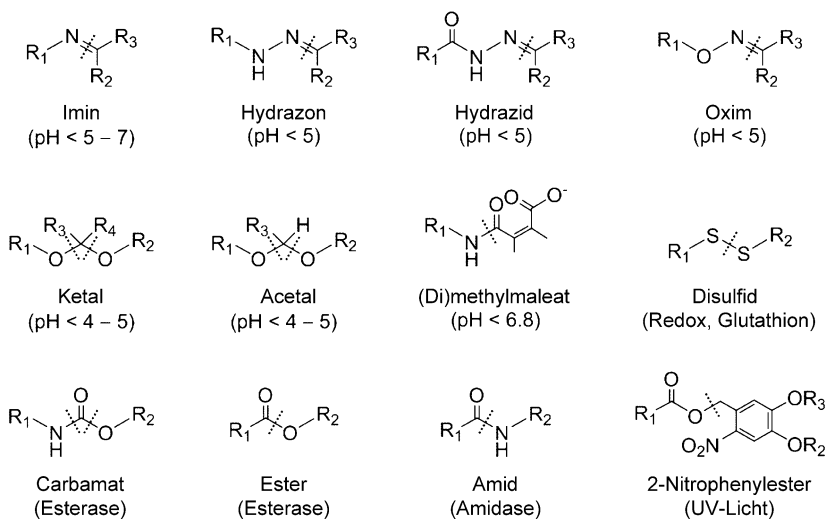


Abbildung 4. Spaltbare Linker, die zu einer stimuliresponsiven Wirkstofffreisetzung verwendet wurden. Die gepunkteten Linien geben die jeweiligen Bindungen an, die in dem betreffenden Molekül bei Aktivierung durch den entsprechenden, in der Klammer angegebenen Stimulus gespalten werden. Wiedergabe nach Lit. [70d] mit freundlicher Genehmigung, Copyright 2012 Elsevier.

chemische Gruppen modifizieren können, indem das Gleichgewicht zwischen elektrostatischen, hydrophoben und Van-der-Waals-Kräften, π - π -Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrücken verändert wird.^[104b,105] Zum Beispiel können Proteasen die Freisetzung eines über eine Peptidbindung an einen Träger gebundenen Wirkstoffs induzieren; Glycosidasen können die Freisetzung eines Polysaccharid-basierten Trägers auslösen; Lipasen können die Wirkstofffreisetzung erleichtern, indem sie die Phospholipid-Baueinheiten in einem Liposom hydrolysieren, und Hydrolasen können verwendet werden, um den Aufbau und Abbau von anorganischen Nanopartikeln sowie den Abbau eines „Gatekeeper“-Materials zu steuern, das die Poren eines Trägers blockiert.^[104b,106] Außerdem wurden Kinasen und Phosphatasen verwendet, um reversibel kovalente Bindungen zu spalten/zubilden, um so die Freisetzung eines Wirkstoffs wahlweise an- und abzuschalten.^[107]

Enzymresponsive Wirkstofftransportsysteme wurden in Form von Vesikeln (Mizellen und Liposome), Hydrogel-Nanopartikeln und porösen Siliciumdioxid-Nanopartikeln mit einer enzymesensitiven Polymerbeschichtung als Gatekeeper entworfen und hergestellt.^[105a,106,108] Sie alle erwiesen sich als vielversprechend, um eine spezifische Freisetzung am Entzündungsort und innerhalb einer Tumorzelle zu erreichen. In kürzlich veröffentlichten Studien wurden kurze Peptide mit durch Matrix-Metalloproteinasen (MMP) spaltbaren Sequenzen als Linker zwischen Polyethylenglykol(PEG)-Ketten und Liposomen,^[109] Polymer-Nanopartikeln^[110] oder Eisenoxid-Nanopartikeln verwendet.^[111] Die Spaltung der PEG-Schale in der Mikroumgebung des Tumors führte zu einer Exposition des bioaktiven Oberflächenliganden, was das Eindringen der nanogroßen Träger in die Zellen verstärkte. Dieser Ansatz erlaubte eine systemische Verabreichung von mit siRNA beladenen Nanopartikeln mit einer 70%igen Genabschaltungseffizienz bei tumortragenden Mäusen.^[112] Mesoporöse Siliciumdioxid-Nanopartikel (MSN), die mit Polysaccharid-Derivaten gepfropft wurden, zeigten eine spezifische Abgabe von Doxorubicin durch die Lysosom-vermittelte Spaltung der Glycosidbindungen und Verkürzung der Polysaccharid-Kettenlängen.^[69e,113] Gu und Mitarbeiter stellten kürzlich Nanopartikel aus Peptiddendrimeren her, die über einen enzymresponsiven Tetrapeptid-Linker, Gly-Phe-Leu-Gly (GFLG), mit Doxorubicin konjugiert waren. Die Nanopartikel zeigten eine bessere Antitumorstoffwirkung in vivo als freies Doxorubicin in gleicher Dosis.^[114]

3.2.3. Thermoresponsive Freisetzung

Die Freisetzung mittels thermischer Reize zählt zu den am umfassendsten untersuchten Strategien für einen intelligenten Wirkstofftransport, da sie den lokalen Temperaturanstieg aufgrund der pathologischen Bedingung (z. B. Tumor, Entzündung oder Infektion) ausnutzen können. Eine Freisetzung durch thermische Reize beruht auf einer abrupten Veränderung der physikalischen Eigenschaften eines temperatur-empfindlichen Materials. Solch eine abrupte Reaktion kann die Freisetzung eines Wirkstoffs auslösen, wenn die Temperaturveränderung lokal um den Träger herum erfolgt. Der

Temperaturbereich, innerhalb dessen das Wirkstofftransportsystem aktiviert wird, sollte zwischen 37 und 42°C gehalten werden, da Temperaturen oberhalb dieses Bereichs zu einer Proteindenaturierung oder Funktionsverlust führen.^[69d,115]

Temperaturresponsive Wirkstofftransportsysteme basieren üblicherweise auf Liposomen oder Nanopartikeln, die aus temperaturempfindlichen Polymeren bestehen. Bei Liposomen ist die thermische Empfindlichkeit gewöhnlich eine Folge von Konformations-/Strukturveränderungen im Zusammenhang mit den aufbauenden Lipiden, um Veränderungen der Durchlässigkeit der Lipiddoppelschichten zu induzieren.^[116] Thermosensitive Liposome (TSL) stellen ein zukunftsweisendes System für Wirkstofftransportanwendungen im Hinblick auf die Krebstherapie dar. Mit Doxorubicin beladene TSL (ThermoDox, Celsion Corporation) werden derzeit in klinischen Studien der Phase II zur Behandlung von Brustkrebs und kolorektalen Lebermetastasen untersucht und haben für die Behandlung von hepatozellulären Karzinomen die Phase III erreicht.^[69e] Erst kürzlich wurde gezeigt, dass diese hochentwickelten Liposomformulierungen ihre Ladung beim Einsetzen einer Hyperthermie (40–45°C) freisetzen.^[117] Ein auf Wärme reagierendes, Blasen erzeugendes Liposomsystem ist ein vielversprechendes Beispiel.^[117c-e] Dieses System nutzt die Erzeugung von CO₂-Bläschen durch eine rasche Zersetzung von Ammoniumbicarbonat (NH₄HCO₃) bei Erwärmen auf 40°C. Die erzeugten CO₂-Bläschen entwickeln eine zerstörende Kraft, um die Lipiddoppelschichtmembranen zu durchdringen und die Freisetzung der verkapselten Ladung, wie etwa proteolytische Enzyme^[117e] und Doxorubicin, auszulösen.^[117c,d] Andererseits durchlaufen thermosensitive Polymere infolge der Veränderung der Wasserstoffbrückenstärke zwischen den Polymerketten und Wassermolekülen einen Knäuel-Globuli-Übergang entweder an der unteren kritischen Lösungstemperatur (LCST, lower critical solution temperature) oder oberen kritischen Lösungstemperatur (UCST, upper critical solution temperature).^[118] Die LCST und UCST bezeichnen jeweils kritische Temperaturen, unterhalb und oberhalb derer das Polymer vollständig mit dem Lösungsmittel mischbar ist. Liegt die Temperatur über der LCST, wird das Polymer hydrophob und verändert seine Konformation vom expandierten (löslichen) zum globulären (unlöslichen) Zustand.^[118] Bei Verwendung des Polymers als chemisch vernetztes Netzwerk führt ein thermisch reversibles Aufquellen/Schrumpfen des Gerüsts zu einer bedarfsgerechten Freisetzung des verkapselten Wirkstoffs als Folge der kontrollierten Veränderung der Porosität.^[119] Thermosensitive Polymere können mit anderen nanoskopischen Trägern zusammengebracht werden, wie etwa Liposomen und anorganischen Nanopartikeln, um eine Thermoresponsivität einzuführen oder zu verstärken (Abbildung 5). Beispiele für thermosensitive Polymere umfassen: Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAAm), Poly(*N,N*-diethylacrylamid) (PDEAAm), Poly(methylvinylether) (PMVE), Poly(*N*-vinylcaprolactam) (PVCL) und Poly(ethylenoxid)-poly(propylenoxid)-poly(ethylenoxid) (PEO-PPO-PEO, auch bekannt unter der Bezeichnung Pluronic).^[104b,120]

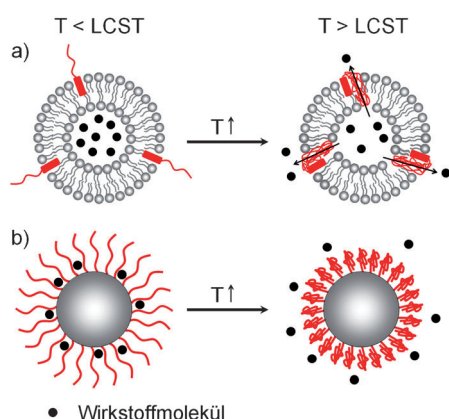


Abbildung 5. Wirkstofffreisetzung aus zwei verschiedenen Arten thermosensitiver Träger: a) ein Liposom, das ein thermosensitives Polymer enthält, und b) ein mit einem thermosensitiven Blockcopolymer beschichtetes Nanopartikel. Beim Erwärmen erfährt die thermoresponsive Komponente eine Konformationsänderung, wodurch die Wirkstofffreisetzung ausgelöst oder beschleunigt wird. Wiedergabe von (a) aus Lit. [116] mit freundlicher Genehmigung, Copyright 2013 Elsevier. Wiedergabe von (b) aus Lit. [121d] mit freundlicher Genehmigung, Copyright 2013 Royal Society of Chemistry.

3.2.4. Photosensitive Freisetzung

Die Verwendung von Licht als Reiz zum Auslösen der Wirkstofffreisetzung wurde intensiv untersucht, da sich diese Methode gut für eine Fernsteuerung eignet und Potenzial für eine hohe Raum/Zeit-Auflösung bietet (Abbildung 6).^[69d,e,121] Photosensitivität lässt sich häufig über funktionelle Gruppen, die bei Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge ihre Konformation oder andere Eigenschaften verändern können, in Nanopartikel einführen.^[122] Namhafte Beispiele umfassen Azobenzol, Pyren, Nitrobenzol, Cinnamoyl und Spiroben-

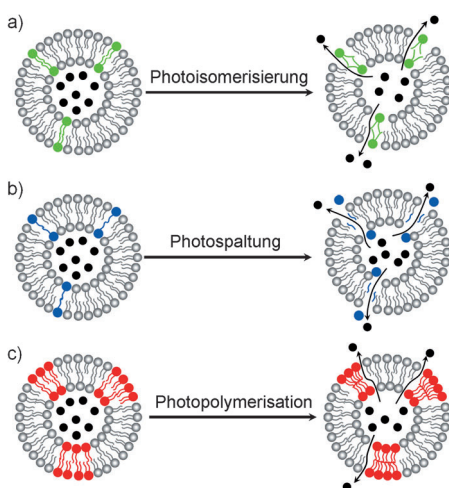


Abbildung 6. Photosensitive Liposome, die durch Einbau von photoresponsiven Einheiten in die Lipiddoppelschichten erhalten werden, um die Wirkstofffreisetzung durch optische Bestrahlung zu steuern. Die Freisetzung kann über a) Photoisomerisierung, b) Photospaltung und c) Photopolymerisation erreicht werden. Wiedergabe nach Lit. [129d] mit freundlicher Genehmigung, Copyright 2012 Ivyspring.

zopyran.^[104b,123] Das reversible molekulare Schalten der Azobenzolgruppe (und ihrer Derivate) – von *trans* zu *cis* bei Bestrahlung mit UV-Licht (300–380 nm) und von *cis* zu *trans* durch sichtbares Licht – ermöglicht eine photoregulierende Steuerung der Wirkstofffreisetzung.^[69e] Dies wurde realisiert, indem die inneren Poren von MSN mit einer Azobenzol enthaltenden Verbindung funktionalisiert wurden,^[124] indem ein auf Azobenzol basierendes Molekülventil am Eingang jeder Pore erzeugt wurde^[125] und indem eine lichtgesteuerte Wirt-Gast-Erkennung zwischen dem Hohlraum im Cyclo-dextrin und einem Azobenzolderivat eingeführt wurde.^[126] Der hydrophob/hydrophil-Übergang aufgrund des Schaltens zwischen *trans* und *cis* wurde ebenfalls für diesen Zweck genutzt.^[127] Neben diesen Systemen, an denen Konformations-/Strukturänderungen beteiligt sind, wurde UV-Licht auch genutzt, um die Freisetzung von biologischen Effektoren in einem allgemein als photoaktivierbaren („caged“) Verbindungen bekannten System durch Spaltung chemischer Bindungen auszulösen.^[128] Trotz vieler Berichte hierüber und über verwandte Systeme ist die Nutzung von UV-getriggerten Systemen aufgrund der geringen Eindringtiefe (< 200 µm), die durch die starke Streuung von Weichteilen verursacht wird, bei In-vivo-Anwendungen beschränkt.^[69f] Selbst bei In-vitro-Anwendungen kann UV-Licht Schäden an den Zellen verursachen.

Nahinfrarotstrahlung (NIR, 700–900 nm) kann viel tiefer in Weichteile eindringen als UV- und sichtbares Licht, ohne dabei das Anwendungsgebiet signifikant zu schädigen oder zu erwärmen. Plasmonische Nanopartikel können aber das absorbierte NIR-Licht in Wärme umwandeln, was zum Auslösen einer Freisetzung von Wirkstoffmolekülen genutzt wurde.^[129] Zum Beispiel konnten mit Doxorubicin beladene Au-Nanokäfige für eine kontrollierte Freisetzung durch Bestrahlung bei 808 nm verwendet werden, was die Antitumoraktivität verbesserte und dabei möglicherweise die systemische Toxizität verringerte.^[129a] Eine kurze Diskussion dieses Systems findet sich in Abschnitt 6.8. Der photothermische Effekt von Au-Nanostäbchen bei Exposition gegenüber NIR-Strahlung kann auch einen raschen Anstieg der lokalen Temperatur verursachen, was zur Induzierung einer Dehybridisierung von an Oberflächen gebundenen DNA-Helizes und dadurch zu einer Freisetzung von Doxorubicin-Molekülen genutzt wurde, die an konsekutiven Cytosin-Guanin-Basenpaaren gebunden waren.^[129b] Allerdings sind anorganische Nanopartikel gewöhnlich nicht biologisch abbaubar, und es wurden Bedenken hinsichtlich der potenziellen Langzeittoxizität geäußert.^[130] Kürzlich haben organische Energieumwandler, die absorbiertes NIR-Licht in Wärme umwandeln können, beachtliche Aufmerksamkeit erregt.^[131] Unter diesen ist Indocyaningrün (ICG), ein von der FDA zugelassener Fluoreszenzfarbstoff, das am häufigsten eingesetzte Molekül in der Krebstherapie.^[132] Zum Beispiel zeigten mit Doxorubicin und ICG beladene Nanopartikel auf PLGA-Basis unter NIR-Bestrahlung eine starke Temperaturempfindlichkeit und eine schnellere Doxorubicin-Freisetzung.^[133]

4. In-vitro- und In-vivo-Transport

Nanopartikel können, wenn sie mit der Fähigkeit einer passiven und aktiven Tumorerkennung ausgestattet wurden, die Konzentration von Wirkstoffen in einem Tumor erhöhen und dabei die systemische Toxizität in gesunden Geweben verringern. Obwohl die Verwendung von Nanopartikeln als Wirkstofftransportsysteme viele Vorteile bietet, müssen doch noch eine Reihe von Aspekten bearbeitet werden, darunter etwa ihre Instabilität im Blutkreislauf, die geringe renale Clearance, eine begrenzte Akkumulation in Krebsgeweben sowie eine unzureichende Aufnahme durch Krebszellen. Um für diese Probleme Lösungen zu finden, ist es von immenser Bedeutung, ein umfassendes Verständnis der Reaktionen von biologischen Systemen auf Nanopartikel zu erarbeiten, und zwar auf allen Ebenen von der Zelle über Gewebe und Organe bis hin zum Körper.

4.1. In-vitro-Transport

Das Verständnis des In-vitro-Transports von Nanopartikeln ist ein entscheidender Anfangsschritt in Richtung einer erfolgreichen Anwendung. Einerseits müssen die als Wirkstoffträger dienenden Nanopartikel zunächst *in vitro* auf zellulärem Niveau beurteilt werden, bevor sie weiter *in vivo* an Geweben, Organen und dem Körper getestet werden. Andererseits kann man erst mit ausreichendem Wissen über die Nanopartikel-Zell-Wechselwirkungen mit dem Anpassen der Eigenschaften von Nanopartikeln für einen optimalen Transport *in vivo* und eine wirksame Krebstherapie beginnen.

Wann immer ein Nanopartikel auf eine Zelle trifft, wird es über Endozytose rasch in die Zelle internalisiert. Anschließend wird es zu verschiedenen Organellen überführt, einschließlich der Endosome, Lysosome, dem Golgi-Apparat, den Mitochondrien, dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Zellkern. Während dieses intrazellulären Transportprozesses muss das Nanopartikel zersetzt oder abgebaut werden, um eine rasche Freisetzung seiner Ladung zu erlauben. Hier wollen wir uns nur auf die wesentlichen Schritte konzentrieren, die am In-vitro-Transport eines Nanopartikels beteiligt sind. Am Ende dieses Abschnitts gehen wir auch noch kurz auf den Aspekt der Multiwirkstoffresistenz ein.

4.1.1. Endozytose

Um den Wirkstoff für eine therapeutische Funktion vor Ort zu einem subzellulären Ziel zu transportieren, muss der Nanopartikelträger zunächst die Plasmamembran einer Zelle über Endozytose durchqueren. Dies ist ein energieabhängiger Prozess, der als Internalisierung einer Fracht in eine Zelle durch Einverleibung definiert ist. Der Endozytose-Prozess kann entweder durch eine hoch selektive Bindung zwischen dem am Nanopartikel gebundenen Liganden und dem auf der Zellmembran vorhandenen Rezeptor oder durch eine nicht selektive Bindung initiiert werden, die auf hydrophoben oder elektrostatischen Wechselwirkungen basiert. In Abhängigkeit von der Größe und den Oberflächeneigenschaften der zu internalisierenden Fracht, wurden vier Hauptwege identi-

ziert.^[134] 1) Die Clathrin-vermittelte Endozytose (auch bekannt als Rezeptorvermittelte Endozytose oder RME): Hierbei wird die Plasmamembran nach Innen zu Vesikeln von rund 100 nm Größe eingestülpt. Die Vesikel tragen spezifische Rezeptoren für die internalisierte Fracht und besitzen eine kristalline Beschichtung bestehend aus einem Proteinkomplex zusammen mit dem zytosolischen Protein Clathrin, das rekrutiert wird, um den Internalisierungsprozess zu unterstützen. 2) Caveolae-vermittelte Endozytose: Hierbei werden extrazelluläre Moleküle bei Bindung an spezifische Rezeptoren in Caveosome internalisiert. Caveosome sind flockenförmige Gruben (sogenannte Pits) mit einer Größe von 50 nm in der Plasmamembran, die auf der Oberfläche vieler, aber nicht aller Zelltypen vorkommen. 3) Pinozytose (auch bekannt als Zelltrinken): Dieser Prozess beginnt mit der Bildung einer Tasche durch Einstülpung der Zellmembran in hoch gekräuselten Bereichen. Die Tasche wird anschließend in die Zelle abgelöst, um ein Vesikel zu bilden (mit einer Größe von 0.5–5 µm), das unspezifisch mit einem großen Volumen extrazellulärer Flüssigkeit sowie den in der Flüssigkeit vorhandenen Substanzen und kleinen Partikeln gefüllt ist. 4) Phagozytose: Bei diesem Prozess binden Zellen aktiv Partikel mit einem Durchmesser von mehr als etwa 250 nm, wie etwa kleine Staubbpartikel, Zelltrümmer, Mikroorganismen und sogar apoptotische Zellen, und internalisieren diese. Die letzten beiden Prozesse umfassen viel größere Bereiche der Zellmembran als die Clathrin- und Caveolae-vermittelten Wege. Während die Pinozytose in allen Zelltypen vorkommen kann, erfolgt die Phagozytose nur bei einer kleinen Gruppe von spezialisierten Säugetierzellen, wie etwa Makrophagen, Monozyten und Neutrophilen.^[135]

Abbildung 7 zeigt eine Zusammenfassung der Endozytose-Wege, die für verschiedenste Nanopartikeln berichtet wurden. Für einen spezifischen Zelltyp wird der Internalisierungsweg von Nanopartikeln weitestgehend von deren Größe und Oberflächeneigenschaften bestimmt (Hydrophobie vs. Hydrophilie, Ladungsvorzeichen/-dichte sowie die Art/Dichte eines Liganden). Während große Partikel durch Phagozytose und Pinozytose internalisiert werden, müssen kleine Partikel über den Clathrin- und Caveolae-vermittelten Weg (oder gelegentlich unabhängig von Clathrin und Caveolae) gehen.^[136] Die Geometrie oder das Aspektverhältnis von Nanopartikeln ist ein weiterer Faktor, der sich auf die Art der zellulären Aufnahme auswirkt.^[137] Zum Beispiel fanden Lehr und Mitarbeiter, dass die Clathrin-vermittelte Endozytose der primäre Aufnahmemechanismus für sphärische Nanopartikel ist. Im Vergleich dazu kann bei Nanopartikeln mit einem hohen Aspektverhältnis eine Abmessung in das Clathrin-Limit fallen, während die andere Abmessung innerhalb des Limits von Pinozytose oder Phagozytose fällt – in diesen Fällen hängt dann der Aufnahmemechanismus tatsächlich von der Orientierung des Partikels auf der Zelloberfläche ab.^[137b] Interessanterweise wurde durch Simulationen gefunden, dass die Endozytose-Geschwindigkeit von sphärischen Nanopartikeln von deren Größe abhängt, während die Endozytose von sphärozyllindrischen Nanopartikeln über eine Abfolge von „sich Hinlegen und dann Aufstehen“ ablaufen kann, wenn die Partikel anfangs in einer aufrechten Position an der Membranebene andocken.^[137c]

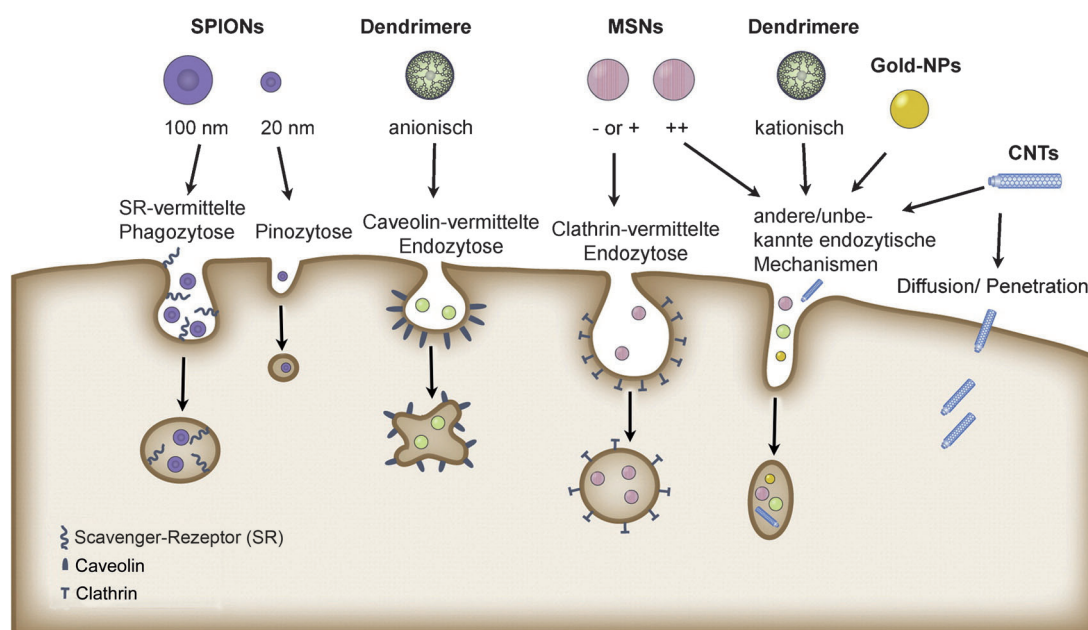


Abbildung 7. Wege zur zellulären Internalisierung verschiedenartiger Nanopartikel. Der Weg wird im Wesentlichen durch die Größe und Oberflächeneigenschaften der Nanopartikel sowie der Art (z. B. Makrophagen oder Endothelzellen) und dem Aktivierungszustand der Zellen bestimmt. Trotz des beträchtlichen Fortschritts der letzten Jahre entziehen sich die Details der Aufnahmewege bei einigen Nanopartikeln der Aufklärung. CNT, Kohlenstoffnanoröhren; MSN, mesoporöses Siliciumdioxid-Nanopartikel; SPION, superparamagnetisches Eisenoxid-Nanopartikel. Wiedergabe in modifizierter Form nach Lit. [134a] mit freundlicher Genehmigung, Copyright 2011 Elsevier.

Unter Verwendung von superparamagnetischen Eisenoxid-Partikeln (SPION) als Modellsystem haben Gupta und Mitarbeiter gezeigt, dass die Endozytosewege dieser magnetischen Nanopartikel stark mit deren Oberflächeneigenschaften korrelierten.^[138] Zum Beispiel untersuchten sie die Internalisierung von SPION und Pullulan-beschichtetem SPION (Pn-SPION) unter Verwendung eines Transmissions-elektronenmikroskops (TEM) und fanden, dass verglichen mit SPION weniger Pn-SPION in die Zellen gelangte. Diese Verringerung der Aufnahme von Pn-SPION kann der Hydrophilie von Pullulan zugeschrieben werden, was Pn-SPION an einer Wechselwirkung mit den Zellmembranen hindert.^[138,139] Mirkin und Mitarbeiter berichteten über einen vom Scavenger-Rezeptor vermittelten Endozytoseweg zur zellulären Aufnahme von DNA-beschichteten Au-Nanopartikeln.^[140] Sie fanden, dass Serumproteine die zelluläre Aufnahme von DNA-beschichteten Au-Nanopartikeln behinderten und dass die höchste Aufnahme von Au-Nanopartikeln in serumfreien Kulturen erreicht wurde. Die zelluläre Aufnahme von MSN hing neben der Partikelgröße auch von der Oberflächenladung ab.^[141] Während MSN mit einer geringen Dichte positiver Ladungen auf der Oberfläche über eine Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert wurden, durchlaufen Partikel mit einer hohen Dichte positiver Ladungen auf der Oberfläche einen ladungsabhängigen Endozytoseweg, dessen Mechanismus jedoch noch aufgeklärt werden muss.^[141a]

Die Endozytose von Nanopartikeln wird auch durch die Art und die physiologischen Bedingungen der Zellen beeinflusst. Zum Beispiel verglichen Chan und Mitarbeiter die Aufnahme von Transferrin-beschichteten Au-Nanopartikeln bei drei verschiedenen Zelllinien: embryonale murine STO-

Fibroblasten, humane Gebärmutterhalskrebszellen HeLa sowie humane SNB19-Astrozytomzellen. Sie fanden, dass HeLa-Zellen die schnellste und STO-Zellen die langsamste Aufnahme für Au-Nanopartikel zeigten und dass die Aufnahme jeweils ungeachtet der Größe der Nanopartikel über die Clathrin-vermittelte Endozytose erfolgte.^[142] Schließlich ist die Internalisierung von Nanopartikeln bekanntermaßen auch temperaturabhängig.^[143] Bei der Inkubation von PLGA-Nanopartikeln mit Zellen bei 4 °C – unter dieser Bedingung ist die energieabhängige Endozytose unterbrochen – verringerte sich die Aufnahme der Nanopartikel durch die Zellen im Vergleich zu den regulären, bei 37 °C durchgeführten Kulturen drastisch.

4.1.2. Intrazellulärer Transport

Nach der Internalisierung werden die durch Vesikel umhüllten Nanopartikel entlang des endolysosomalen Netzwerks zu anderen Organellen transportiert oder gelegentlich sogar exozytiert (Exkretion aus der Zelle). Wie in Abbildung 8 dargestellt, ist der intrazelluläre Transport von Nanopartikeln ein sehr komplexer Prozess, an dem Motorproteine beteiligt sind, die die mit Nanopartikeln beladenen Vesikel innerhalb einer Zelle entlang von Zytoskelettstrukturen (z. B. den Mikrotubuli) befördern.^[143b]

In einer kürzlich erfolgten Untersuchung verwendeten Saltzman und Mitarbeiter mit Rhodamin beladene PLGA-Nanopartikel, um intrazelluläre Transportprozesse in drei verschiedenen Epithelzelltypen zu untersuchen (HBE-Bronchialepithelzellen, kolorektale Caco-2-Epitheladenokarzinomzellen und OK-Nierenepithelzellen).^[143a] Nach der Internalisierung konnten sich die PLGA-Nanopartikel einem

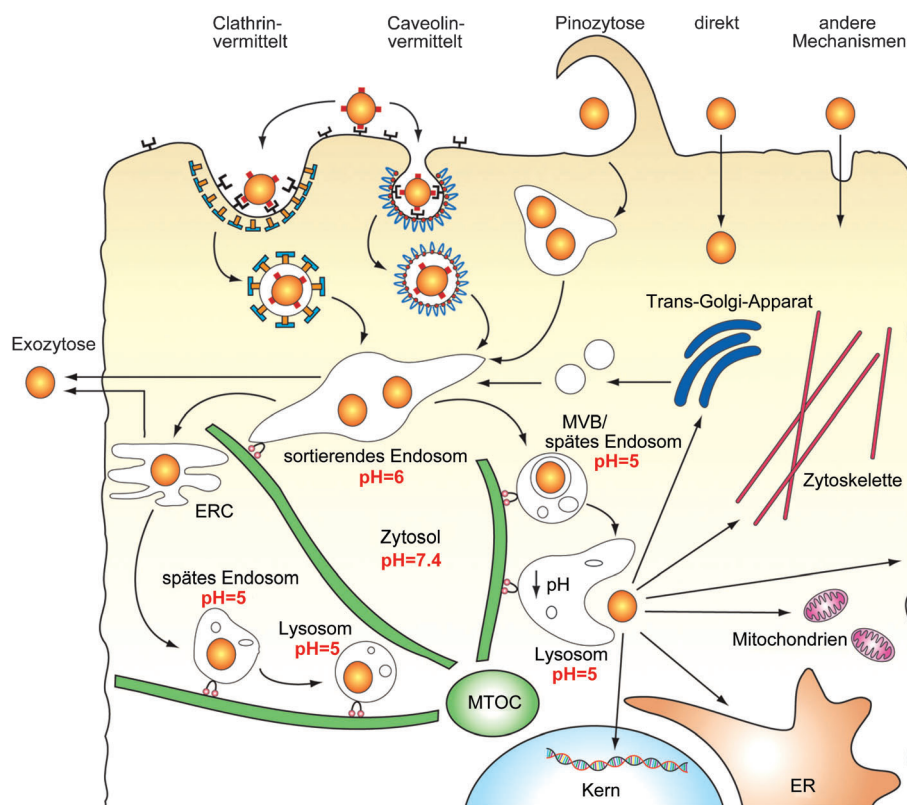


Abbildung 8. Intrazellulärer Transport von Nanopartikeln. Nach der Internalisierung wird das Nanopartikel in Vesikeln mithilfe von Motorproteinen und Zytoskelettstrukturen entlang des endolysosomalen Netzwerks transportiert. Zu beachten ist der pH-Unterschied zwischen verschiedenen intrazellulären Kompartimenten. ER, endoplasmatisches Retikulum; ERC, endozytisches Recycling-Kompartiment; MTOC, Mikrotubuli-organisierendes Zentrum; MVB, multivesikuläre Körper. Wiedergabe in modifizierter Form nach Lit. [143b] mit freundlicher Genehmigung, Copyright 2011 the Royal Society of Chemistry.

endolysosomalen Abbau entziehen und wurden anschließend zum Golgi-Apparat und dem ER transportiert. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein Endozytose-Exozytose-Weg vorgeschlagen, durch den die PLGA-Nanopartikel zuerst auf Endosome treffen, dann aus dem Kompartiment entkommen und anschließend mit exozytischen Organellen (d.h. ER, Golgi-Apparat und anderen sekretorischen Vesikeln) in der Zelle wechselwirken.

Nie und Mitarbeiter verwendeten Tat-Peptid-konjugierte Quantenpunkte (Tat-QP), um den intrazellulären Transport von Nanopartikeln in HeLa-Zellen zu untersuchen. Sie nutzten dabei die dynamische, konfokale Bildgebung und fanden, dass Tat-QP über Pinozytose internalisiert und anschließend in den Organellen des Zytoplasmas eingeschlossen wurden. Es zeigte sich, dass die mit Tat-QP beladenen Vesikel durch molekulare Maschinen aktiv entlang von Mikrotubuli-Wegen und schließlich zum Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MTOC) transportiert wurden, das sich außerhalb des Zellkerns befindet.^[144]

Interessanterweise kann die Oberfläche von Nanopartikeln mit Liganden funktionalisiert werden, um gezielt eine bestimmte Organelle in der Zelle anzusteuern. Zum Beispiel führte die Addition eines Kernlokalisierungssignal(NLS)-Peptidmotivs an die Oberfläche von Nanopartikeln zu einem

wirksamen Targeting des Zellkerns. Wie von Mao und Mitarbeitern berichtet, wurden Lipoplexe genannte Liposomprotamin/DNA-Komplexe (LPD) nach ihrer Internalisierung in den Zellkern akkumuliert, wenn die Partikeloberfläche mit NLS-Peptiden derivatisiert wurde.^[145] Im Vergleich zu LPD ohne Kern-targetierende Liganden auf der Oberfläche wurde das Genexpressionsniveau signifikant angehoben, wenn die DNA in die Zellkerne abgegeben wurde.

4.1.3. Intrazelluläres Entkommen und Abbau von Nanopartikeln

Damit Therapeutika erfolgreich transportiert und freigesetzt werden, müssen die Nanopartikel auch so entworfen werden, dass sie dem endolysosomalen Netzwerk entkommen und in das Zytosol gelangen können, das für die meisten Wirkstoffe der typische „Arbeitsplatz“ ist (Abbildung 8). Um dieses Ziel zu erreichen, wurden mehrere Strategien untersucht. Zum Beispiel wurde über eine Art von virusähnlichen Nanopartikeln berichtet, die mit den endosomalen Membranen verschmelzen und Wirkstoffe aus den Endosomen in das Zytoplasma transportieren

konnten.^[146] Alternativ wurden Nanopartikel mit einem Polymer beschichtet (typischerweise mit Aminogruppen), das zwischen pH 5.2–7.0 Pufferkapazität aufweist, um ein endosomales Entkommen über den „Protonenschwamm-Effekt“ zu ermöglichen.^[147] Sobald diese kationischen Nanopartikel in ein saures endolysosomales Kompartiment eingehüllt sind, können die Aminogruppen kontinuierlich Protonen abgeben, die über die v-ATPase (d.h. die Protonenpumpe) nach Innen gepumpt werden, was zur Akkumulation von Wassermolekülen innerhalb des Kompartiments führt.^[147] Schließlich führt das Aufquellen zu einer Ruptur des Endolysosoms. Zum Beispiel zeigen sich QP mit einer Oberflächenbeschichtung aus PEG-beschichtetem Polyethylenimin (PEI-g-PEG) in der Lage, Zellmembranen zu durchdringen und dann endolysosomale Organellen zu zerstören, und zwar aufgrund der stark positiven Oberflächenladungen durch die vielen Aminogruppen.^[148] Labhasetwar und Mitarbeiter stellten PLGA-Nanopartikel her, die auf pH-Veränderungen reagierten, und untersuchten die Internalisierung dieser Nanopartikel unter Verwendung von glatten Gefäßmuskelnzellen (vascular smooth muscle cells, VSMC). Es zeigte sich, dass die PLGA-Nanopartikel sofort nach ihrer Internalisierung aufgrund der Umkehr der Oberflächenladungen auf den Nanopartikeln von anionisch nach kationisch unter dem niedrigen

pH-Wert in den Endolysosomen und der anschließenden Induktion eines „Protonenschwamm-Effekts“ dem Endolysosom rasch entkommen konnten.^[149]

Ein rasches Entkommen/eine rasche Freisetzung von Nanopartikeln aus Endolysosomen kann auch induziert werden, wenn ihre Oberflächen mit einem pH-sensitiven Peptid modifiziert werden, das physikalisch mit endolysosomalen Membranen wechselwirken kann. GALA, ein pH-sensitives Fusionspeptid aus 30 Aminosäuren mit Wiederholungseinheiten von Glutaminsäure-Alanin-Leucin-Alanin, konnte die Lipiddoppelschicht bei einem niedrigen pH-Wert öffnen und erleichterte das Entkommen der Nanopartikel aus Endosomen.^[150] Sank der pH-Wert im Endosom von 6 auf 5, nahmen die negativen Ladungen von GALA ab, was zu einer Konformationsänderung von einer Knäuelform zu einer amphipathischen α -Helix führte. Diese Veränderung ermöglichte eine Bindung von GALA an die endosomale Membran, was ein Auseinanderreißen der Membran verursachte.

In vielen Fällen müssen Nanopartikel in den Endolysosomen oder dem Zytoplasma bis zu einem gewissen Grad zerstört werden, um eine ordnungsgemäße Freisetzung der Bealung zu ermöglichen. Bei Polymernanopartikeln können mehrere Strategien zur Verbesserung der Effizienz ihres Abbaus genutzt werden. Dazu gehört die Verwendung von enzymaktiven Linkern, säurelabilen Vernetzern, pH-sensitiven Detergentien, wärmeempfindlichen Liposomen und Disulfid-Vernetzern, die auf eine reduzierende Umgebung reagieren.^[151] In einem Beispiel untersuchten Ithakissios und Mitarbeiter die Verwendung von auf PLGA-PEG-Copolymeren basierenden Nanopartikeln zum Transport von Cisplatin.^[152] Sie fanden, dass der intrazelluläre Abbau von PLGA-PEG-Nanopartikeln von deren Zusammensetzung abhing. Bei einem höheren PEG-Gehalt nahm die Abbaugeschwindigkeit von Nanopartikeln zu, was zu einer schnelleren Freisetzung des verkapselten Cisplatin führte. In einem weiteren Beispiel berichteten Tasciotti und Mitarbeiter über ein Wirkstofftransportsystem, das auf porösen Silicium-Nanopartikeln basierte, den sogenannten mehrstufigen Nanovektoren (MSV).^[153] Nach ihren Ergebnissen wurde die Zersetzung der MSV weitestgehend durch die Porengröße bestimmt und MSV mit größeren Poren wurden schneller abgebaut. Zusammen mit der einstellbaren Wirkstoffbeladungskapazität der MSV konnte die kontrollierte Freisetzung eines Wirkstoffs durch gezieltes Einstellen der Porengröße der MSV realisiert werden.

4.1.4. Multiwirkstoffresistenz

Multiwirkstoffresistenz (multi-drug resistance, MDR) stellt für die Chemotherapie ein erhebliches Problem dar, das negative Auswirkungen auf die Behandlungseffizienz von Chemotherapeutika hat.^[154] Es wurde über zahlreiche Mechanismen berichtet, die der MDR zugrunde liegen, darunter

eine stärkere Aktivität von Effluxpumpen durch die Überexpression von ATP-bindenden Kassettentransportern (ABC-Transportern), eine geringere intrazelluläre Akkumulation von Wirkstoffen durch Nicht-ABC-Transporter, eine blockierte Apoptose, die Reparatur von wirkstoffinduzierten DNA-Schäden, metabolische Modifizierungen und die Detoxifizierung durch Wirkstoff-metabolisierende Enzyme (Abbildung 9).^[155] Von diesen Mechanismen stellt die Über-

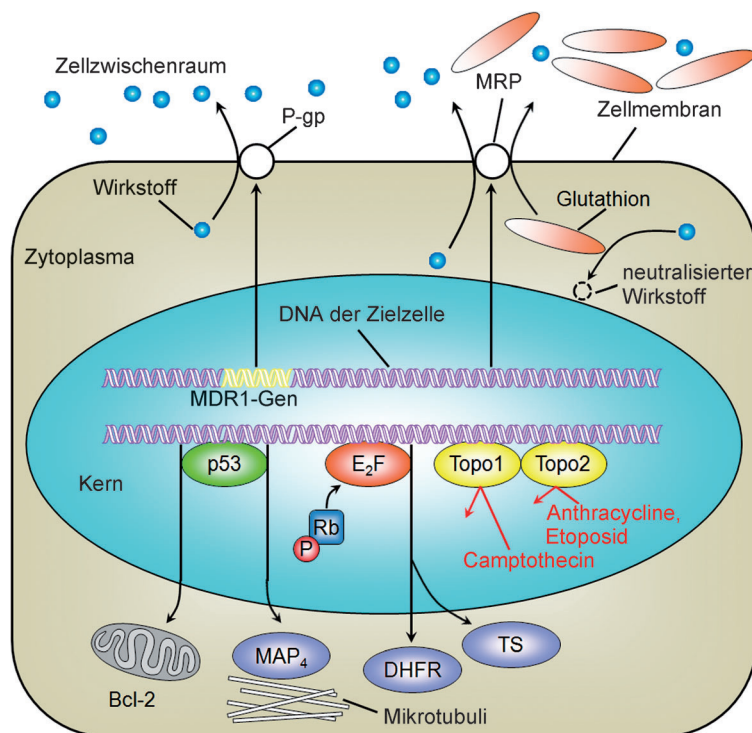


Abbildung 9. Mechanismen der Multiwirkstoffresistenz von Krebszellen: Ausschleusen von Wirkstoff, das vom Multiwirkstoffresistenzprotein (MRP) (z. B. P-Glykoprotein oder P-gp) verursacht wird; Herunterregulierung der Sensitivität gegenüber dem Wirkstoff durch das Tumorsuppressorprotein p53; Verringerung der Sensitivität gegenüber Methotrexat und Fluoruracil durch Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (Rb); Erzeugung von Resistenz gegen Camptothecine durch Herunterregulierung der Expression oder Mutationen in Topoisomerasen (Topo).

expression von P-Glycoprotein der Plasmamembran (P-gp oder ABCB1), einem Mitglied der ABC-Überfamilie, eine der häufigsten Ursachen für MDR dar. P-gp ist in der Lage, etliche positiv geladene Xenobiotika, einschließlich einiger der üblicherweise verwendeten Antitumorwirkstoffe, aus der Zelle herauszupumpen.^[154] Des Weiteren wurde die Überexpression von anderen ABC-Transportern, wie etwa MDR-Proteinen und Brustkrebsresistenzprotein (BCRP), als eine weitere Hauptursache für MDR identifiziert.

Um die MDR von Krebszellen zu unterdrücken und die zytotoxische Wirksamkeit von Antitumorwirkstoffen zu maximieren, besteht eine allgemeine Strategie darin, einen Wirkstoff (z. B. ein Gen) zur Hemmung von ABC-Transportern und zur Förderung der Apoptose gemeinsam mit einem anderen Tumortheraeutikum zu verabreichen. Dazu wurden auf Liposomen und Polymeren basierende Nanopartikelträger verwendet, um die beiden Komponenten zu verkapseln

und gleichzeitig eine präzise Abgabe an den vorgesehenen Orten sicherzustellen.^[154] In einem Beispiel zeigten Amiji und Mitarbeiter die Verwendung von PEO-modifizierten Poly(ϵ -caprolacton)-Nanopartikeln (PCL) als Mehrfachwirkstofftransportsystem für den Apoptosemodulator Ceramid und den chemotherapeutischen Wirkstoff Paclitaxel.^[156] Ihre Ergebnisse deuten darauf hin, dass das doppelte Wirkstofftransportsystem die Chemosensitivität von Eierstockkrebszellen mit MDR deutlich verbessern konnte, indem das Ausschleusen von Wirkstoff durch P-gp umgangen wurde. Alternativ berichteten Shi und Mitarbeiter über ein pH-responsives, auf MSN basierendes Mehrfachwirkstofftransportsystem, das eine MDR überwinden konnte.^[157] Sie nutzten in ihrer Untersuchung DOX als chemotherapeutischen Wirkstoff und Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), ein bei der Synthese von Au-Nanostäbchen häufig verwendetes Tensid, als MDR-Inhibitor. Die mit DOX und CTAB beladenen MSN zeigten eine höhere therapeutische Wirksamkeit gegen sowohl wirkstoffresistente MCF-7/ADR-Zellen als auch wirkstoffsensitive MCF-7-Zellen. Es wurde gezeigt, dass an dem MDR-umgehenden Mechanismus ein Synergieeffekt aus Stillstand des Zellzyklus und apoptoseinduzierendem Effekt aus der Chemosensibilisierung von CTAB beteiligt ist.

Liposome stellen eine weitere Klasse von Transportvehikeln dar, die üblicherweise zur Überwindung von MDR in der Krebstherapie genutzt werden. Mit galactosyliertem Pluronic P123 (Gal-P123) modifizierte und mit Mitoxantron beladene Liposome wurden zur Behandlung des hepatozellulären Karzinoms (hepatocellular carcinoma, HCC) verwendet. Es wurde über eine verbesserte therapeutische Wirksamkeit gegen HCC-Zellen berichtet, was der Fähigkeit des Liposoms zugeschrieben werden kann, die BCRP-vermittelte MDR umzukehren.^[158] Mit Epirubicin beladene Propylenglykol-Liposome (EPI-PG-Liposome) zeigten ebenfalls Potenzial zur Überwindung von MDR bei Brustkrebs.^[159] Dennoch ist interessant zu erwähnen, dass nicht beobachtet wurde, dass EPI-PG-Liposome P-gp stören, was darauf hindeutet, dass diese Art von Nanopartikeln in der Lage sein könnte, MDR unter Verwendung eines Mechanismus zu überwinden, der nicht die Hemmung von P-gp umfasst.

4.2. In-vivo-Transport

Während der Wirkstofftransport in vitro im Wesentlichen die Nanopartikel/Zell-Wechselwirkungen betrifft, liegt der Schwerpunkt der Anwendung in vivo mehr darauf, wie die Nanopartikelträger vom Verabreichungsort zum Krankheitsherd geschickt werden können. Bei Einführung in den Körper muss der Träger das Zielgebiet erreichen und dort akkumuliert werden, bevor irgendeine Behandlung stattfinden kann. Demzufolge müssen viele zusätzliche Aspekte betrachtet werden, die sowohl mit dem Transport von Nanopartikeln als auch mit Immunantwort, Selektivität und Targeting-Effizienz, Bioverteilung, biologischem Abbau, Clearance und Toxizität auf Organ- und Systemebene zusammenhängen. Idealerweise sollten die Nanopartikel, die als Träger eines Wirkstofftransportsystems dienen, die folgenden

Eigenschaften aufweisen: 1) eine gute Targeting-Effizienz, um einen selektive Transport des Wirkstoffs zum Zielgebiet zu gewährleisten, während die Konzentration in gesunden Geweben/Organen gleichzeitig gering gehalten wird; 2) Aufbau nur aus biologisch verträglichen und/oder abbaubaren Materialien; und 3) Clearance aus dem Körper innerhalb eines vorbestimmten Zeitrahmens.^[160] In der Realität ist es jedoch nahezu unmöglich, all diese Anforderungen zu erfüllen.

Durch die Fortschritte in der Nanotechnologie sind viele neue Materialien und Techniken entstanden, die uns dabei helfen, die vorgenannten Ziele zu erreichen. Zum Beispiel können die physikochemischen Eigenschaften von Nanopartikeln, einschließlich Zusammensetzung, Größe, Form, Morphologie, Oberflächenladung und Oberflächenbeschichtung, sämtlich maßgeschneidert werden, um die Leistungsfähigkeit der Partikel in vivo zu verbessern.^[161] Ein interessantes Beispiel hierfür ist die Verwendung von QP für Krebsdiagnostika und -therapeutika. Die Langzeittoxizität, die durch die üblicherweise zur Synthese von QP verwendeten Elemente (z. B. Cadmium, Selen und Tellur) verursacht wird, ist schwer zu vermeiden, da diese Elemente für die optischen Eigenschaften der meisten QP essenziell sind.^[162] Jedoch ist es durch Oberflächenmodifizierungen wie etwa PEGylierung und Konjugation mit zielgerichteten Substanzen möglich, deren Akkumulation in wichtigen Organen auf ein annehmbares Maß zu senken, indem ihre Halbwertszeit im Blutkreislauf erhöht und die Akkumulation in Organen durch eine stärkere Spezifität für das krankhafte Gewebe verringert wird.^[163]

Eine intravenöse Injektion stellt die am häufigsten genutzte Route zur Verabreichung von nanopartikelbasierten Therapeutika dar, da hierdurch die Barrieren in den Epithelabsorptionsprozessen durch einen direkten Eintritt in das Kreislaufsystem umgangen werden.^[164] Bei der Injektion unterliegen die Nanopartikel unmittelbar einer Clearance durch die vereinten Kräfte von MPS,^[165] Nierensystem^[166] und Immunsystem.^[167] Während des Aufenthalts im Blutkreislauf können Größe, Form und Oberflächeneigenschaften der Nanopartikel alle Einfluss auf deren Verhalten/Leistungsfähigkeit hinsichtlich Targeting und Clearance ausüben.^[136,168] Abbildung 10 zeigt, wie das Verhalten und Schicksal von Nanopartikeln im Körper von deren Größe, Oberflächenladung und Hydrophobie abhängt. Im Allgemeinen werden Nanopartikel mit einer Größe von weniger als 6 nm rasch von den Nieren herausfiltriert und ausgeschieden. Nanopartikel mit einer Größe von mehr als 8 nm können die glomeruläre Filtration nicht durchlaufen, sie sammeln sich stattdessen entweder in einem Krankheitsherd oder können durch das MPS ausgeschieden werden.^[165,169] Eine positive Oberflächenladung auf den Nanopartikeln verursacht aufgrund von Komplikationen wie etwa Hämolyse und Thrombozytenaggregation eher eine höhere systemische Toxizität. Zudem besteht die Tendenz, dass die Nanopartikel durch das MPS schnell aus dem Blut entfernt werden.^[169] Negativ geladene Nanopartikel weisen eine längere Halbwertszeit im Blutkreislauf auf als ihre positiv geladenen Pendanten, und die Halbwertszeit im Blut von neutralen Nanopartikeln ist am längsten. Eine Veränderung der Oberflächenchemie eines Nanopartikels verursacht Veränderungen der hydrodynamischen

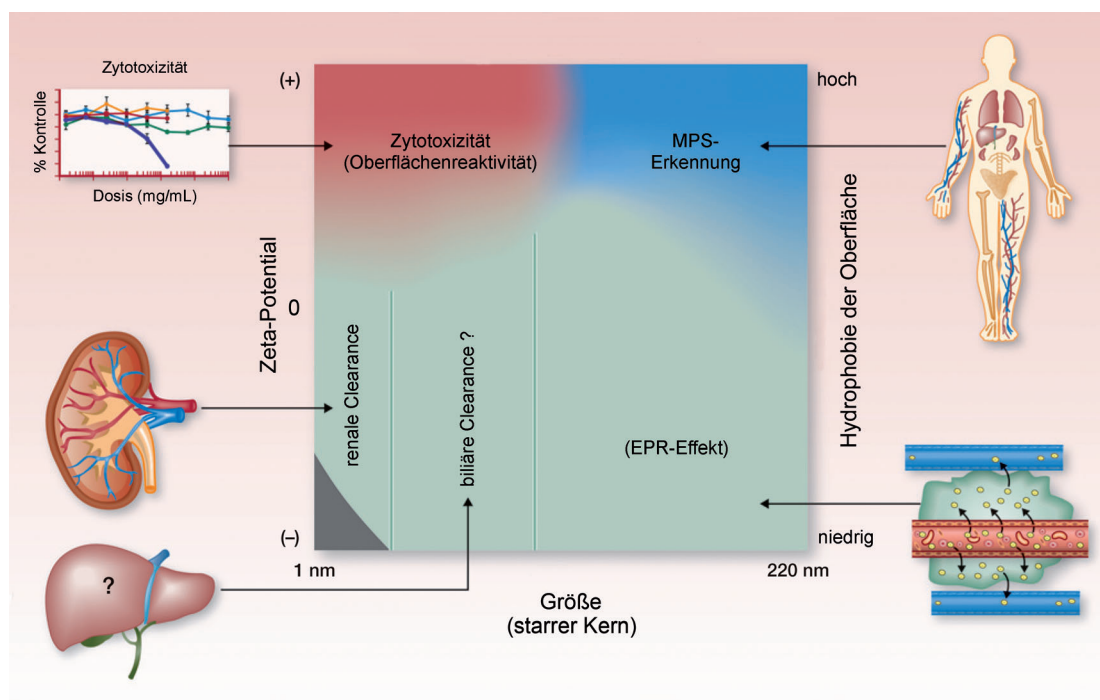


Abbildung 10. Die Oberflächenladung (Zeta-Potential), Größe und Oberflächenhydrophobie eines Nanopartikels kann dessen Zytotoxizität (Oberflächenreaktivität) sowie die Erkennung durch das mononukleäre Phagozytensystem (MPS), Clearance (renal oder biliär) beeinflussen sowie den EPR-Effekt (verstärkte Permeabilität und Retention) beim Tumor-Targeting verbessern. Wiedergabe in modifizierter Form nach Lit. [201] mit freundlicher Genehmigung, Copyright 2012 American Association for Cancer Research.

schen Größe und Oberflächenladung sowie der Reaktivität (z.B. der Bindungsaffinität). Obwohl eine vollständige Clearance nach Abschluss der Behandlung letztendlich erwünscht ist, müssen sich die Nanopartikel doch einer schnellen Clearance entziehen können, um die gewünschte Targeting-Effizienz zu erreichen. Im Allgemeinen sollte die Halbwertszeit der Nanopartikel im Blutkreislauf länger sein, damit diese einen Krankheitsherd mehrfach passieren können, was ihnen vermehrt die Möglichkeit zur dortigen Akkumulation bietet.^[170]

Um die Möglichkeiten und Herausforderungen beim Wirkstofftransport *in vivo* zu verstehen, diskutieren wir das Thema aus zwei verschiedenen Blickwinkeln: Wie erreichen die Nanopartikel den Krankheitsherd und wie erfolgt die Clearance aus dem Körper? Nach der Analyse verschiedener biologischer Schranken für den *In-vivo*-Transport von Nanopartikeln konzentrieren wir uns darauf, wie deren Pharmakokinetik und Bioverteilung optimiert werden.

4.2.1. Der EPR-Effekt und passives Tumor-Targeting

Die Nanopartikel-Therapeutika, die direkt im Blutkreislauf verabreicht werden,^[164] müssen die Gefäßwände passieren und an den Krankheitsherd gelangen, um dort ihre Beladung freisetzen. Anders als kleine Moleküle können Nanopartikel die engen Verbindungsstellen zwischen Endothelzellen auf den normalen Gefäßauskleidungen nicht passieren, und zwar aufgrund ihrer vergleichsweise beträchtlichen Größe (Abbildung 11, linkes Bild). Es ist jedoch gut bekannt, dass die Gefäße innerhalb einer Tumor-

region undichte Wände aufweisen (Abbildung 11, rechtes Bild), was Nanopartikeln in der richtigen Größe erlaubt, diese auf effiziente Weise zu passieren.^[171] Da das Lymphsystem innerhalb eines Tumors weitestgehend fehlt oder nicht funktioniert, erleichtert die unzureichende Drainage eine Akkumulation von Nanopartikeln im Tumorgewebe.^[171,172] Dieses Phänomen ist weithin als EPR-Effekt (EPR: enhanced permeability and retention) von Nanopartikeln bekannt und dient als Grundlage für ein passives Tumor-Targeting.

Der EPR-Effekt wurde zuerst von Maeda und Mitarbeitern bei der Untersuchung von durch bakterielle Infektionen verursachten Entzündungen bemerkt.^[173] 1986 lieferten Matsumura und Maeda weitere experimentelle Belege, um das Konzept des EPR-Effekts erstmals für ein Tumor-Targeting nachzuweisen.^[37a] Aufgrund des EPR-Effekts können sowohl makromolekulare Wirkstoffe als auch Nanopartikel-Therapeutika Tumore viel effizienter ansteuern als niedermolekulare Wirkstoffe, da die Extravasation von nanogroßen Objekten auf tumorselektive Weise auftritt. Über die letzten Jahrzehnte hat sich die Nutzung der hohen Permeabilität von Tumorgeweben für Nanopartikel zu einer wichtigen Strategie zum Design und der Entwicklung neuer Therapeutika für die Krebsbehandlung entwickelt.

Der EPR-Effekt ist eines der wichtigsten Merkmale und Folgen der Tumorangiogenese. Solide Tumore benötigen eine rasche Angiogenese, um eine ausreichende Zufuhr von Nährstoffen und Sauerstoff aufrechtzuerhalten.^[174] Die schnelle Proliferation von Endothelzellen während der Angiogenese führt üblicherweise zu einer verringerten Dichte

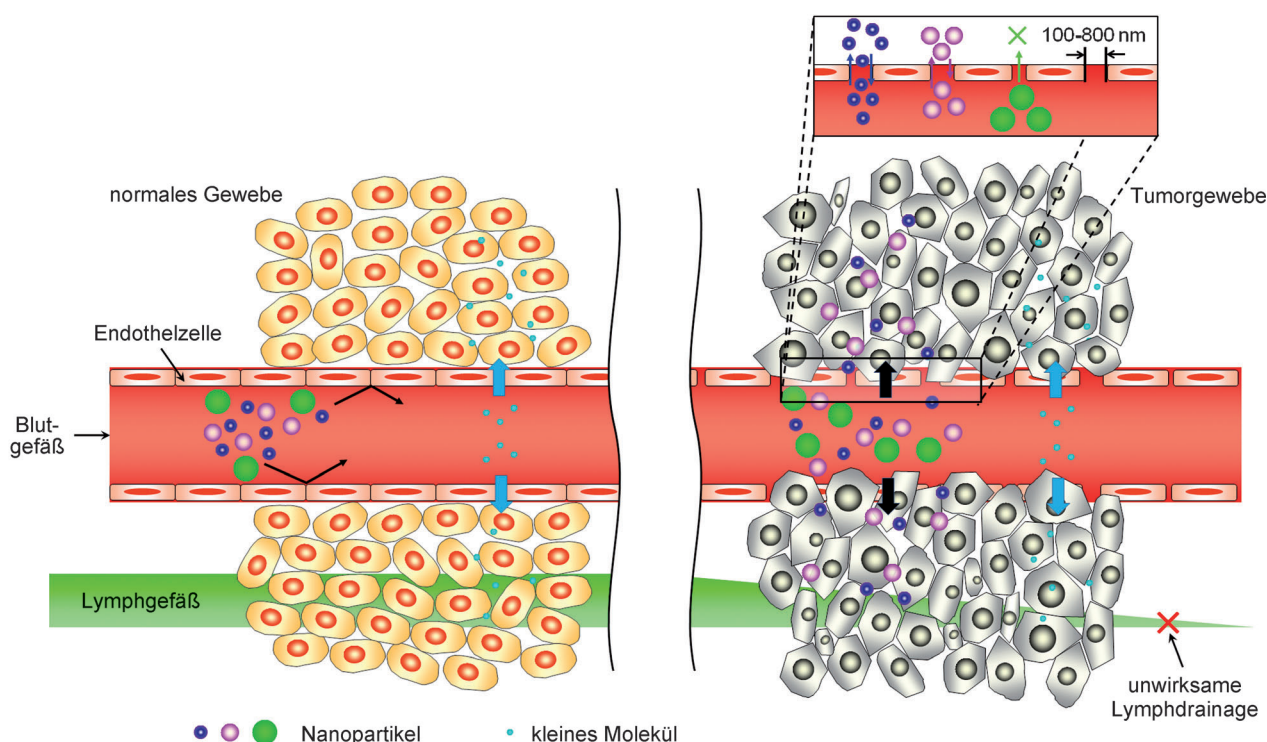


Abbildung 11. Transport von Nanopartikeln verschiedener Größen und kleiner Moleküle durch normales (links) und kanzeröses (rechts) Gewebe. Der größere EPR-Effekt ist ein charakteristisches Merkmal der meisten Tumore; er bewirkt eine stärkere Akkumulation von Nanopartikeln in kanzerösen als in normalen Geweben.

der Endothelzellen und so zu einem Verlust der Zonulae occludentes und der Bildung von großen Lücken zwischen den Zellen. Das Vorhandensein von großen Lücken zwischen den Endothelzellen an den Gefäßwänden des Tumors wurde mittels direkter Visualisierung durch optische und Elektronenmikroskopie bestätigt.^[175] Die darunter liegende Basalmembran der Blutgefäße ist häufig abnormal oder fehlt.^[176] Zudem fehlen den Tumorblutgefäßen Perizyten und Schichten aus glatten Muskelzellen, was sie gegenüber dem hohen interstitiellen Druck und schnell wechselndem Blutstrom anfälliger macht.^[177] In Abhängigkeit von der Tumorart liegt die Größe der Öffnungen im Gefäßsystem des Tumors typischerweise in einem Bereich von 100–800 nm.^[177] Bei einem MCA-IV-Maus-Mammakarzinom wurde sogar über eine funktionale Porengröße von 1200–2000 nm berichtet, was wahrscheinlich am oberen Ende des Größenbereichs für Undichtigkeiten in Tumorgefäßen liegt.^[175]

Unter den verschiedenen Parametern spielt die Größe der Nanopartikel die wichtigste Rolle bei einem Tumor-Targeting auf Grundlage des EPR. Wie in Abbildung 11 gezeigt, können nur Nanopartikel mit einer geringeren Größe als die Lücke zwischen benachbarten Endothelzellen aus dem Gefäßsystem austreten. Wie oben beschrieben, variiert die Cutoff-Größe typischerweise zwischen 100 bis 800 nm, abhängig von der Art und dem Stadium eines Tumors. Partikel, die kleiner als die Cutoff-Größe sind, können aus den Blutgefäßen in das Tumorinterstitium gelangen. Bei der Prüfung von Liposomen mit verschiedenen mittleren Größen wurde gezeigt, dass die Cutoff-Größe für eine Extravasation in Tumore bei rund 400 nm lag,^[178] wobei sich Partikel mit

Durchmessern von weniger als 200 nm als am wirksamsten erwiesen.^[5] Der Grund hierfür ist, dass Partikel mit einem Durchmesser von mehr 200 nm schneller durch die Milz aus dem Blutstrom entfernt werden (siehe Abschnitt 4.2.3). Sobald die Nanopartikel den Blutstrom verlassen haben, ist deren Penetration in die Tumorgewebe ein diffusionsvermittelter Prozess, der umgekehrt proportional zur Partikelgröße verläuft. Andererseits können die in das Tumorinterstitium übergetretenen Nanopartikel auch durch die Lücken in den Gefäßwänden in die Blutgefäße zurückkehren und dann über das MPS oder die Nieren eliminiert werden.^[5] Bei Nanopartikeln mit vergleichsweise geringer Größe kann sich schnell ein Gleichgewicht der Partikelverteilung im Gefäßsystem einstellen. Im Allgemeinen zeigen Nanopartikel mit einer Größe im Bereich von 30–200 nm eine bessere Retention durch den Gewebewiderstand, was das Gleichgewicht in Richtung Extravasation verschiebt und zu einer verstärkten Akkumulation führt. Zusammenfassend gesagt nimmt man an, dass Nanopartikel mit einer Größe zwischen 30 und 200 nm für ein passives Targeting der meisten Arten von soliden Tumoren unter Nutzung des EPR-Effekts optimal sind (Abbildung 12).^[179]

Das Tumorinterstitium spielt ebenfalls eine wesentliche Rolle für die passive Targeting-Effizienz. Das Tumorinterstitium besteht aus einem elastischen Gerüst aus Kollagenfasern, das mit einem hydrophilen Fluid gefüllt ist.^[180] Anders als die normalen Gewebe existiert im Tumorinterstitium ein hoher interstitieller Druck, insbesondere im mittleren Teil des Tumors, der tendenziell gegen die Extravasation der Nanopartikel arbeitet. Im Allgemeinen wird der Transport von

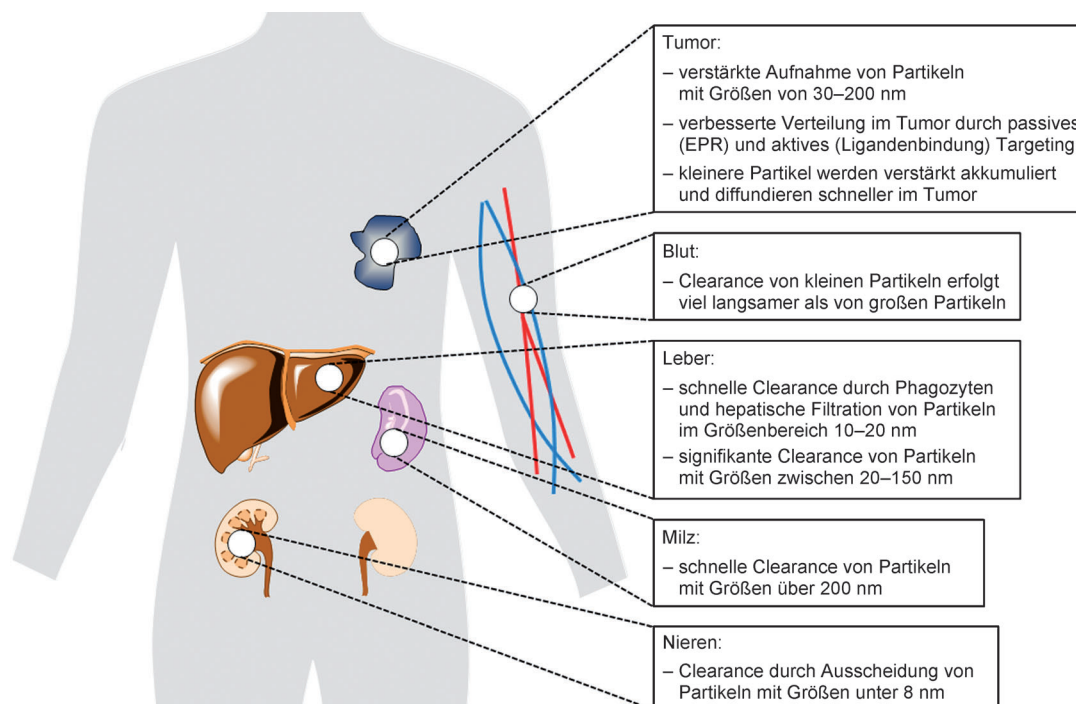


Abbildung 12. Bioverteilung von Nanopartikeln im menschlichen Körper und deren Clearance. Einige der Hauptfaktoren, die die Bioverteilung und Clearance von Nanopartikeln beeinflussen, sind Gewebedefekte sowie die Größe, zielgerichtete Liganden und Tarnkappeneigenschaften der Nanopartikel.

Nanopartikeln in das Interstitium durch eine resultierende Kraft zwischen der Extravasation und dem interstitiellen Druck sowie dem Konzentrationsgradienten getrieben.^[177,181] Interessanterweise zeigte sich, dass auch die Form der Nanopartikel eine Rolle beim EPR-basierten Tumor-Targeting spielt.^[182] Sowohl Simulationen als auch experimentelle Ergebnisse haben gezeigt, dass sphärische Nanopartikel dazu neigen, einem laminaren Strömungsmuster zu folgen, sodass nur die Partikel, die sich der Oberfläche der Gefäßwand am nächsten befinden, in den Tumor austreten können.^[7c,183] Im Gegensatz dazu sind stäbchen- und stangenförmige Nanopartikel hydrodynamisch instabiler und folgen bei ihrer Reise durch den Blutstrom nicht immer dem Strömungsmuster.^[184] Diese hydrodynamischen Eigenschaften bieten weitere Möglichkeiten, um die geometrischen Parameter der Nanopartikel passgenau einzustellen und dadurch deren Chancen zu erhöhen, die Lücken in der Gefäßwand zu durchqueren.^[184]

Die Oberflächeneigenschaften (einschließlich funktioneller Gruppen und Ladungen) können sich auf die Effizienz der Extravasation und Retention auswirken, da sie sich auf den hydrodynamischen Radius, die Plasmareaktivität, die Halbwertszeit im Blutkreislauf sowie die „Tarnkappen“-Fähigkeiten der Nanopartikel auswirken. Was Nanopartikel mit verlängerter Halbwertszeit im Blutkreislauf und „Tarnkappen“-Fähigkeiten angeht, so zeigen diese im Allgemeinen eine geringere Proteinadsorption und daher eine verbesserte Tumorakkumulation aufgrund der signifikanten Verringerung der Clearance durch das MPS.^[170]

Um eine maximale therapeutische Wirkung bei der Behandlung von soliden Tumoren zu erreichen, müssen die

Nanopartikel gleichmäßig tief in den Tumor eindringen und dann ihre Beladung freisetzen. Die zelluläre Aufnahme von Nanopartikeln ist ebenfalls erforderlich, um die Wirkstofftransporteffizienz zu erhöhen und dabei die nicht-spezifische Akkumulation ebenso zu verringern wie damit zusammenhängende Probleme wie etwa eine Multiwirkstoffresistenz (siehe Abschnitt 4.1). Trotz der weitverbreiteten Anwendung in der klinischen Praxis ist die Strategie des passiven Targeting in vielerlei Hinsicht auch eingeschränkt, da die durch Angiogenese gebildeten Gefäße in einem Tumor nicht besonders gleichmäßig verteilt sind und die Permeabilität innerhalb des Tumors nicht homogen sein muss. Bei einem kleinen Tumor oder einer metastatischen Veränderung, die keine starke Angiogenese zeigt, ist passives Targeting auf Basis des EPR-Effekt eher ineffizient.^[5] Diese Probleme lassen sich durch ein aktives Targeting adressieren.

4.2.2. Aktives Tumor-Targeting

Um die biochemischen Eigenschaften der gewünschten Zielzellen besser zu nutzen, wurden Liganden wie etwa kleine Moleküle, Peptide, Antikörper und Antikörperfragmente sowie Nucleinsäuren (z. B. Aptamere) an die Oberfläche von Nanopartikeln addiert, um deren Targeting-Effizienz zu verbessern. Diese neue Art des Targetings, die eine molekulare Erkennung umfasst, wird als aktives Targeting bezeichnet, wobei eine Liganden-Rezeptor-Bindung eine selektive und starke Bindung des Nanopartikels an die Oberfläche einer bestimmten Zellart erlaubt. Diese Strategie hat sich in vitro und bis zu einem gewissen Grad auch in vivo als effizient erwiesen.^[5,185] Zum Beispiel zeigen Nanopartikel bei Konju-

gation mit einem zielgerichteten Liganden häufig eine Verbesserung bei der Internalisierung, da dieser Prozess durch rezeptorvermittelte Endozytose dominiert wird.^[186] Der konjugierte Ligand erhöht die Bindungsaffinität und induziert dadurch effizienter eine rezeptorvermittelte Endozytose. Die Nanopartikel mit einem aktiven, zielgerichteten Liganden auf der Oberfläche sind beim Ansteuern von soliden Tumoren in vivo nach wie vor vom EPR-Effekt abhängig, um durch die Lücken in den Gefäßwänden zu gelangen.

Allerdings wird noch immer diskutiert, inwieweit die durch die Einführung eines aktiven, zielgerichteten Liganden erreichte Tumorakkumulation verbessert ist.^[187] Man nimmt an, dass die Akkumulation von Nanopartikeln im Tumorgewebe durch den passiven Prozess dominiert wird, der zeitabhängig ist und eine lange Halbwertszeit im Blutkreislauf erfordert. Wie im vorhergehenden Abschnitt diskutiert, wird die Effizienz dieses Akkumulationsprozesses weitestgehend durch die physikochemischen Eigenschaften der Nanopartikel und weniger durch den aktiven, zielgerichteten Liganden bestimmt. Selbst ohne die Verwendung eines zielgerichteten Liganden ist es stets möglich, die Akkumulation von Nanopartikeln in einem Tumor durch Anpassung ihrer Größe, Form und Oberflächenchemie zu erhöhen.^[188] In Gegenwart eines zielgerichteten Liganden kann die Retention und die Aufnahme von Nanopartikeln durch Krebszellen tatsächlich aufgrund der rezeptorvermittelten Endozytose erhöht werden, aber erst nachdem die Nanopartikel aus dem Gefäßsystem ausgetreten sind.^[189] Auf diesem Weg kann das aktive Targeting dazu beitragen, eine höhere intrazelluläre Wirkstoffkonzentration zu erreichen, selbst wenn die Verbesserung der Tumorakkumulation eher bescheiden ausfällt.^[187] Die Steigerung der intrazellulären Wirkstoffkonzentration kann die zelluläre Zytotoxizität drastisch erhöhen und die therapeutische Wirksamkeit von Wirkstoffen verbessern, die auf intrazelluläre Ziele wirken.^[189,190] Einige experimentelle Ergebnisse deuten in der Tat darauf hin, dass das aktive Targeting sowohl die Tumorakkumulation als auch die Zellaufnahme erhöht,^[191] jedoch werden diese Ergebnisse vermutlich durch unterschiedliche Oberflächeneigenschaften der Partikel, eine Ungleichheit der Tumormodelle und die Verschiedenheit der zielgerichteten Liganden verursacht.^[160a] Andererseits wird argumentiert, dass ein aktives Targeting Nanopartikel an Tumorzellen direkt neben den undichten Gefäßen verankern könnte, was die Effizienz der Diffusion, die Eindringtiefe und gleichmäßige Verteilung verringern würde.^[7h] Um diese potenziellen Nachteile zu überwinden, muss die Dichte der auf der Nanopartikeloberfläche vorhandenen, zielgerichteten Liganden sorgfältig eingestellt werden, um das Gleichgewicht zwischen Eindringtiefe und Bindungsaffinität zu optimieren.

Als vielversprechende Alternative zum Tumor-Targeting wurde aktives Gefäß-Targeting vorgestellt. Hier wird die Nanomedizin z. B. genutzt, um Endothelzellen der Tumorgefäße anzusteuern und abzutöten, wodurch wiederum Tumorzellen abgetötet werden, indem sie von der Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr abgeschnitten werden.^[192] Im Falle des aktiven Gefäß-Targeting ist der zielgerichtete Ligand von besonderer Bedeutung, da die Tumorakkumulation nicht länger durch den EPR-Effekt bestimmt wird, sondern durch die

Bindungsaffinität an Blutgefäße. Es wurden Nanopartikel zum Targeting verschiedener Einheiten auf den Gefäßwänden entwickelt, darunter die Extra-Domäne B von Fibronectin, große Tenascin-C-Isoformen, Integrine, Annexin A1 sowie vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (VEGF) und deren Rezeptoren.^[192]

Derzeit bleibt das Targeting von soliden Tumoren eine große Herausforderung und stellt einen Engpass bei der Entwicklung zukünftiger Krebstherapeutika dar. Selbst die „erfolgreichen“ nanopartikelbasierten Wirkstofftransportsysteme zeigen nach wie vor eine signifikante Akkumulation in den Hauptorganen. Im Allgemeinen hängt die therapeutische Wirkung von den Eigenschaften sowohl des Tumors (z. B. der Art und dem Grad der Angiogenese und dem Grad der Tumovaskularisation) als auch denen der Nanopartikel ab (z. B. Größe, Form, Ladung und Oberflächenchemie).^[160a] Die Toxizitätsprofile und therapeutischen Wirkungen der meisten nanoskaligen Therapeutika müssen weiterhin verbessert werden, um die Minimalanforderungen für eine klinische Anwendung zu erfüllen.

4.2.3. Clearance durch das MPS

An der Clearance einer Fremdschubstanz oder eines Fremdobjekts aus dem Körper können Organe wie die Leber, die Milz und die Nieren sowie auch das Immun- und Komplementsystem beteiligt sein (Abbildung 12). Es handelt sich dabei um einen natürlichen Prozess, der unseren Körper gesund hält. Die ursprünglichen Ziele dieser Clearance-Systeme sind hauptsächlich Pathogene wie Bakterien und Viren, sie können jedoch ebenso exogene Partikel verarbeiten. Die Clearancekraft ist so stark, dass die meisten intravenös verabreichten Nanopartikel innerhalb weniger Minuten bis Stunden aus dem Blut entfernt sind. Bei Injektion wird der Clearance-Prozess sofort mit dem (entweder passiven oder aktiven) Targeting-Prozess um die Nanopartikel „konkurrieren“, was zu einer ungünstigen Verteilung zwischen dem Tumorort und den Organen wie etwa der Leber führt. Die rasche Clearance kann den gewünschten Targeting-Effekt erheblich kompensieren und stellt eine Hauptbarriere für die Entwicklung einer wirksamen Nanomedizin dar.^[160a]

Das MPS und die renale Clearance stellen zwei Hauptwege zum Entfernen von Nanopartikeln aus unserem Körper dar. Eine der physiologischen Funktionen des MPS ist, Viren und andere relativ kleine Objekte aktiv einzufangen und zu eliminieren.^[193] Das MPS umfasst Organe wie die Leber, die Milz und Knochenmark, die reich an Phagozyten wie etwa Makrophagen, Kupffer-Zellen und Monozyten sind. Alle diese Zellen können Nanopartikel umschließen und verdauen. Studien haben gezeigt, dass das MPS für die Clearance der meisten Nanopartikel mit einer Größe von mehr als 10 nm verantwortlich ist, und zwar ungeachtet ihrer Form und Oberflächenchemie.^[165]

Gelangen Nanopartikel in das Plasma, kommt es sofort zu einer Opsonisierung der Oberfläche (d. h. der Adsorption von Serumproteinen).^[5,160a] Durch die Opsonisierung werden Fremdorganismen oder Partikel mit nichtspezifischen Proteinen überzogen, die als Opsonine bekannt sind, wodurch eine Korona erzeugt wird und die Partikel für die Phagozyten

im MPS sichtbar werden. Opsonine enthalten typischerweise Komplementproteine und Immunglobuline (üblicherweise IgG) sowie Albumine, Fibronektine, Fibrinogene und Apolipoproteine.^[194] Studien haben gezeigt, dass die Korona eine geschichtete Architektur aufweist. Den Anfang macht eine innere Schicht aus Proteinen, die mit einem $K_d \approx 10^{-6}$ bis 10^{-8} M stark an der Oberfläche adsorbiert sind, um eine harte Korona zu bilden, die dann von einer Schicht einer weichen Korona umgeben ist, die über schwache Wechselwirkungen gebildet wird.^[169,195] Die Haupttriebkraft der Opsonisierung basieren auf hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen sowie auf Entropie- und Konformationsänderungen bei den adsorbierten Proteinen.^[196] In Abhängigkeit von der Ladung und Hydrophobie der Nanopartikel kann eine Opsonisierung innerhalb von Minuten auftreten. Experimentelle Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine geladene Oberfläche tendenziell schneller von Proteinen bedeckt wird als eine neutrale Oberfläche.^[160a]

Demzufolge wird das Schicksal von Nanopartikeln im Hinblick auf die Opsonisierung durch ihre Oberflächeneigenschaften bestimmt.^[197] Phagozyten haben Ränder mit Wimpern und sternförmige Arme, wodurch sie mit einem effizienten Mechanismus zum Einfangen und Entfernen von Fremdpartikeln ausgestattet sind.^[198] Diese Zellen weisen zahlreiche Membranrezeptoren auf, einschließlich solcher für die Komplementproteine und für den Fc-Teil von IgG, das auf den Nanopartikeln abgeschieden wurde.^[198] Nach der Bindung der Nanopartikel an die Rezeptoren der Phagozyten wird eine rezeptorvermittelte Endozytose, gefolgt von einem enzymatischen Abbau ausgelöst. Segmente, die nach dem enzymatischen Abbau verbleiben, werden in den Zellen zurückgehalten und sammeln sich in Organen wie der Leber oder der Milz (dies gilt typischerweise für Edelmetallnanopartikel).^[198]

Die Leber spielt die wichtigste Rolle bei der Beseitigung von Nanopartikeln, die keine renale Clearance durchlaufen, da sie zahlreiche Kupfer-Zellen enthält, deren natürliche Funktion die Eliminierung von Fremdstoffen über Phagozytose ist. Leberzellen können ebenfalls Nanopartikel aufnehmen und verarbeiten, wobei hier die biliäre Exkretion die entscheidende Rolle bei der permanenten Entfernung bestimmter Nanopartikel aus dem Körper spielt.^[198] Sämtliche über das biliäre System ausgeschiedene Nanopartikel müssen vor der Sekretion von den Hepatozyten abgebaut werden. Daher wird die Clearance durch das biliäre System als aktiver Prozess betrachtet, auch wenn die Leberzellen nicht Teil des MPS sind. Es sollte erwähnt werden, dass die Prozessierung von Nanopartikeln durch Hepatozyten (d.h. der hepatische Prozess) sowie der biliäre Exkretionsprozess vergleichsweise langsam verlaufen, obwohl die hepatische Aufnahme von Nanopartikeln stets sehr rasch auftritt.^[193] Anders als beim hepatischen Prozess verbleiben von Kupfer-Zellen und Phagozyten prozessierte Nanopartikel dauerhaft in den MPS-Organen. Im Allgemeinen gibt es stets eine große Anzahl von in der Leber und anderen MPS-Organen akkumulierten Nanopartikeln, die potenziell langfristige Nebenwirkungen induzieren könnten.

Die Milz ist an sich ein Reinigungsorgan und besitzt ein Blutfiltrationssystem, das aus einem engen Netzwerk (ca.

200 nm Maschenweite) von Endothelzellen besteht.^[199] Nanopartikel mit einer Größe von mehr als 200 nm werden bevorzugt über die Milz ausgeschieden. Durch die Wahl einer passenden Größe und Oberflächenchemie können starre Nanopartikel mit einer langen Halbwertszeit im Blutkreislauf zu einem hohen Prozentsatz in der Milz akkumulieren.^[200] Experimente zeigen, dass sich innerhalb von 24 h nach der Injektion etwa 50 % von 250 nm großen, mit Poloxamin 908 beschichteten Polystyrol-Nanopartikeln aufgrund des physikalischen Filtrationseffekts in der Milz akkumulierten.^[199,200] Diese Eigenschaft findet sich hauptsächlich bei Nanopartikeln mit langen Plasmahalbwertszeiten, da andere Arten von Nanopartikeln aufgrund ihrer hohen Phagozyten-Aktivität nach Opsonisierung dazu neigen, durch das MPS in der Leber gefangen zu werden. Zusätzlich zu einem aktiven Einfangen durch das MPS erfolgt die Clearance von großen Nanopartikeln (> 150 nm) auch über physikalische Filtration, um Partikel in der Milz oder Leber zu fangen,^[199] weshalb die Clearance durch die Hauptorgane des MPS ein Hybrid aus aktiven und passiven Prozessen darstellt.

Um eine Clearance durch das MPS zu vermeiden, muss die Oberfläche der Nanopartikel sorgfältig manipuliert werden, um die Opsonisierung zu verhindern oder zumindest zu minimieren. Hierdurch wird auch die Plasmahalbwertszeit verlängert, die MPS-Clearance verringert und die Targeting-Effizienz erhöht. Sofern möglich, sollte die Oberfläche von Nanopartikeln neutral gehalten werden, da eine neutrale Oberfläche die geringste Menge von Serumproteinen anzieht. Das Vorhandensein von negativen Ladungen auf der Oberfläche induziert Opsonisierung und so die Aufnahme durch das MPS, jedoch im Vergleich zu einer positiv geladenen Oberfläche mit einer geringeren Geschwindigkeit.^[201] Zur Verringerung der Opsonisierung und folglich zur Erhöhung der Halbwertszeit der Nanopartikel im Blutkreislauf werden weitverbreitet Oberflächenmodifizierungen wie eine PEGylierung eingesetzt. PEGylierte Nanopartikel werden von Phagozyten aufgrund der geringeren Opsonisierung weniger erkannt, was als „Tarnkappen“-Eigenschaft bekannt ist, und tendieren zu einer effizienteren Akkumulation in Tumoren.

Jüngste Studien haben gezeigt, dass der Opsonierungsprozess sehr viel komplizierter als eine einfache Proteinabsorption sein könnte. So können Nanopartikel vom Immunsystem über Antikörper gezielt angegriffen werden. Es wurde nachgewiesen, dass bis zu 25 % der Patienten nach einer Behandlung mit PEGylierten Nanopartikeln anti-PEG-Antikörper entwickelten.^[167] Dieser Befund ist von besonderer Bedeutung, da die PEGylierung als wesentliche Möglichkeit gilt, mit der Nanopartikel mit einer „Tarnkappen“-Eigenschaft ausgestattet werden können. Weitere Studien deuten darauf hin, dass das Gleichgewicht zwischen Zytokinen der Typ1- und Typ2-T-Helferzellen (T_H1 - T_H2) und M1-M2-Makrophagen die Geschwindigkeit und Menge der Nanopartikel-Clearance ebenfalls beeinflussen, da zu einer T_H1 -Antwort neigende Mäuse Nanopartikel mit geringerer Geschwindigkeit eliminierten als zu einer T_H2 -Antwort neigende Mäuse.^[202] All diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Immunsystem die Aufnahme und Clearance von Nanopartikeln tatsächlich tiefgreifender beeinflusst, als bisher verstanden ist.

4.2.4. Renale Clearance

Die renale Clearance basiert auf physikalischer Filtration (Dialyse) und weniger auf einer Zellaufnahme. Anders als die Clearance von Nanopartikeln aus dem Blutkreislauf durch das MPS-System entfernt das renale System die Nanopartikel über den Urin aus dem Körper und akkumuliert sie nicht in den betreffenden Organen. Da die Entfernung von Nanopartikeln durch Galle ein vergleichsweise langer Prozess ist, stellt die renale Clearance eine optimale Methode zum Entfernen von Nanopartikeln aus dem Körper mit minimalen Nebenwirkungen dar.

Die renale Clearance von Nanopartikeln ist ein passiver Prozess, an dem glomeruläre Filtration und tubuläre Sekretion beteiligt sind. Nach dem Eintreten in das Glomeruluskapillarnetz werden die Nanopartikel in Abhängigkeit von ihren Eigenschaften entweder über die Glomeruluskapillaren abfiltriert oder verbleiben innerhalb des Gefäßsystems (Abbildung 13). Während der Extraktion müssen die Nanopartikel durch das gefenestrierte Endothel, die glomeruläre Basalmembran (GBM) sowie die glomerulären Epithelzellen filtriert werden.^[203] Obwohl von diesen Zelllagen bekannt ist, dass sie Poren mit Größen bis zu 43 nm aufweisen, beträgt die funktionale oder physiologische Porengröße nur etwa 5 nm,

wenn wir die vereinte Wirkung aller Lagen der Glomeruluskapillarenwand berücksichtigen.^[203,204] Da es sich um einen passiven Prozess handelt, ist die Filtration von Partikeln in hohem Maße von deren Größe abhängig.^[203] Typischerweise werden Nanopartikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von weniger als 6 nm rasch abfiltriert, während solche mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 6–8 nm weniger effizient entfernt werden und Partikel mit einer Größe von mehr als 8 nm im Allgemeinen nicht mehr entkommen können.

Unterschiedliche Partikeleigenschaften können häufig zu verschiedenen Behandlungen durch die Niere führen. Es wurden mehrere Studien unter Verwendung von QP und Au-Nanopartikeln durchgeführt, um die Wirkung dieser Eigenschaften auf die Größenschwelle für die Filtration zu untersuchen.^[160b,166] Clearancestudien mit QP zeigten eine effiziente renale Exkretion bei Partikeln mit einem hydrodynamischen Durchmesser von weniger als 6 nm (4.36–5.52 nm).^[166] QP mit einem hydrodynamischen Durchmesser von mehr als 8 nm (8.65 nm) durchliefen die renale Filtration nicht, sondern wurden stattdessen vom MPS aus dem Blutkreislauf entfernt.^[166] Andere Studien zeigen, dass sphärische Au-Nanopartikel mit einer Größe von 2 nm rasch extrahiert wurden und nur zu 3.7 % in der Leber akkumulierten. Im

Vergleich dazu fanden sich bei 6 nm großen Au-Nanopartikeln 4.0 % im Urin bzw. 27.1 % in der Leber, während bei 13 nm großen Au-Nanopartikeln 0.5 % in den Urin bzw. 40.5 % in die Leber gelangten.^[160b] Polyamidoamin(PAMAM)-Dendrimere mit einer annähernd sphärischen Form wurden ebenfalls zur Untersuchung dieser Schwelle verwendet, und Dendrimere mit einer Größe von 5.4 nm zeigten eine effiziente glomeruläre Extraktion.^[165] Diese experimentellen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Größenschwelle für die renale Filtration vergleichbar der der meisten Makromoleküle ist.

Zusätzlich zur Größe ist die Oberflächenladung ein weiterer Faktor, der die Behandlung von Nanopartikeln durch die Nieren beeinflussen kann. Mit zunehmender Oberflächenladung eines Partikels nimmt auch die Adsorption von Serumproteinen zu, was zu einem größeren hydrodynamischen Durchmesser führt.^[166] Darüber hinaus können die Oberflächenladungen auf dem Nanopartikel mit den Ladungen auf der Glomeruluskapillarenwand wechselwirken.^[203] Infolgedessen werden QP mit einer neutralen Oberflächenladung mit höherer Wahrscheinlichkeit ausgespült, während sowohl positiv als auch negativ geladene Nanopartikel mehr Serumproteine adsorbieren,^[166] was deren scheinbare hydrodynamische Durchmesser erhöht und somit die Möglichkeit drastisch verringert, über renale Filtration ausgeschieden zu werden.^[166] Die PEGylierung hat sich bei der Vorbeugung einer Proteinadsorption als sehr wirksam erwiesen, allerdings erhöht auch der PEGylierungsprozess selbst den hydrodynamischen Durchmesser, was sich negativ auf seinen

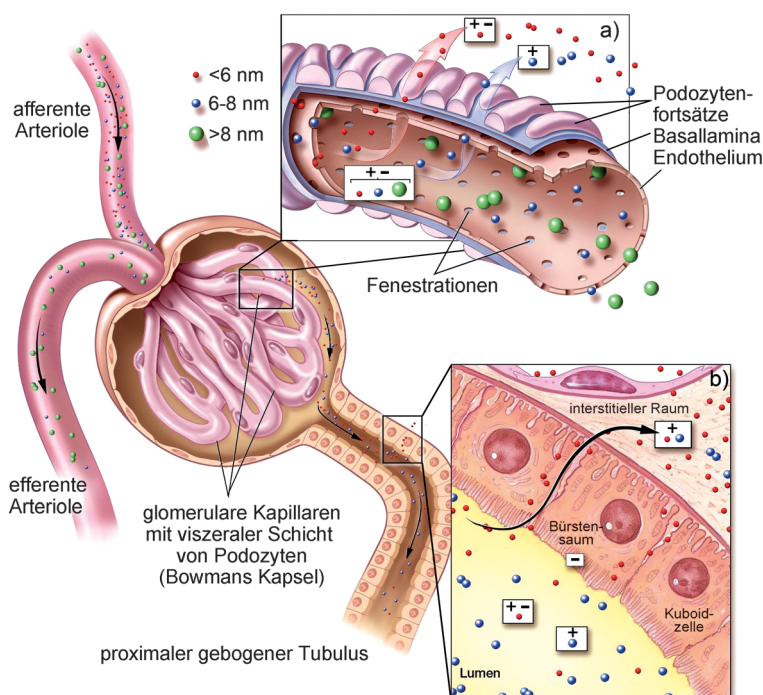


Abbildung 13. Renale Prozessierung von Nanopartikeln mit unterschiedlichen Größen und Ladungen. a) Die Glomeruluskapillarenwand enthält Filtrationsschlitze, die eine physiologische Porengröße von 4.5–5 nm aufweisen. Nanopartikel < 6 nm (rot) sind klein genug, um ohne Weiteres und ungeachtet der Oberflächenladung filtriert zu werden. Allerdings werden positiv geladene Nanopartikel zwischen 6–8 nm (violett) leichter filtriert als gleichgroße, aber negativ geladene Nanopartikel. Nanopartikel > 8 nm können keine glomeruläre Filtration durchlaufen. b) Da der Bürstensaum der proximalen Tubulus-Epithelzellen negativ geladen ist, werden positiv geladene Nanopartikel leichter resorbiert als negativ geladene Nanopartikel mit vergleichbarer Größe. Wiedergabe in modifizierter Form nach Lit. [165] mit freundlicher Genehmigung, Copyright 2008 Future Medicine.

Nutzen bei der renalen Filtration auswirkt.^[166] Bei Nanopartikeln mit einer Größe von 6–8 nm ist die Oberflächenladung und Oberflächenchemie von besonderer Bedeutung, da diese Partikel nicht mehr klein genug für eine ladungsunabhängige Filtration sind.^[203]

Vor dem Entleeren in den Urin besteht immer noch die Möglichkeit, dass die Nanopartikel von der tubulären Flüssigkeit resorbiert werden. Studien haben gezeigt, dass einige auf Polyamindendrimeren basierende Nanopartikel durch den proximalen Tubulus resorbiert werden können.^[165] Es sind weitere Untersuchungen erforderlich, um die Resorption von Nanopartikeln zu beurteilen, da die Fähigkeit zur Resorption von Nanopartikeln noch viele Fragen aufwirft.

Die Schlussfolgerung, dass Nanopartikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von weniger als 8 nm über den renalen Weg ausgeschieden werden können, wenn die Oberflächenchemie und -ladung der Nanopartikel optimiert wird, scheint begründet. Nanopartikel mit einer Größe von mehr als 8 nm können ebenfalls eine renale Clearance durchlaufen, wenn sie nach der Wirkstofffreisetzung in Fragmente mit einer Größe von weniger als 6 nm abgebaut werden können.

4.2.5. *Pharmakokinetik und Bioverteilung*

Da viele Antitumorstoffe hochtoxisch sind, ist es wünschenswert, den Wirkstoff nur am Tumorort zum Einsatz zu bringen und dann innerhalb eines bestimmten Zeitraums zu entfernen, um Nebenwirkungen zu minimieren. Bei nanopartikelbasierten Therapeutika ist die Pharmakokinetik und Bioverteilung eine Folge zahlreicher, ineinandergreifender Faktoren wie der Targeting-Effizienz und Clearance der nanoskopischen Träger sowie des Freisetzungsprofils und anderer Eigenschaften des geladenen Wirkstoffs. Im Allgemeinen werden die Pharmakokinetik und Bioverteilung eines solchen Therapeutikums bis zum Zeitpunkt der Freisetzung der Wirkstoffmoleküle weitestgehend vom Nanopartikelträger selbst bestimmt.^[205] Dies verkompliziert die Manipulierung der Pharmakokinetik und Bioverteilung von Nanomedikamenten, da sowohl die Verteilung von Nanopartikeln als auch das Freisetzungsprofil des Wirkstoffs berücksichtigt werden müssen.^[201] Bei intravenös verabreichten Nanopartikeln wird deren Verteilung im Körper weitestgehend durch die Organe und Krankheitsherde gesteuert (Abbildung 12). Bis zu einem gewissen Grad wird die Pharmakokinetik und Bioverteilung von nanoskopischen Therapeutika durch die Mengen der an diesen Stellen verteilten Nanopartikel als Funktion der Zeit bestimmt. Obwohl Leitfäden für eine Maximierung oder Minimierung der Akkumulation von Nanopartikeln an diesen Stellen erstellt wurden, bleibt es eine große Herausforderung, die optimalen Bedingungen für die Akkumulation/Clearance an all diesen Stellen zu erreichen. Im gegenwärtigen Stadium der Entwicklung endet der Großteil der verabreichten Nanopartikel in gesunden Organen und Geweben, selbst bei einer Unterstützung durch wirksames Targeting,^[201,206] und die Toxizität in gesundem Gewebe ist bei den meisten nanopartikelbasierten Therapeutika nach wie vor inakzeptabel.^[201]

Tiermodelle können Studien der Pharmakokinetik auf vielfältige Weise beeinflussen. Bei verschiedenen Arten von

Labortieren sind die primären MPS-Organen der Nanopartikelsequestrierung artabhängig.^[201] Außerdem kann die funktionelle Porengröße des Tumorgefäßsystems bei verschiedenen tierischen Xenograft-Modellen beträchtlich variieren.^[175] Da der EPR-basierte Targetingprozess stark von der Gefäßporengröße abhängt, ist es wichtig, dass dieses Merkmal des Tumorgefäßsystems so weit wie möglich den klinischen Fällen ähneln sollte.^[178] Im Allgemeinen müssen Pharmakokinetik und Bioverteilung von Nanomedikamenten systematisch von Fall zu Fall untersucht werden. Es hat sich gezeigt, dass Formulierungen, die in mehreren Xenograft-Modellen erfolgreich waren, allgemein eine bessere therapeutische Wirkung in der klinischen Anwendung hatten.^[205]

Es sollte festgehalten werden, dass verschiedene patientenspezifische Faktoren sich ebenfalls auf die Pharmakokinetik und Bioverteilung auswirken können. Zum Beispiel zeigen klinische Studien, dass sowohl Alter, Körperbau, Geschlecht als auch das Vorhandensein/Fehlen eines Tumors in der Leber die Pharmakokinetik von PEGylierten Liposomwirkstoffen verändern können.^[201] Eine Studie mit PEGyliertem Liposom-Doxorubicin (Doxil) und PEGyliertem Liposom-CKD-602 (S-CKD602) deutet darauf hin, dass die Clearance bei Patienten mit einem Alter von mehr als 60 Jahren^[207] erheblich niedriger liegt und dass weibliche Patienten tendenziell eine geringere Clearance von in PEGylierten Liposomen verkapselten Wirkstoffen zeigen. Pharmakokinetische Untersuchungen an Populationen deuten des Weiteren darauf hin, dass Patienten mit primären oder metastatischen Tumoren in der Leber zusammen mit refraktären soliden Tumoren eine höhere Clearance bei S-CKD602 aufwiesen.^[208]

4.2.6. *Biokompatibilität und biologischer Abbau*

Biokompatibilität ist ein Schwerpunkt der Forschung, seit das erste Fremdmaterial in den menschlichen Körper implantiert wurde. Da Nanopartikel und Bulkmaterialien unterschiedliche Eigenschaften haben, kann die Reaktion des Körpers selbst bei der gleichen Zusammensetzung vollkommen anders ausfallen, was zu einer vollkommen unterschiedlichen Toxizität führt. Zum Beispiel wurde Au seit Jahrhunderten weitverbreitet in der Zahnmedizin eingesetzt und ist als biologisch inert und verträglich bekannt.^[209] Umgekehrt können Au-Nanopartikel eine Toxizität aufweisen, da sie die Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) induzieren können.^[210]

Laut Kohane und Langer kann die Biokompatibilität eines Materials im Allgemeinen als ein „Ausdruck der Gutartigkeit der Beziehung zwischen einem Material und seiner biologischen Umgebung“ betrachtet werden.^[211] Wichtige Aspekte hinsichtlich der biologischen Verträglichkeit umfassen nicht nur die akute und Langzeittoxizität, sondern auch die Antwort des gesamten Körpers und die Funktionalität der beteiligten Gewebe/Organe. Im Allgemeinen zeigen biologisch inerte Nanopartikel, die keine unzulässigen toxischen, immunogenen, thrombogenen und karzinogenen Antworten induzieren, tendenziell ein höheres Maß an Biokompatibilität.

Jedoch müssen bei der Beurteilung dieses Themas mehrere Faktoren bedacht werden: 1) Die Biokompatibilität von Nanopartikeln ist stark mit der Art und den anatomischen Merkmalen der umgebenden Gewebe korreliert. Gewebe mit unterschiedlichen anatomischen Merkmalen können auf die Gegenwart des gleichen Nanopartikels ganz unterschiedlich reagieren.^[212] Nanopartikel, die für bestimmte Anwendungen in spezifischen Geweben entworfen wurden, sind für andere Anwendungen an anderen Gewebearten womöglich nicht geeignet. 2) Die intrinsischen Eigenschaften des Materials, aus dem ein Nanopartikel besteht, sind nicht notwendigerweise ein Hauptfaktor bei der Bestimmung der Biokompatibilität der Nanopartikel.^[212] 3) Bei der Bewertung der Biokompatibilität ist eine Nutzen/Risiko-Abwägung unerlässlich. Gefahren wie eine Entzündung schädigen womöglich nicht die Nachbargewebe und heilen mit der Zeit ab.^[212]

Die Biokompatibilität umfasst mehrere Aspekte, von denen die Toxizität am wichtigsten ist und zu Recht die meiste Aufmerksamkeit auf sich zieht. Die Toxizität verschiedener Arten von Nanopartikeln, einschließlich Polymere, magnetische Materialien, Edelmetalle und Halbleiter, wurde bereits an anderer Stelle zusammengefasst und diskutiert.^[213] Bisher untersuchte In-vivo-Toxizitätsprofile umfassen Hautsensibilisierung, dermale Toxizität, Augentoxizität, Inhalationstoxizität, orale Toxizität, Neurotoxizität, Entwicklungstoxizität, Reproduktionstoxizität und Genotoxizität.^[214] Die intrinsische Toxizität von Materialien, einschließlich sowohl des Nanopartikels als auch seiner Fracht, die jeweiligen Antworten des Körpers sowie jegliche erzeugte reaktive Spezies können durchweg wesentliche Rollen bei der Bestimmung der Toxizität in vivo spielen. Es muss festgehalten werden, dass Langzeitstudien (Monate bis Jahre) für die meisten Nanopartikel noch immer ausstehen.^[160a] Es ist möglich, dass einige als nicht oder nur minimal toxisch betrachtete Nanopartikel während ihres Abbaus oder ihrer Verarbeitung im Organismus ein höheres Maß von Toxizität induzieren könnten.^[160a]

Es sollte auch darauf hingewiesen werden, dass die Toxizität durch chemische Rückstände verursacht werden kann, die bei der Synthese zurückgeblieben sind. Eine vollständige Entfernung dieser Rückstände ist häufig schwierig und manchmal gar unmöglich. Zum Beispiel wird CTAB weitverbreitet bei der Synthese von Au-Nanopartikeln, insbesondere Nanostäbchen verwendet. Eine vollständige Entfernung von CTAB ist schwierig und kann zur Aggregation der Nanopartikel führen, wenn es denn vollständig entfernt ist. Die positive Ladung von auf der Oberfläche der Nanopartikel haftendem CTAB kann eine Zytotoxizität und rasche Opsonisierung, gefolgt von einer MPS-Clearance induzieren.^[215] Aus diesem Grund wurden neue Syntheseprotokolle entwickelt, an denen aus natürlichen Quellen extrahierte Reagentien als Stabilisatoren und Reduktionsmittel beteiligt sind, um Au- und Ag-Nanopartikel sowie CdSe-QP herzustellen.^[216] Trotz vielversprechender Ergebnisse sind bei derartigen Synthesen noch größere Anstrengungen erforderlich, um die Größe, Form und Gleichmäßigkeit der Nanopartikel besser zu kontrollieren.

Ein weiterer wichtiger Aspekt in der Nanomedizin ist die biologische Abbaubarkeit. Im Allgemeinen ist es für Nano-

partikel wünschenswert, vollständig zersetzt und nach der Freisetzung der Beladung aus dem Körper entfernt zu werden. Dazu wurden Nanopartikel aus einer Reihe von biologisch abbaubaren Polymeren wie etwa PLA, PGA, PLGA, PCL, Poly(alkylcyanoacrylat) (PAC), Chitosan und Gelatine entwickelt.^[217] In diesen biologisch abbaubaren Nanopartikeln wurden eine ganze Reihe von Antitumorstoffen verkapselt, darunter 9-Nitrocamptothecin, Paclitaxel, Cisplatin, Xanthone, „Rose Bengal“, Triptorelin und Dexamethason.^[59a] Um die biologische Abbaubarkeit zu demonstrieren, wurden verschiedene Arten von Tests entworfen und für diese Systeme sowohl in vivo als auch in vitro durchgeführt.^[213b] Dabei wurde gezeigt, dass diese Systeme tatsächlich in kleine Moleküle zersetzt werden konnten, die dann durch den katabolischen Mechanismus im Körper verarbeitet werden konnten.^[165] Obwohl aus biologisch abbaubaren Materialien hergestellt, zeigen diese Nanopartikel nach wie vor ein gewisses Maß von Toxizität aufgrund einer nichtspezifischen Akkumulation und daher nichtspezifischen Freisetzung ihrer toxischen Beladung in gesunden Geweben.^[218]

Goldnanopartikel wurden hinsichtlich biomedizinischer Anwendungen intensiv untersucht, wie etwa für Wirkstofftransport, Bildgebungs-kontrastverbesserung und Krebstherapie.^[219] Diese Nanopartikel werden normalerweise als nicht biologisch abbaubar betrachtet, da sie nicht ohne Weiteres verdaut werden können und die resultierenden Metallionen hochtoxisch sein können.^[220] Jedoch stellten Sokolov und Mitarbeiter kürzlich die Synthese von Au-Nanopartikeln durch den Zusammenbau von Au-Clustern vor und zeigten, dass solche Nanopartikel potenziell in vivo biologisch abbaubar sind.^[221] Die bei dieser Synthese verwendeten Au-Cluster hatten einen mittleren Durchmesser von 4 nm, was die Anforderung für eine rasche renale Clearance erfüllt. Durch eine vorsichtige Anpassung des Verhältnisses von Au-Clustern zu einem polymeren Stabilisator zeigte das Produkt mit einer Größe von 83 nm eine gute biologische Abbaubarkeit in vitro.^[221]

Zusammengefasst hängt die Biokompatibilität von Nanopartikeln von ihrer Struktur und ihren Oberflächeneigenschaften sowie von vielen anderen Faktoren ab. Im gegenwärtigen Stadium der Entwicklung fehlt für die meisten Proben noch eine Langzeitbewertung (Monate bis Jahre). Daher sind das langfristige Schicksal und die Langzeittoxizität von Nanopartikeln im Wesentlichen unbekannt.^[222] Dies ist ein besonders wesentlicher Aspekt bei Nanopartikeln, die aus nicht biologisch abbaubaren Materialien hergestellt wurden.^[223] Zudem muss die Bewertung der Biokompatibilität auf einer Fall-zu-Fall-Basis mit systematischer Methodik und einer langfristigen Ausrichtung erfolgen.

5. Perspektiven beim Design von Nanopartikelträgern

Der erste Versuch zur Entwicklung eines nanopartikelbasierten Therapeutikums kann bis zur Synthese eines Polymer-Wirkstoff-Konjugats in den 1950er Jahren zurückverfolgt werden.^[224] Seitdem wurden Nanopartikelträger unter Ver-

wendung einer großen Bandbreite von Materialien, wie etwa Proteinen, Polysacchariden, synthetischen Polymeren, Metallen und vielen anderen organischen/anorganischen Materialien, hergestellt und untersucht. Eine Hauptanforderung beim Design von Nanopartikelträgern für Wirkstofftransportanwendungen ist, dass Zusammensetzung, Größe, Form, Oberflächeneigenschaften, biologische Verträglichkeit und Zersetzungsprofil durchweg präzise maßgeschneidert und optimiert werden müssen, um eine ortsspezifische Freisetzung von Wirkstoffen in therapeutisch optimalen Geschwindigkeiten und Dosierungen zu erreichen.

5.1. Natürliche oder synthetische Materialien?

Die Verwendung von natürlichen Materialien ist attraktiv, da sie in großen Mengen zur Verfügung stehen, eine gute Bioverträglichkeit aufweisen und ohne Weiteres mittels chemisch/biochemischer Reaktionen modifizierbar sind.^[175] Natürlich vorkommende Materialien bieten gegenüber synthetischen Materialien viele Vorteile. Zum Beispiel kann das biologische System natürliche Materialien ohne Weiteres über bestehende Wege erkennen und metabolisch verarbeiten, während synthetische Materialien Toxizität, chronische Entzündungen und Probleme bei der Clearance verursachen können. Allerdings bergen auch natürliche Materialien eine Reihe von Nachteilen. So fehlen etwa dezidierte optische/elektrische/magnetische Eigenschaften, Zusammensetzung und Eigenschaften können von Charge zu Charge schwanken, die Materialien sind immunogen, haben unzulängliche biomechanische Eigenschaften und sind strukturell komplex.^[225]

Ein Hauptvorteil ist, dass natürliche Materialien in einem biologischen System ohne Weiteres durch enzymatischen oder hydrolytischen Abbau metabolisiert und daraus entfernt werden können.^[225] Dies ist womöglich bei permanenten und Langzeitimplantaten wie einem Hüftersatz unerwünscht, jedoch ist es ein klarer Pluspunkt, wenn eine zeitlich festgelegte biologische Resorption gewünscht ist. Natürliche Materialien können chemisch modifiziert und vernetzt werden, um die Abbaugeschwindigkeiten für spezifische Wirkstofftransportanwendungen anzupassen.^[226] Das am häufigsten auftretende Problem bei natürlichen Materialien ist die Immunantwort, zu der es bei Einführung in den Körper rasch kommen kann. Diese Immunantwort rührt daher, dass die eingeführten Materialien, obwohl den endogenen Komponenten der extrazellulären Matrix des Wirts ähnlich, nicht unbedingt identisch sein müssen und tatsächlich häufig antigene Kontaminationsstoffe enthalten. Dieses Problem tritt am häufigsten bei von Proteinen abstammenden Materialien auf und ist typischerweise weniger schwerwiegend bei Polysacchariden wie etwa Chitosan.^[225] Dieser immunogene Effekt kann entweder durch chemische Modifizierungen oder Reinigungen zur Entfernung von immunogenen Komponenten verringert werden. Allerdings können die komplexen Strukturen von natürlichen Materialien die Modifizierungsprozesse verkomplizieren, die bei synthetischen Materialien vergleichsweise einfach durchgeführt werden können. Trotzdem haben viele Arbeitsgruppen erfolgreiche Verfahren zur Modifizierung (und natürlich Reinigung) von natürlichen

Materialien vorgestellt. Ein weiterer häufig vorkommender Aspekt bei aus der Natur gewonnene Materialien ist die Variabilität in der molekularen Struktur von Charge zu Charge aufgrund unterschiedlicher tierischer Quellen. Diese Unbeständigkeit ist nicht nur eine Folge der Abweichungen zwischen verschiedenen Arten, sondern auch der Abweichungen auf Gewebeebene, was die Verarbeitung und Quantifizierung dieser Materialien verkomplizieren kann.^[225] Vor kurzem wurden rekombinante Techniken mit Bakterien genutzt, um verschiedene natürliche Materialien wie etwa Hyaluronsäure und Kollagene herzustellen, wodurch eine effiziente Lösung der Probleme hinsichtlich Variabilität und Immunogenität im Zusammenhang mit diesen Materialien erreicht wurde.

Derzeit wird der Wirkstofftransport von aus synthetischen Materialien hergestellten Nanopartikeln dominiert, da diese eine präzise Kontrolle der physikochemischen Eigenschaften der Formulierungen bieten. Um Antitumormittel an Tumorstellen in vivo zu transportieren, müssen die Nanopartikel stabil, biologisch inert und nichttoxisch sein. Gleichzeitig müssen sie eine ausreichend lange Zeit im Blutkreislauf verbleiben, um den Zielort zu erreichen und diesen sogar mehrfach passieren zu können. Die Nanopartikel können die Bildung einer Korona aus Serumproteinen um die Oberfläche herum induzieren, und hochgeladene Nanopartikel werden durch das MPS rascher phagozytiert als neutrale Partikel.^[195,223b,227] Durch die Verwendung von synthetischen Materialien können Oberflächenladungen und Hydrophobie auf geeignete Weise angepasst und optimiert werden, um die Halbwertszeit dieser Materialien im Blutkreislauf zu erhöhen. Außerdem kann ihre Oberflächenfunktionalität ohne Weiteres maßgeschneidert werden, um ihre Affinität für Zielrezeptoren zu maximieren.

5.2. Größe und Form

Die Größe und Form sowie die Gleichförmigkeit sind zwei wichtige Parameter von nanopartikelbasierten Wirkstofftransportsystemen, da sie die In-vivo-Verteilung, Toxizität und Targeting-Fähigkeit bestimmen.^[228] Zudem können sie die Wirkstoffbeladung, Wirkstofffreisetzung sowie die Stabilität in vitro und in vivo beeinflussen. Zum Beispiel neigen kleinere Partikel stärker zu einer Aggregation während der Lagerung und Inkubation in vitro, haben aber typischerweise eine längere Halbwertszeit im Blutkreislauf in vivo. Der Abbau von Polymernanopartikeln kann stark von deren Größe beeinflusst sein.

Viele Untersuchungen haben gezeigt, dass Nanopartikel gegenüber ihren mikrometergroßen Pendants mit Größen im Bereich von 0.1–100 µm bei Wirkstofftransportanwendungen eine Reihe von Vorteilen bieten.^[229] Im Allgemeinen weisen Nanopartikel eine vergleichsweise höhere intrazelluläre Aufnahme und breitere Verfügbarkeit bei einer ganzen Reihe von biologischen Zielen auf, was ihrer geringen Größe und erhöhten Mobilität geschuldet ist. Zum Beispiel fanden Amidon und Mitarbeiter, dass beim humanen Caco-2-Kolorektalepitheladenokarzinom Nanopartikel mit einer Größe von 100 nm eine 2.5-fach höhere Aufnahme als Mikropartikel mit einer Größe von 1 µm und eine 6-fach höhere Aufnahme

als Mikropartikel mit einer Größe von 10 μm aufwiesen.^[230] In einer nachfolgenden Untersuchung zeigte sich, dass die Nanopartikel in einer Ratte durch die submukosalen Schichten eines in situ intestinalen Schleifenmodells drangen, während sich mikrometergroße Partikel vorwiegend in der Epithelauskleidung befanden.^[231] Es wurde auch berichtet, dass Nanopartikel die Blut-Hirn-Schranke (BHS) passieren können, indem sie durch die mit einer hyperosmotischen Mannitol-Lösung behandelten Öffnungen von Zonulae occludentes gelangten. Mit Tween 80 beschichtete Nanopartikel konnten die BHS ebenfalls passieren.^[232] Als solche können Nanopartikel eine verzögerte Abgabe von Therapeutika bei schwer behandelbaren Erkrankungen wie Hirntumoren bieten.^[233] Tatsächlich erwies sich, dass einige Zelllinien nur Nanopartikel aufnahmen, während größere Partikel abgewiesen wurden.^[234]

Die Form der Nanopartikel ist beim Wirkstofftransport von ebensolcher Bedeutung wie deren Größe. Auch wenn sphärische Nanopartikel gute Kandidaten für den Wirkstofftransport sind, können anisotrope Strukturen aufgrund ihrer größeren Oberfläche/Volumen-Verhältnisse gelegentlich eine höhere Wirksamkeit bieten, wie in Abbildung 1 gezeigt. Die Anisotropie in der Struktur ermöglicht dem Träger womöglich, eine günstigere Konfiguration zur Bindung an die Zelle einzunehmen, auch wenn scharfe Kanten und Ecken Blutgefäße potenziell verletzen können.^[235] Die Mechanismen, mithilfe derer Nanopartikel Zellmembranen durchqueren, waren in den letzten Jahren Gegenstand umfangreicher Untersuchungen, da ein Verständnis und die Kontrolle der zellulären Aufnahme für die Entwicklung einer wirksameren Nanomedizin wesentlich sind.^[235,236] Eine detaillierte Diskussion findet sich in Abschnitt 4.1.

5.3. Oberflächeneigenschaften

Neben Größe und Form stellen die Oberflächeneigenschaften von Nanopartikeln einen weiteren kritischen Parameter zur Bestimmung der Wirkstoffbeladungseffizienz und des Freisetzungsprofils, für die Halbwertszeit im Blutkreislauf, das Tumor-Targeting sowie die Clearance aus dem Körper dar. Idealerweise sollten die Nanopartikel eine hydrophile Oberfläche aufweisen, um die Adsorption von Plasmaproteinen zu erschweren und so der Aufnahme durch Makrophagen zu entkommen.^[237] Dies kann auf zweierlei Wegen erreicht werden: Beschichtung der Nanopartikeloberfläche mit einem hydrophilen Polymer wie etwa PEG, oder direkte Herstellung von Nanopartikeln aus Blockcopolymeren, die sowohl hydrophile als auch hydrophobe Segmente enthalten.^[238] Untersuchungen von Elsabahy und Wooley deuten darauf hin, dass die Oberflächenchemie von Nanopartikeln einen deutlichen Einfluss auf die Toxizität, Immunogenität und Bioverteilung haben kann. So führt eine übermäßig hohe positive Ladung tendenziell zu einer raschen Opsonisierung und Clearance.^[239]

5.3.1. Oberflächenladungen

Zur Charakterisierung seiner Oberflächenladung wird üblicherweise das Zeta-Potential eines Nanopartikels herangezogen.^[240] Diese Größe spiegelt das elektrostatische Potential eines Partikels wider und wird durch die Zusammensetzung des Partikels sowie des Mediums beeinflusst, in dem das Nanopartikel suspendiert ist. Nanopartikel mit einem Zeta-Potential von mehr als 30 mV (entweder positiv oder negativ) haben sich in Suspensionen als stabil erwiesen, da aus den Oberflächenladungen resultierende Abstoßungskräfte die Partikel an einer Aggregation hindern. Zudem enthalten die innere Oberfläche von Blutgefäßen und die Oberflächen von Zellen verschiedene Arten von negativ geladenen Spezies, die negativ geladene Nanopartikel abstoßen. Erhöht sich die Oberflächenladung von Nanopartikeln (entweder positiv oder negativ), werden sie leichter von Makrophagen eliminiert, was zu einer höheren Clearance durch das MPS führt. Daher kann eine Kontrolle der Oberflächenladung die Minimierung der nichtspezifischen Wechselwirkungen zwischen Nanopartikeln und MPS unterstützen, was den Verlust von Nanopartikeln an unerwünschten Orten verhindert.^[241] Ein vollständiger Ausschluss von nichtspezifischen Wechselwirkungen ist derzeit jedoch unerreichbar.

5.3.2. PEGylierung

Zur Erhöhung der Tumortargeting-Effizienz ist es erforderlich, die Verweildauer der Nanopartikel im Blutkreislauf durch Minimierung der Opsonisierung zu verlängern. Der am häufigsten gebrauchte Ansatz zum Erreichen dieses Ziels ist die Beschichtung der Nanopartikeloberfläche mit hydrophilen PEG-Ketten.^[228]

Untersuchungen haben gezeigt, dass die Konformation von PEG auf der Nanopartikeloberfläche von größter Bedeutung ist, um Opsonine abzustoßen. Während PEG-Beschichtungen mit einer büstenähnlichen Konfiguration Phagozytose und Komplementaktivierung verringern, ist die pilzähnliche Konfiguration ein sehr wirksamer Komplementaktivator, um Phagozytose zu induzieren.^[237] Seit der ersten Verwendung von PEG zur Verlängerung der Halbwertszeit eines Proteins im Blutkreislauf^[242] wurde die PEGylierung weitverbreitet übernommen, um Nanopartikel wie etwa Liposome,^[243] Polymernanopartikel^[63a] und Mizellen^[244] vor einer vorzeitigen Clearance aus dem Blutkreislauf zu schützen. Die PEG-Ketten bilden eine hydratisierte Schale, die dem Nanopartikel eine Umgehung der Opsonisierung und nachfolgenden Phagozytose ermöglicht.^[245] Allerdings kann diese Schutzschale Wechselwirkungen des Nanopartikels mit der Zielzelle stören.^[246] Zum Beispiel zeigte PEGyliertes Liposom-Doxorubicin eine verlängerte Halbwertszeit im Blutplasma, von der erwartet wurde, mit einer besseren therapeutischen Wirksamkeit zu korrelieren. Jedoch führte die Formulierung zu einer geringeren Tumorakkumulation als die gleichen Liposome ohne PEG-Beschichtung, was auf einen kontraproduktiven Effekt der PEGylierung hindeutet.^[247] Eine kürzlich erschienene Publikation wies ebenfalls darauf hin, dass PEGylierte, multifunktionelle umschlagähnliche Nanosysteme weniger wirksam beim Transport von Genen zu

Leberzellen *in vivo* waren als solche ohne PEG-Beschichtung, was der ineffizienten Aufnahme des PEGylierten Nanosystems durch die Leberzellen zugeschrieben wurde.^[248] Unter Verwendung eines Rechenmodells zeigten Bunker und Mitarbeiter des Weiteren, dass einige zielgerichtete Einheiten aufgrund einer sterischen Hinderung durch die PEG-Schicht ihre Funktionalität verlieren könnten.^[249] Die erhöhte Stabilität von Nanopartikeln durch PEGylierung kann auch das endosomale Entkommen behindern, was ein entscheidender Schritt für einen wirksamen intrazellulären Transport von Gen-Wirkstoffen und anderen Therapeutika ist.^[250] Diese Hindernisse haben eine Suche nach neuen Strategien und Verbindungen zum Maskieren der Nanopartikel ausgelöst. Beispiele für jüngste Anstrengungen umfassen die Verwendung verschiedener Polymere synthetischen und natürlichen Ursprungs, biomimetische Beschichtungen und die bedingte Entfernung der PEG-Schichten.^[251]

5.3.3. Polysaccharide

Eine wichtige Klasse natürlicher Polymere sind die Polysaccharide, die aufgrund ihrer guten biologischen Verträglichkeit, Verfügbarkeit und einfachen Modifizierbarkeit weitverbreitet zum Wirkstofftransport und zur Gewebezüchtung verwendet werden.^[252] Aufgrund ihrer Fähigkeit, das Komplementsystem und Opsonisierung zu vermeiden, wurden einige Polysaccharide wie etwa Dextran und Heparin auch als Tarnkappenmaterialien erkannt.^[253] Einige Untersuchungen haben gezeigt, dass die Polysaccharide, wie etwa Chitosan und Hyaluronsäure sogar selbst gewisse Ligandenaktivitäten zeigen. Mit diesen Polysacchariden beschichtete Nanopartikel zeigen eine effizientere zelluläre Aufnahme als andere Nanopartikel, und zwar wegen der spezifischen Wechselwirkungen mit verschiedenen Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen.^[254] Daher ziehen Polysaccharide als wirksame Oberflächenmodifizierungssubstanzen zunehmend das Interesse der Nanomedizin auf sich.

Nanopartikel mit eingebauten Polysacchariden können durch viele verschiedene Verfahren hergestellt werden, die bereits in umfassende Übersichten zusammengefasst wurden.^[253a,255] Polysaccharide können durch elektrostatische Wechselwirkungen als Oberflächenbeschichtungen auf Nanopartikel aufgebracht oder direkt während der Synthese in die Nanopartikel eingebaut werden. Alternativ können hydrophile Polysaccharide an hydrophobe Moleküle wie etwa Cholesterin gebunden und dann über Selbstorganisation zur Bildung von Nanopartikeln verwendet werden, die in ihrem Kern auch hydrophobe Wirkstoffe verkapseln können. Darüber hinaus können Nanopartikel durch Konjugation von Polysacchariden an synthetische Polymere hergestellt werden. Zum Beispiel kann das Anbinden von Polysacchariden an die Seitenketten eines linearen, hydrophoben Polymers ein verzweigtes Copolymer erzeugen, und die Konjugation eines Polysaccharidterminus an ein lineares hydrophobes Polymer kann ein lineares Diblockcopolymer ergeben.

Bevor Polysaccharide effizient als Wirkstoffträger eingesetzt werden können, müssen jedoch einige Hürden überwunden werden. Zunächst sind die meisten Polysaccharide

natürlichen Ursprungs, und in Abhängigkeit von der Quelle können hinsichtlich Molekulargewicht und Struktur erhebliche Schwankungen auftreten. Diese Eigenschaften bestimmen die biologische Aktivität von Polysacchariden entscheidend, und so müssen alternative Verfahren etabliert werden, um Polysaccharide mit gleichbleibenden Eigenschaften herzustellen. Zweitens können biologisch aktive Kontaminationsstoffe der Polysaccharide wie etwa Endotoxine und Pathogene der gewünschten Wirkung der Polysaccharide entgegenwirken. Daher werden dringend effizientere Verfahren zum Reinigen von Polysacchariden benötigt.^[225] Drittens sind die genauen Mechanismen der biologischen Wirkungen der meisten Polysaccharide nach wie vor unklar. Geringfügige Abweichungen bei Molekulargewicht, Anordnung von Monomeren und Verzweigungsgrad können jeweils zu signifikanten Unterschieden in den biologischen Aktivitäten führen. Ein vollständiges Verständnis der Mechanismen der biologischen Effekte ist eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Einführung von Polysacchariden in nanomedizinische Anwendungen.

5.3.4. Konjugation mit zielgerichteten Liganden

Derzeit stehen viele Techniken und Werkzeuge zur Verfügung, um Nanopartikel für ein aktives Targeting von Krebszellen auszurüsten. Üblicherweise wurden monoklonale Antikörper als Zielepitope auf Zelloberflächen verwendet, jedoch hat ein umfassendes Screening von Peptid- und Aptamerbibliotheken das Repertoire von für einen gezielten Transport verfügbaren Liganden bedeutend erweitert.^[6] Die derzeit verwendeten zielgerichteten Liganden umfassen Antikörper, Antikörperfragmente, Peptide (z.B. RGD für $\alpha_v\beta_3$ -Integrin), Aptamere (z.B. die für das prostata-spezifische Membranantigen und VEGF), Oligosaccharide und sogar kleine Moleküle (Folat und SV-119).^[185c,d] solange diese ein überexprimiertes Ziel auf einer Zelloberfläche spezifisch erkennen und daran binden können. Hier wollen wir nur einen kurzen Überblick über diese Liganden geben:

1) Monoklonale Antikörper (MAb) sind Makromoleküle, die weitverbreitet als zielgerichtete Liganden eingesetzt werden, da sie unmittelbar verfügbar sind und eine hohe Affinität und Spezifität für molekulare Ziele aufweisen. Diese Liganden haben gewöhnlich ein Molekulargewicht von rund 150 kDa und zeigen hohe Bindungsaffinitäten. Bis heute wurden MAb an annähernd alle verschiedenen Arten von Nanopartikeln konjugiert, wie etwa SPION,^[255] QP,^[256] Liposome^[257] und Au-Nanokäfige,^[258] um diesen eine ortsspezifische Targeting-Fähigkeit zu verleihen. Jedoch können die voluminöse Größe und redundante konstante Regionen einige wesentliche Probleme bei der Verwendung von MAb als zielgerichtete Liganden verursachen, da diese eine hohe Immunogenität besitzen und eine Größenzunahme verursachen (d.h. die Gesamtgröße der Nanopartikel nimmt dramatisch zu). Die Verwendung von Antikörperfragmenten, Affibodies und Peptiden könnte helfen, dieses Manko zu überwinden.

2) Einzelketten-Antikörperfragmente (scFv) sind Fusionsproteine von variablen Regionen der schweren und leichten Ketten eines Antikörpers (VH und VL), die mit

einem kurzen Linkerpeptid aus 10–25 Aminosäuren verbunden werden. Das Molekulargewicht eines scFv beträgt rund 27 kDa. Durch das sorgfältige Konstruieren der MAb, um die redundanten Teile der scFv zu verringern, kann die Größe und Immunogenität des ursprünglichen Antikörpers weitestgehend verringert werden.

3) Affibodies sind kleine, stabile Z-Domänen aus 58 Aminosäuren, die sich von der IgG-Bindungsdomäne des Staphylokokken-Protein A ableiten. Die Bindungstasche besteht aus 13 Aminosäuren und kann in Abhängigkeit von der Aminosäuren-Randomisierung an viele verschiedene Ziele binden. Im Gegensatz zu IgG ermöglicht die geringe Größe (6–15 kDa) der Affibodies ein Eindringen in Tumorgewebe. Affibodies besitzen eine hohe Rezeptoraffinität, die den aktiven Teil der Fab-Region des zugehörigen Antikörpers nachahmt. Ihre kurze Plasmahalbwertszeit macht sie zu guten Kandidaten für Tumorbildgebungssonden. Allerdings sind sie weniger ideal für ein Tumor-Targeting, für das eine lange Halbwertszeit im Blutkreislauf erforderlich ist.^[259]

4) Peptide bieten brauchbare, zielgerichtete Einheiten mit verschiedenen vorteilhaften Eigenschaften, wie etwa ein geringes Molekulargewicht (etwa 1 kDa), die Fähigkeit in Gewebe einzudringen oder das Fehlen von Immunogenität. Außerdem können sie leicht hergestellt werden und sind in chemischen Konjugationsverfahren vergleichsweise flexibel.^[259] Verschiedene Peptide, die krebsspezifische, auf Tumorzellen und dem Gefäßsystem überexprimierte Epitope erkennen können, wurden als zielgerichtete Einheiten für Wirkstoffe und Wirkstoffträger verwendet. Zum Beispiel zeigen RGD-Peptide eine hohe Bindungsaffinität gegenüber Integrin,^[260] das typischerweise während der Tumorangiogenese vom Endothel überexprimiert wird. Durch Konjugation von RGD auf die Oberfläche von SPION zeigten die Nanopartikel eine überlegene Zielaffinität und Spezifität.^[261] Ein möglicher Nachteil ist, dass Peptide im Vergleich zu MAb gelegentlich eine geringere Bindungsaffinität an Rezeptoren zeigen, was jedoch durch eine Erhöhung der Bedeckungsdichte der Peptide kompensiert werden kann.

5) Aptamere sind kurze, einzelsträngige, synthetische Nucleinsäureoligomere – DNA oder RNA –, die komplexe dreidimensionale Strukturen bilden können, die ihrerseits mit hoher Affinität und Spezifität an Oberflächenmarker binden.^[262] Vorteile von Aptameren sind gute Verfügbarkeit, einfache chemische Synthese, geringes Molekulargewicht und das Fehlen von Immunogenität. Zahlreiche Veröffentlichungen berichten über die Konjugation von Aptameren als zielgerichtete Liganden an Polymernanopartikel.^[190b, 262]

6) Endogene Liganden, wie etwa Folsäure, der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und Transferrin, sind für ein Tumor-Targeting attraktiv, da sie mit geringer Immunogenität und hoher Affinität an ihre jeweiligen Rezeptoren binden können. Es wurde über mehrere Protokolle berichtet, um Folsäure,^[263] EGF^[264] und Transferrin^[265] an verschiedene Arten von Nanopartikeln zu konjugieren.

Zusammenfassend sind bei der Wahl eines zielgerichteten Liganden zahlreiche Überlegungen zu berücksichtigen, darunter die Verfügbarkeit, die Einfachheit der Herstellung, Diversität, Affinität, Protokolle zur Konjugation, Immunogenität und Kosten. Alle diese Parameter sollten sorgfältig

durchdacht werden, um Nanopartikel mit maximaler Targeting-Fähigkeit bei minimalen Kosten zu entwerfen.

5.4. Beladung mit dem Wirkstoff

Theoretisch sollte ein nanopartikelbasiertes Wirkstofftransportsystem eine hohe Wirkstoffbeladungskapazität aufweisen, um die Menge der für eine Verabreichung benötigten Materialien zu minimieren. Die Beladung von Nanopartikeln mit Wirkstoffmolekülen lässt sich auf zwei verschiedenen Wegen erreichen: 1) Einbau zum Zeitpunkt der Nanopartikelbildung und 2) Absorption (sowie Adsorption) des Wirkstoffs nach der Bildung der Nanopartikel durch Inkubieren mit einer hochkonzentrierten Wirkstofflösung.

Die Effizienz der Wirkstoffbeladung und des Einschlusses in einem Nanopartikel wird durch die Eigenschaften sowohl der Wirkstoffmoleküle als auch des Trägermaterials bestimmt. Die Eigenschaften des Materials umfassen sein Molekulargewicht, Polymerzusammensetzung, Wirkstoff-Polymer-Wechselwirkung und die funktionellen Gruppen (z.B. Carboxyl oder Ester) an beiden Enden jeder Polymerkette.^[266] Ein Makromolekül oder Protein hat die größte Beladungseffizienz, wenn die Wirkstoffbeladung am oder nahe dem isoelektrischen Punkt erfolgt, da hier die geringste Löslichkeit und eine maximale Absorption vorliegen. Bei kleinen Molekülen ist die Nutzung der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff und Matrixmaterial ein effizienter Weg, um die Wirkstoffbeladungseffizienz zu erhöhen.^[267]

Viele neuere Studien haben verschiedene Techniken zur Herstellung von Polymernanopartikeln untersucht, wie etwa die Polyelektrolyt-Komplexbildung, Bildung von Doppel-emulsionen und Verdampfen des Lösungsmittels sowie Emulsionspolymerisation.^[268] Ein gegensätzlich geladenes Polymer kann zum Einschluss von Wirkstoffen in der Polymermatrix eines Nanopartikels genutzt werden, wobei die Matrix dann den Wirkstoff durch eine Kombination aus Wirkstoffdiffusion und Polymerzersetzung freisetzt. Bei der Doppel-emulsionsbildung und Abdampfen des Lösungsmittels werden das Polymer und der Wirkstoff in einem organischen Lösungsmittel aufgelöst, gefolgt von einer Emulgation in einer wässrigen Lösung. Das organische Lösungsmittel diffundiert von der Polymerphase in die wässrige Phase und wird aus der wässrigen Phase verdampft, was wirkstoffbeladene Polymernanopartikel zurücklässt. Der Nachteil dieser Methode liegt in der geringen Einheitlichkeit der hergestellten Nanopartikel. Im Gegensatz dazu können mittels Emulsionspolymerisation, die auf der Polymerisation von Monomeren in emulgierten Tropfen basiert, gleichmäßige, nanoskalige Partikel erzeugt werden. Allerdings lassen sich nur wenige Arten von Materialien zur Herstellung von Nanopartikeln mittels Emulsionspolymerisation verwenden.

6. Fallstudien

Seit der Entwicklung des Konzepts der Nanopartikel-Therapeutika 1955 wurden viele verschiedene Arten von

Trägersystemen entwickelt oder vorgestellt. Während sich die meisten noch immer im Stadium von Laboruntersuchungen befinden, haben andere Marktreife erlangt^[269] oder befinden sich in verschiedenen Phasen klinischer Studien (Tabelle 1). In diesem Abschnitt beleuchten wir anhand einiger ausgewählter Beispiele verschiedenste Träger, darunter Protein-Wirkstoff-Konjugate, Liposome, Dendrimere, Hydrogele sowie aus biologisch abbaubaren Polymeren, Phasenwechselmaterialien und verschiedenen anorganischen Materialien bestehende Nanopartikel.

6.1. Protein-Wirkstoff-Konjugate

Diese Klasse von Wirkstofftransportsystemen basiert auf der direkten Konjugation von Wirkstoffmolekülen an Proteine für einen zielgerichteten Wirkstofftransport. Bei Verwendung eines Antikörpers spricht man hier auch von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten (antibody-drug conjugate, ADC).^[270] Der Linker zwischen Protein und Wirkstoff ist häufig biologisch abbaubar und kann so bei geeigneter Stimulierung beide Teile freisetzen. Die Einfachheit dieses Systems selbst bringt Vor- und Nachteile mit sich. Der wichtigste Vorteil liegt in der geringen Größe (etwa 10 nm) solcher Konjugate, die nicht nur eine vergleichsweise lange Halbwertszeit im Blutkreislauf der Konjugate bedingt,^[271] sondern auch deren Extravasation in die Tumorstellen im Vergleich zu größeren Nanopartikeln deutlich erleichtert, selbst bei Konjugaten, denen Liganden für ein aktives Targeting fehlen. Was die Nachteile angeht, so können nicht alle Wirkstoffe ohne Weiteres an Proteine konjugiert werden, da die strukturelle Empfindlichkeit bestimmter Wirkstoffe ihre chemische Modifizierung ausschließt. Außerdem kann die Stabilität von Wirkstoff-Protein-Linkern Probleme bereiten, da die Linker dazu neigen, mit der Zeit schnell von Proteasen und Redoxeigenschaften verändernden Substanzen im Blutkreislauf zersetzt zu werden.^[271,272] Im Allgemeinen geht man davon aus, dass proteasespaltbare Linker stabiler sind als Disulfide oder andere Linker, auch wenn die Stabilität stets maßgeschneidert werden kann.^[271,273] Darüber hinaus ist die Möglichkeit, die Konjugate mit multiplen Funktionalitäten auszustatten, recht eingeschränkt. Trotz dieser Nachteile haben technologische Fortschritte bei der Entwicklung neuer Proteinträger (z. B. monoklonaler Antikörper), Wirkstoffe und insbesondere Linker das Leistungsvermögen von ADC als potente Therapeutika außerordentlich verbessert. So wurden neuere Produktgenerationen mit immens verbesserter, systemischer Stabilität vorgestellt, bei denen die Linker in Position gehalten werden können, bis die Konjugate an der gewünschten Stelle angekommen sind, was eine präzisere und kontrollierbare Abgabe von zytotoxischen Substanzen erlaubt.^[270c,274]

Beispiele für diese Entwicklung sind die beiden Wirkstoffe TRAIL (tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand) und Monomethylauristatin E (MMAE, Abbildung 14).^[275] TRAIL kann durch Wechselwirkung mit den Todesrezeptoren DR4 und DR5 den programmierten Zelltod induzieren.^[276] Obwohl dieser Wirkstoff sich als wirksam erwiesen hat, sind viele Tumorzellen – insbesondere Brusttu-

more und Melanome – gegenüber einer TRAIL-Behandlung resistent.^[277] Interessanterweise wird TRAIL bei Bindung an Tumorzellen stets durch Endozytose internalisiert, obwohl dieser Internalisierungsprozess von der TRAIL-induzierten Apoptose unabhängig ist. Diesen Vorteil nutzend, konjugierten Chen und Mitarbeiter MMAE, ein synthetisches Tumorthérapeutikum, das die Zellteilung durch Blockade der Tubulinpolymerisation hemmen kann,^[278] über einen aus Valin und Citrullin (vc) bestehenden Linker an TRAIL (Abbildung 14b). Der Linker ist in Körperflüssigkeiten äußerst stabil, kann aber von Cathepsin (einer von mehreren humanen Krebsarten überexprimierten Protease) bei Eintritt in Tumorzellen gespalten werden.^[279] Die Autoren fanden, dass ein Konjugat aus N109C (eine aktive Mutante von TRAIL) und vcMMAE bei TRAIL-resistenten MCF-7-Brusttumorzellen einen deutlich verringerten IC₅₀ von 62.5 nM aufwies. Im Vergleich dazu überstiegen die IC₅₀-Werte bei anderen Kontrollen stets 1000 nM, darunter S96C-vcMMAE (wobei S96C eine inaktive Mutante von TRAIL ist) sowie voll aktives N109C und TRAIL allein. Sie untersuchten ferner die Bioverteilung von N109C-vcMMAE in vivo in Nacktmäusen mit humanen NCI-H460-Lungentumoren. Spannenderweise verblieb das N109C-vcMMAE 96 h nach der Injektion im Körper einer Maus annähernd vollständig in der Tumorregion, anders als die auf Rinderse-rumalbumin (bovine serum albumine, BSA) basierende Kontrolle, die zu einer Akkumulation in mehreren Organen neigte (Abbildung 14c,d). Dieses starke Targeting-Vermögen von N109C-vcMMAE-Konjugaten, selbst bei Fehlen eines Antikörpers oder anderer Liganden, kann der geringen Größe und dem EPR-Effekt am Tumorort zugeschrieben werden. Die Targeting-Effizienz kann durch Konjugation mit einem Antikörper noch weiter verbessert werden.

6.2. Liposome

Liposome sind sphärische Vesikel mit einem Durchmesser von typischerweise 50–500 nm, die aus einer Lipiddoppelschicht bestehen, die sich beim Emulgieren von Lipiden in einem wässrigen Medium bildet.^[280] Die Bildung von Liposomen ist ein spontaner Prozess, der durch Wechselwirkungen zwischen Wassermolekülen und amphiphilen Lipidmolekülen ermöglicht wird. Nach der Bildung ist im Kern eines jeden Liposoms ein wässriges Volumen eingeschlossen. Dadurch haben Liposome die Fähigkeit, gelöste Stoffe selektiv durch Einkapselung aufzunehmen, was die Grundlage für den Wirkstofftransport bildet. Über dieses Wirkstofftransportsystem wurde erstmals in den 1960er Jahren berichtet,^[281] und es stellt eines der wenigen Systeme dar, die erfolgreich in die klinische Praxis überführt wurden.^[7h]

Üblicherweise bei der Bildung von Liposomen verwendete Lipide umfassen mit Phosphatidylcholin angereicherte Phospholipide, entweder natürlichen (z. B. Cholesterin und Phosphatidylcholin) oder synthetischen Ursprungs (z. B. 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin, DOPC). Die Eigenschaften eines Liposoms, wie etwa Permeabilität, Oberflächenladung und Hydrodynamik, werden im Wesentlichen durch die Phospholipidzusammensetzung der Doppelschicht

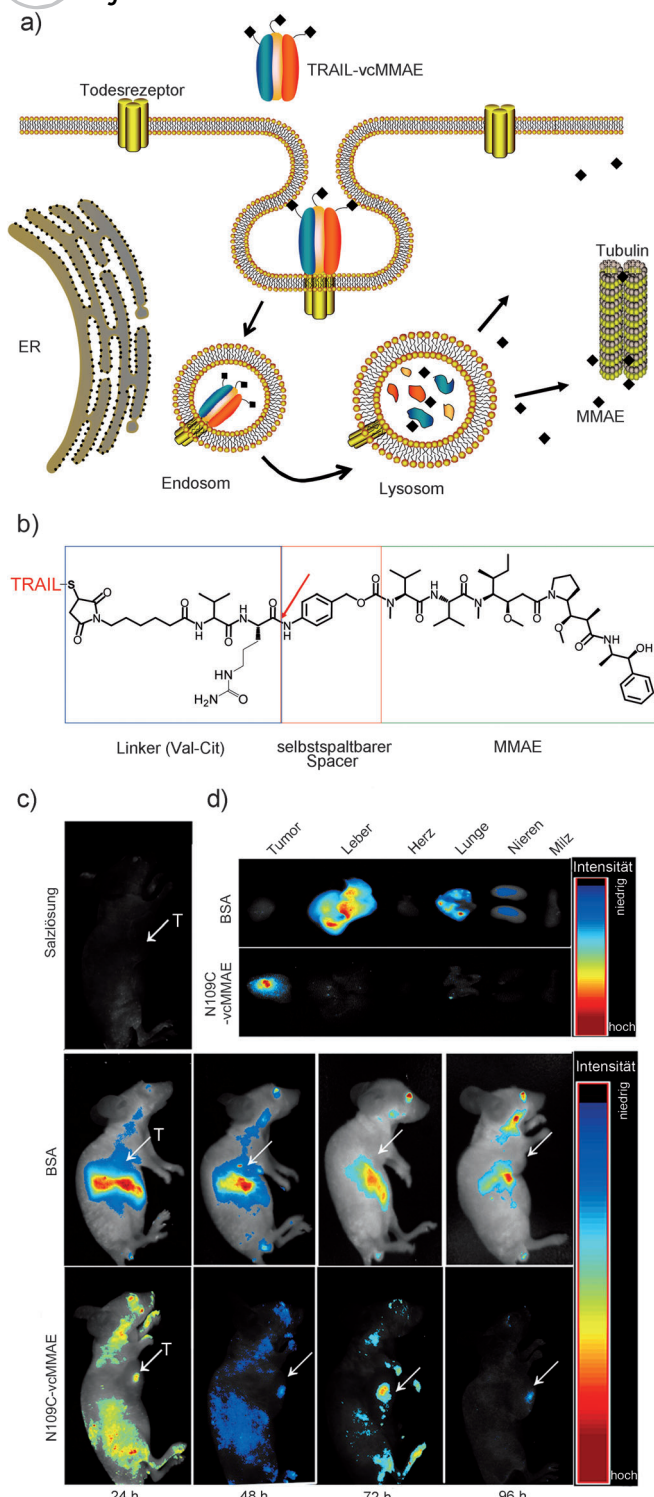


Abbildung 14. a) Transport von MMAE zum Zytoplasma mithilfe eines TRAIL-vcMMAE-Konjugats durch Targeting des Todesrezeptors auf einer Tumorzelle. b) Chemische Struktur von TRAIL-vcMMAE. Der Pfeil gibt die Cathepsin-Spaltungsstelle des Linkers an. c) Nacktmäusen mit NCI-H460-Tumor wurde Cy5-markiertes N109C-vcMMAE und Cy5-BSA über die Schwanzvene injiziert. Als Negativkontrolle wurde Kochsalzlösung verwendet. Die Mäuse wurden alle 24 h unter Verwendung eines In-vivo-Bildgebungssystems (Maestro) auf Fluoreszenz untersucht. d) Nach 96 h wurden die Mäuse geopfert, und die Organe wurden entnommen und abgebildet. Das Pseudofarbenbild zeigt die räumliche Verteilung des Cy-5-markierten N109C-vcMMAE bzw. Cy5-BSA in den Organen. Wiedergabe nach Lit. [275] mit freundlicher Genehmigung, Copyright 2013 Wiley-VCH.

bestimmt. Die anfangs entwickelte und am häufigsten verwendete Methode zur Wirkstoffbeladung basiert auf der unwillkürlichen Verkapselung von hydrophilen Wirkstoffen, die während des Herstellungsschritts im wässrigen Medium gelöst sind. In Abhängigkeit von den Eigenschaften der Wirkstoffe wurden auch andere Methoden vorgestellt. Zum Beispiel können lipophile/amphiphile Wirkstoffe vor der Liposomherstellung direkt mit den Lipiden vermischt werden, was zu einem Einschluss der Wirkstoffe in der Lipiddoppelschicht führt.^[282] Die Beladung mit diesen Wirkstoffen kann auch durch die Verwendung eines organischen Lösungsmittelaustauschmechanismus nach der Herstellung der Liposome erfolgen.^[283] Anders als hydrophile gelöste Stoffe, die nach der Verkapselung nicht ohne Weiteres durch die Doppelschicht gelangen können, werden lipophile/amphiphile Wirkstoffe jedoch nicht effizient in einem Liposom zurückgehalten, da diese Wirkstoffe ohne Weiteres durch die Lipiddoppelschicht diffundieren können. In einigen Fällen kann ein anderer pH-Wert im Inneren eines Liposoms einen neutralen Wirkstoff effizient protonieren/deprotonieren, wodurch die Doppelschichtmembran nicht länger für den Wirkstoff durchlässig ist.^[284] Unter Verwendung einer solchen Vorgehensweise wurden Wirkstoffe wie Doxorubicin erfolgreich mit hoher Beladungseffizienz in vorgebildeten Liposomen verkapselt.^[285]

Liposome können sterisch stabilisiert werden, indem die Doppelschicht mit einem amphiphilen, langkettigen Polymer verstärkt wird, das an einem Ende PEG enthält, was seinerseits die Opsonisierung verringern und die Zirkulationszeit im Plasma verlängern kann. Polymere mit geeigneten Endgruppen für eine Konjugation mit Antikörpern oder Liganden lassen sich ebenfalls in die Lipiddoppelschicht einführen, wodurch ein zielgerichteter Transport möglich wird. Trotz der offenkundigen Einfachheit bei der Funktionalisierung ist das interessanteste Merkmal der Liposome, das sie von anderen nanopartikelbasierten Wirkstofftransportsystemen unterscheidet, ihr Mechanismus des intrazellulären Transports. Da die Doppelschichten der Liposome denen der Zellen stark ähneln, können sie direkt mit der Plasmamembran verschmelzen. Wenn sie von den Zellen über Endozytose internalisiert werden, wird die Lipiddoppelschicht aufgrund der sauren Umgebung von bestimmten intrazellulären Kompartimenten (z.B. den Endosomen und Lysosomen) zerstört, oder die Doppelschicht kann mit den Membranen von intrazellulären Kompartimenten verschmelzen. Der Verschmelzungsprozess tritt womöglich nicht auf, wenn die Liposome mit bestimmten Verbindungen zur Unterbindung eines direkten Kontakts der Doppelschicht eines Liposoms und der einer Zelle funktionalisiert werden, wodurch zusätzliche Mechanismen für ein endosomales Entkommen erforderlich werden.

In einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung entwickelten Ping und Mitarbeiter eine neue Art von mehrstufigen pH-responsiven Liposomen (die als HHG2C₁₈-L bekannt sind) für den Transport von Tumortherapeutika.^[286] Die Schlüsselkomponente war 1,5-Dioctadecyl-L-glutamyl-2-histidylhexahydrobenzoesäure (HHG2C₁₈), ein zwitterionisches Oligopeptidlipid. Das synthetische Lipid HHG2C₁₈ kann mit Soja-Phosphatidylcholin (SPC) und Cholesterin vermischt

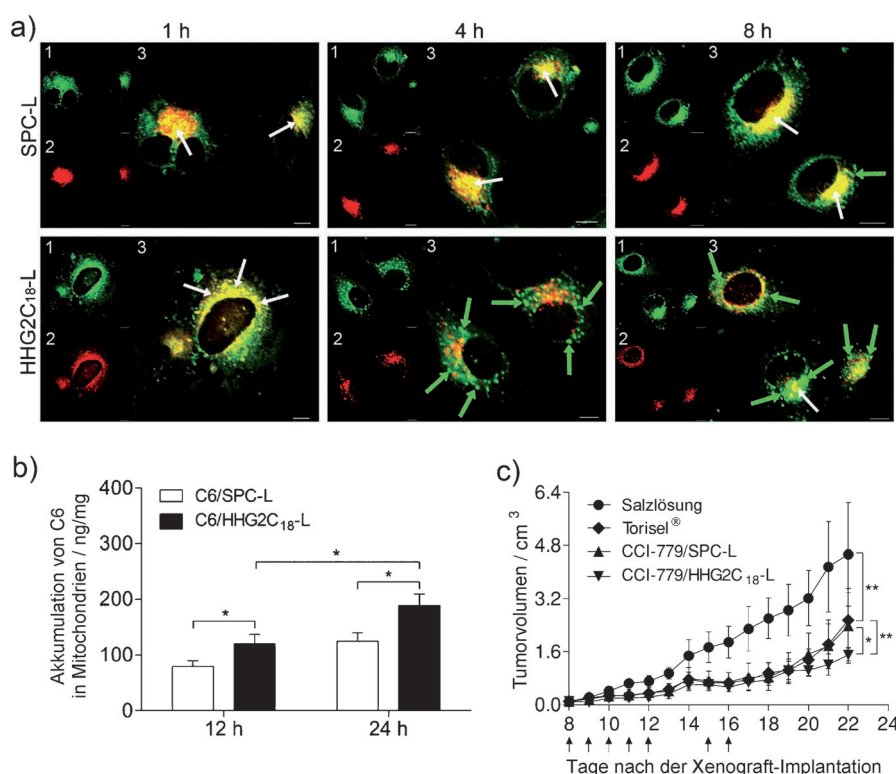


Abbildung 15. a) Intrazellulärer Transport von intelligenten, Cumarin 6 (C6, ein grüner Fluoreszenzfarbstoff) verkapselnden Liposomen (HHG2C₁₈-L) in A498-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten bei Beobachtung mit einem konfokalen Mikroskop. Die späten Endosome und Lysosome wurden mit LysoTracker Rot angefärbt. b) C6-Gehalt in Mitochondrien, die aus 12 h bzw. 24 h lang mit C6/HHG2C₁₈-L und C6/SPC-L inkubierten A498-Zellen isoliert wurden. * $P < 0.05$. c) Antitumoreffizienz gegen den Renca-Xenograft-Tumor nach intravenöser Verabreichung von verschiedenen CCI-779-Formulierungen (10 mg kg⁻¹). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Wiedergabe nach Lit. [286] mit freundlicher Genehmigung, Copyright 20123 Wiley-VCH.

werden, um „intelligente“ Liposome zu erzeugen. Bei physiologischen pH-Werten (7.2–8.0) hat HHG2C₁₈-L eine stark negative Oberflächenladung (–22.8 mV), welche die Opsonisierung verringert und die Zirkulationszeit verlängert. Beim Eindringen in den Tumor, wo der pH-Wert mit etwa 6.5 geringfügig niedriger liegt, veränderte sich das Zeta-Potential aufgrund der Gegenwart von Hexahydrobenzoesäure (HBA) deutlich auf +6.3 mV. Interessanterweise kam es zu einer zweiten Stufe der Reaktion auf den pH-Wert, wenn die Liposome nach der Endozytose in Endosome und/oder Lysosome gelangten (pH in den Endolysosomen: 5.5–4.5). Dieser Endozytoseprozess führte zu zwei Ergebnissen: 1) Die Imidazolgruppe des Histidins in HHG2C₁₈ erleichterte den Protoneneinstrom in die Endolysosomen, was zu einer noch höheren positiven Oberflächenladung (+15–25 mV) und einem endolysosomal Zerplatzen führte, und 2) HBA wurde in der Umgebung mit niedrigerem pH gespalten, wodurch eine Ladungsumkehr von positiv zu negativ beim Entkommen von HHG2C₁₈-L aus den Endolysosomen in das Zytoplasma verhindert wurde. Zudem hat HHG2C₁₈-L die Fähigkeit, Mitochondrien durch elektrostatische Wechselwirkungen anzusteuern, da es eine stark positive Oberflächenladung trägt.

Die Fähigkeit von HHG2C₁₈-L, in mehreren Stufen zu reagieren, wurde anschließend experimentell verifiziert (Abbildung 15a). Die Aufnahme-menge von HHG2C₁₈-L durch humane A498-Nierenkarzinomzellen war bei pH 6.5 signifikant höher als bei pH 7.4 (Abbildung 15b), während Kontrollliposome ohne pH-Responsivität (SPC-L) unter diesen beiden Bedingungen keinen offensichtlichen Unterschied zeigten. Nach der Endozytose durch die Zellen konnte HHG2C₁₈-L innerhalb von wenigen Stunden aus den Endolysosomen entkommen und sich allmählich in den Mitochondrien akkumulieren. Im Gegensatz dazu waren die meisten SPC-L in Endolysosomen eingeschlossen, und selbst 8 h nach der zellulären Aufnahme hatte sich nur eine geringe Menge in den Mitochondrien angesammelt. Die Autoren verkapselten dann CCI-779, einen Inhibitor der Zellproliferation, in den Hohlräumen von HHG2C₁₈-L und verwendeten diese mit Tumorthera-peutika beladenen Liposome für Untersuchungen in vitro und in vivo. Wie erwartet zeigte CCI-779/HHG2C₁₈-L bei pH 6.5 eine sehr viel höhere Effizienz bei der Abtötung von A498-Zellen als bei pH 7.4. Bei der Injektion in vivo in Ratten mit Renca-Tumoren (Nierenadenokarzinom) zeigte

CCI-779/HHG2C₁₈-L ebenfalls eine bessere Hemmung des Tumorstwachstums im Vergleich zu CCI-779/SPC-L, Torisel (der kommerziellen Formulierung von CCI-779) oder einer Kochsalzkontrolle (Abbildung 15c).

6.3. Polymernanopartikel

Polymernanopartikel sind wahrscheinlich die am umfassendsten untersuchten Trägersysteme für den Wirkstofftransport. Wir wollen hier nur synthetische Polymere, die hydrophob und biologisch abbaubar sind (z.B. PLA, PGA, PLGA und PCL), sowie deren Copolymere diskutieren.^[7b,59b,c,61b,287] Der größte Vorteil dieser synthetischen Polymere ist, dass ihre Eigenschaften, wie etwa Molekulargewicht, Hydrophobie oder biologische Abbaubarkeit, auf kontrollierbare Weise variiert werden können, um eine weitere Funktionalisierung zu ermöglichen. Die Herstellung von Nanopartikeln aus diesen Polymeren ist unkompliziert, da bereits zahlreiche Techniken vorgestellt wurden, darunter Emulgierung, Koazervation, Nanopräzipitation und Elektrospray.^[59b,c,287a,288] Diese Vielseitigkeit macht die Verkapselung von Wirkstoffen vergleichsweise einfach und hoch effektiv. Hydrophobe Wirkstoffe können zusammen mit dem Polymer

direkt im Lösungsmittel vor der Nanopartikelbildung gelöst werden.^[289] Hydrophile Wirkstoffe können mittels verschiedenster Verfahren verkapselt werden: 1) auf die gleiche Weise wie bei hydrophoben Wirkstoffen, allerdings im Lösungsmittel suspendiert; 2) mit Techniken wie der Doppel-emulsion, um hohle Nanopartikel mit im Kern eingeschlossenen hydrophilen Wirkstoffen zu erzeugen;^[290] und 3) durch Beladung der Oberflächen der Nanopartikel nach der Herstellung. Da Polymer-nanopartikel gewöhnlich dichte Matrices mit gut definierten Zersetzungsprofilen enthalten, lässt sich durch die Verwendung dieser Träger eine sehr viel bessere Kontrolle der Wirkstofffreisetzung als bei anderen Nanopartikelsystemen erreichen.^[291]

Wie in einem Bericht beschrieben, kann basierend auf einem biologisch abbaubaren Triblockcopolymer (PEG-*b*-PCL-*b*-Poly(2-aminoethyl-ethylenphosphat)), mPEG₄₅-*b*-PCL₈₀-*b*-PPEEA₁₀ eine gleichzeitige Abgabe von siRNA und Paclitaxel über Polymernanopartikel für eine synergistische Tumorsuppression erreicht werden (Abbildung 16a).^[292] Das Triblockcopolymer ist amphiphil und kann sich zu Nanopartikeln anordnen, wobei PCL den hydrophoben Kern, PPEEA die kationische Schale und PEG die hydrophile Hülle bildet. Infolgedessen kann das hydrophobe Tumortheraeutikum Paclitaxel leicht während der Bildung der Nanopartikel im Kern verkapselt werden, und negativ geladene siRNA kann mit den kationischen PPEEA-Molekülen in der Schale verknäuel werden. Die gleichzeitige Abgabe von siRNA und Paclitaxel wurde mittels konfokaler Mikroskopie durch ein hohes Maß an intrazellulärer Colokalisierung nachgewiesen (Abbildung 16b). Bei Beladung mit für Plk1 (polo-ähnliche Kinase 1) spezifischer siRNA (siPlk1), die die Überexpression des Mitose-verwandten Gens Plk1 in Tumorzellen ausschaltet, inhibierten die Nanopartikel in vitro auf eine dosisabhängige Weise effizient die Expression von Plk1-mRNA in humanen MDA-MB-435s-Melanozyten (diese Zelllinie wurde früher bis zu einer kürzlich erfolgten genetischen Verifizierung als duktales Karzinom beschrieben)^[292] (Abbildung 16c). Diese „Zwei-in-Einem“-Nanopartikel zeigten verglichen mit singulären Transportern eine verbesserte Antitumorwirkung (Abbildung 16d).

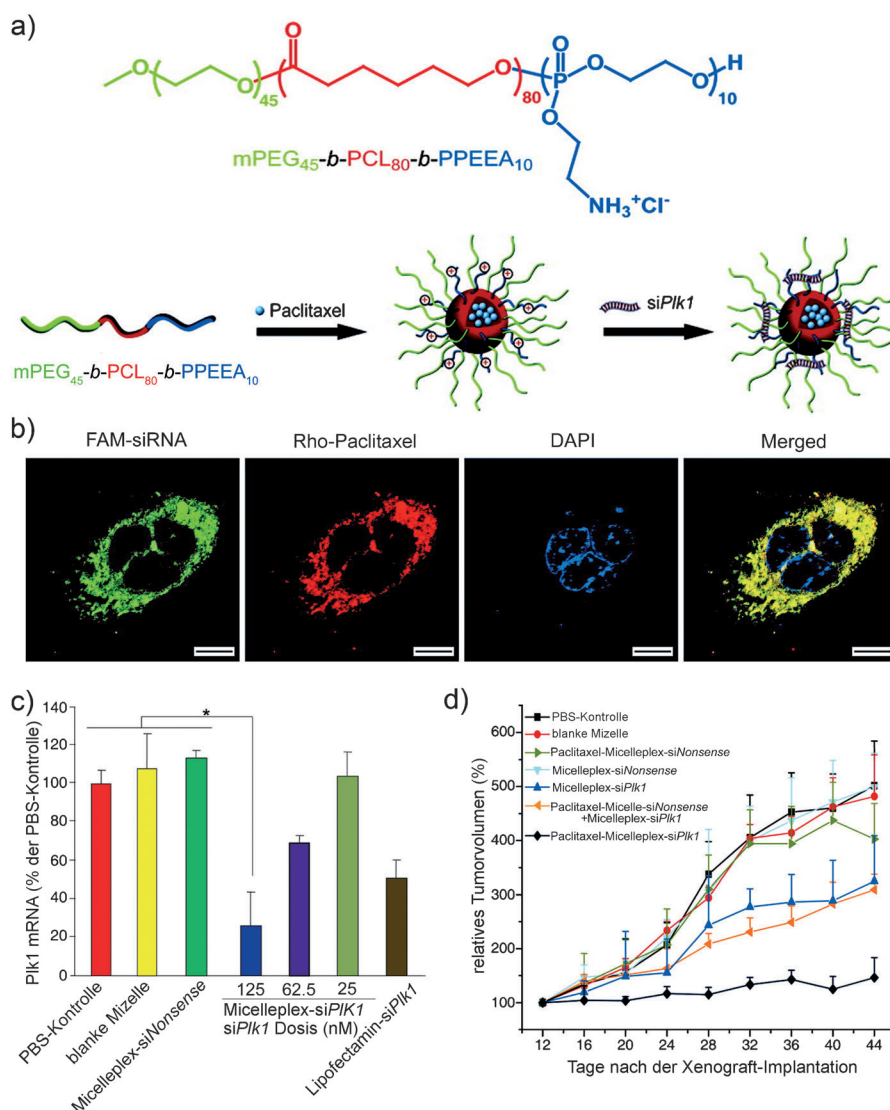


Abbildung 16. a) Chemische Struktur von mPEG₄₅-*b*-PCL₈₀-*b*-PPEEA₁₀ und schematische Darstellung der Bildung von mizellaren Nanopartikeln sowie Beladung mit Paclitaxel und siRNA. b) Konfokale Mikroskopieaufnahme der intrazellulären Verteilung von Rho-Paclitaxel-Micelleplex-FAM-siRNA in MDA-MB-435s-Zellen nach 2 h Inkubation. c) Expression von Plk1-mRNA, bestimmt mittels quantitativer Echtzeit-PCR. **P* < 0.007. d) Inhibition des MDA-MB-435s-Xenograft-Tumorzellwachstums durch Paclitaxel-Micelleplex-siPlk1 im Vergleich zu verschiedenen anderen Formulierungen. Wiedergabe nach Lit. [291] mit freundlicher Genehmigung, Copyright 2011 American Chemical Society.

Die Fähigkeit, die physikalischen Eigenschaften von Polymernanopartikeln zu steuern, bietet eine gute Möglichkeit, die Wirkung verschiedener Faktoren auf den zellulären Transport von Nanopartikeln zu testen. Allerdings ist darauf hinzuweisen, dass die meisten Nanopartikel, die unter Verwendung von Emulsionen und verwandten Techniken hergestellt wurden, auf eine Kugelform beschränkt und häufig durch eine polydisperse Größenverteilung gekennzeichnet sind. Polymernanopartikel mit gleichmäßigen, steuerbaren Größen, Formen, Aspektverhältnissen und Elastizitätseigenschaften können aber jetzt unter Verwendung einer Technik hergestellt werden, die als Partikelreplikation in nicht benetzenden Templaten (PRINT)^[293] bekannt ist, und all diese Eigenschaften zeigten einen Einfluss auf Menge, Geschwin-

digkeit und/oder Weg der zellulären Aufnahme.^[294] Darüber hinaus sind systematischere Untersuchungen vonnöten, um ein umfassendes Verständnis der auf Polymernanopartikeln basierenden Wirkstofftransportsysteme zu etablieren.

6.4. Polymer-Lipid-Hybridnanopartikel

Nachdem Liposome und Polymernanopartikel erfolgreich in separater Form verwendet wurden, wurde daraus eine neue Klasse von Hybridnanopartikeln entwickelt, die die Vorteile beider Systeme nutzt. Diese Hybridnanopartikel zeigen hohe Wirkstoffverkapselungsausbeuten, präzise kontrollierbare Freisetzungsprofile und ausgezeichnete Targeting-Fähigkeiten. So berichteten Farokhzad und Mitarbeiter über eine Plattform zur Herstellung von weniger als 100 nm großen, zielgerichteten Polymer-Lipid-Hybridnanopartikeln durch eine Kombination aus Selbstorganisation und Präzipitation.^[295] Wie in Abbildung 17a,b gezeigt, bestehen die Nanopartikel aus 1) einem biologisch abbaubaren, hydrophoben Polymerkern, der mit wasserunlöslichen, verzögert freigesetzten Wirkstoffen beladen werden kann, 2) einer hydrophilen Tarnbeschichtung auf der Oberfläche, um die Halbwertszeit im Blutkreislauf zu verbessern, und 3) einer Lipidmonolage an der Grenze zwischen Kern und Schale, um das Entkommen der Wirkstoffe aus dem Polymerkern sowie den Einstrom von Wasser zu verzögern, wodurch der Gesamt-

freisetzungszeitraum verlängert wird. Genauer gesagt wurden PLGA und der Antitumorstoff Dtxl in Acetonitril gelöst, und eine zweite Lösung enthielt Lecithin und 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-*N*-carboxy(PEG)2000 (DSPE-PEG) in wässrigem Ethanol. Durch eine tropfenweise Zugabe der PLGA/Dtxl-Lösung in die vorgeheizte Lipidlösung unter sanftem Rühren fiel PLGA als Dtxl enthaltende Nanopartikel aus, und die Lipide lagerten sich über Selbstorganisation auf den Nanopartikeln ab. Die Größe und Oberflächenladung der Nanopartikel konnten über das Verhältnis von Lipid zu Polymer sowie durch die Viskosität der PLGA-Lösung gesteuert werden (Abbildung 17c). Die PLGA-Lipid-PEG-Nanopartikel zeigten ein besseres verzögertes Freisetzungsprofil als PLGA-PEG- oder PLGA-Nanopartikel allein (Abbildung 17d), was auf eine hohe Wirksamkeit der Lipidmonolage bei der Verringerung des Diffusionsvermögens des Wirkstoffs hindeutet. Die Hybridnanopartikel zeigten auch eine signifikant verbesserte Targeting-Effizienz gegenüber Prostatakrebszellen, die das prostata-spezifische Membranantigen (PSMA) überexprimierten, nachdem die Oberfläche der Nanopartikel mit einem A10-RNA-Aptamer funktionalisiert wurde. Im gegenwärtigen Entwicklungsstadium ist es nach wie vor schwierig, große, hydrophile Proteinwirkstoffe mit den auf Hybridnanopartikeln basierten Systemen zu verkapseln.

6.5. Dendrimere

Dendrimere sind baumähnliche, sphärische Makromoleküle mit Verzweigungen, die von einem zentralen Kern ausgehen.^[296] Dendrimere werden schalenweise synthetisiert, wobei man entweder von Starterkernen ausgeht (der am häufigsten verwendete Divergenzansatz), oder aber von der Peripherie (der weniger häufig verwendete Konvergenzansatz). Beide Vorgehensweisen führen zu einer geringen Polydispersität und ermöglichen eine gute Kontrolle über Größe und Grad der Verzweigung.^[296b,297] Das letztere Merkmal, die Kontrolle des Verzweigungsgrads, unterscheidet Dendri-

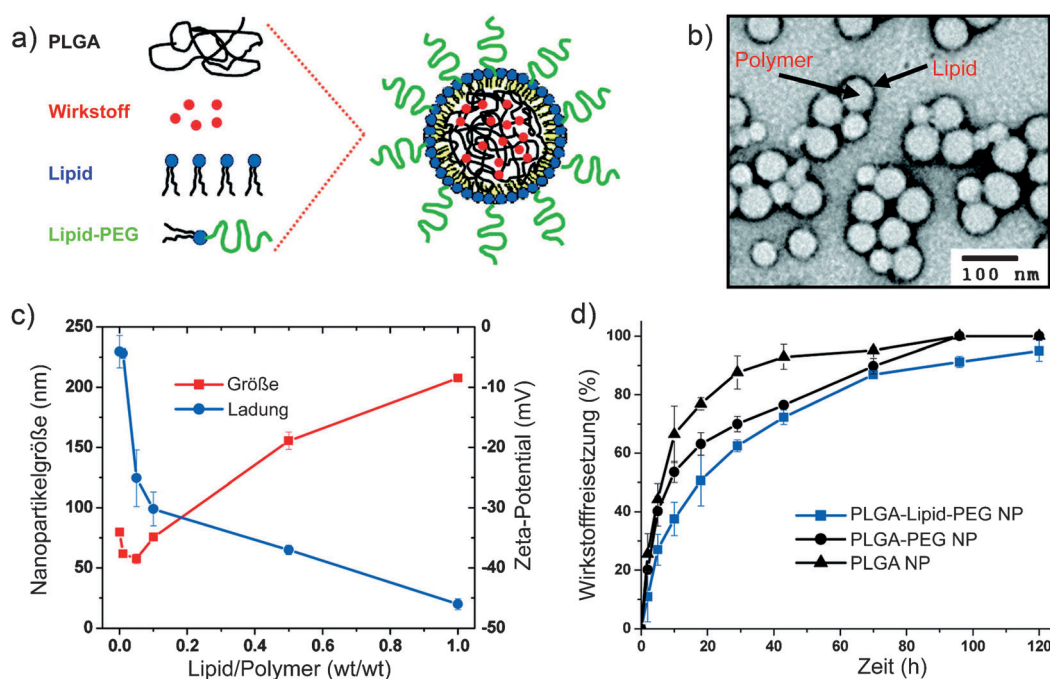


Abbildung 17. a) Bildung von Polymer-Lipid-Hybridnanopartikeln. Die Nanopartikel bestehen aus einem hydrophoben Poly(milchsäure-co-glycolsäure) (PLGA)-Kern, einer hydrophilen Polyethylenglykol(PEG)-Schale und einer Lipid-Monolage (Lecithin) an der Grenzfläche von hydrophobem Kern und hydrophiler Schale. b) Transmissionselektronenmikroskopie(TEM)-Aufnahme der Hybridnanopartikel. c) Wirkstoffverkapselungsausbeute von PLGA-Lipid-PEG-Hybrid-Nanopartikeln verglichen mit PLGA-PEG- und PLGA-Nanopartikeln. d) Wirkstofffreisetzungsprofile der PLGA-Lipid-PEG-, PLGA-PEG- bzw. PLGA-Nanopartikel. Wiedergabe nach Lit. [295] mit freundlicher Genehmigung, Copyright 2008 American Chemical Society.

mere von anderen Polymeren, die unregelmäßige, nicht kontrollierbare Polymernetzwerke aufweisen. Aufgrund der einzigartigen schrittweisen Synthesemethode ist die Wahl des Zentralkerns und der Wiederholungseinheiten von immenser Bedeutung, da sie Molekulargewicht, Größe, Zweigdichte, Flexibilität, Wasserlöslichkeit und Vielseitigkeit der finalen Funktionalisierung der Dendrimere bestimmt.^[298] Dendrimere wurden erstmals in den 1980er Jahren vorgestellt,^[299] zeigen jedoch erst seit kurzem ein gewisses Potenzial im Bereich des Wirkstofftransports.^[296b,c] Wirt-Gast-Wechselwirkungen (z. B. Wirkstoffbeladung) können entweder im Inneren oder an der Peripherie der Dendrimere stattfinden, was zu unterschiedlichen Freisetzungsprofilen führt.

In einem Beispiel nutzten Minko und Mitarbeiter ein Poly(propylenimintetrahexacontaamin)-Dendrimer 5. Generation (PPIG5) als Startmaterial zur Kondensation mit siRNA gegen B-Zell-Lymphom-mRNA (BCL, antiapoptotisch).^[300] Die PPIG5-siRNA-Komplexe wurden zur sterischen Stabilisierung mit PEG und dann mit einem synthetischen Analogon von LHRH (luteinizing hormone-releasing hormon) als Targeting-Motiv beschichtet. Die PEG-Ketten waren über Dimethyl-3-3'-dithiobispropionimidat-HCl (DTBP), einem redoxresponsiven Disulfidlinker, mit der Oberfläche der Dendrimere verknüpft, um die intrazelluläre Freisetzung von siRNA zu erleichtern, sobald die PEG-Ketten in Gegenwart von Reduktionsmitteln wie Glutathion gespalten wurden (Abbildung 18a). Wie in Abbildung 18b dargestellt, zeigte die zielgerichtete LHRH-PEG-DTBP-PPIG5-siRNA eine erhebliche zelluläre Aufnahme in LHRH-positive, humane A2780-Eierstockkarzinomzellen, nicht aber in LHRH-negative SKOV-3-Zellen. Nicht zielgerichtete Nanopartikel zeigten in keiner der beiden Zellarten eine signifikante intrazelluläre Akkumulation. Ein ähnlicher Trend wurde bei der Ausschaltungseffizienz gegenüber BCL-mRNA beobachtet (Abbildung 18c,d). In-vivo-Untersuchungen zeigten des Weiteren, dass LHRH-PEG-DTBP-PPIG5-siRNA im Vergleich zu nicht zielgerichteten Nanopartikeln eine höhere Tumortargeting-Effizienz

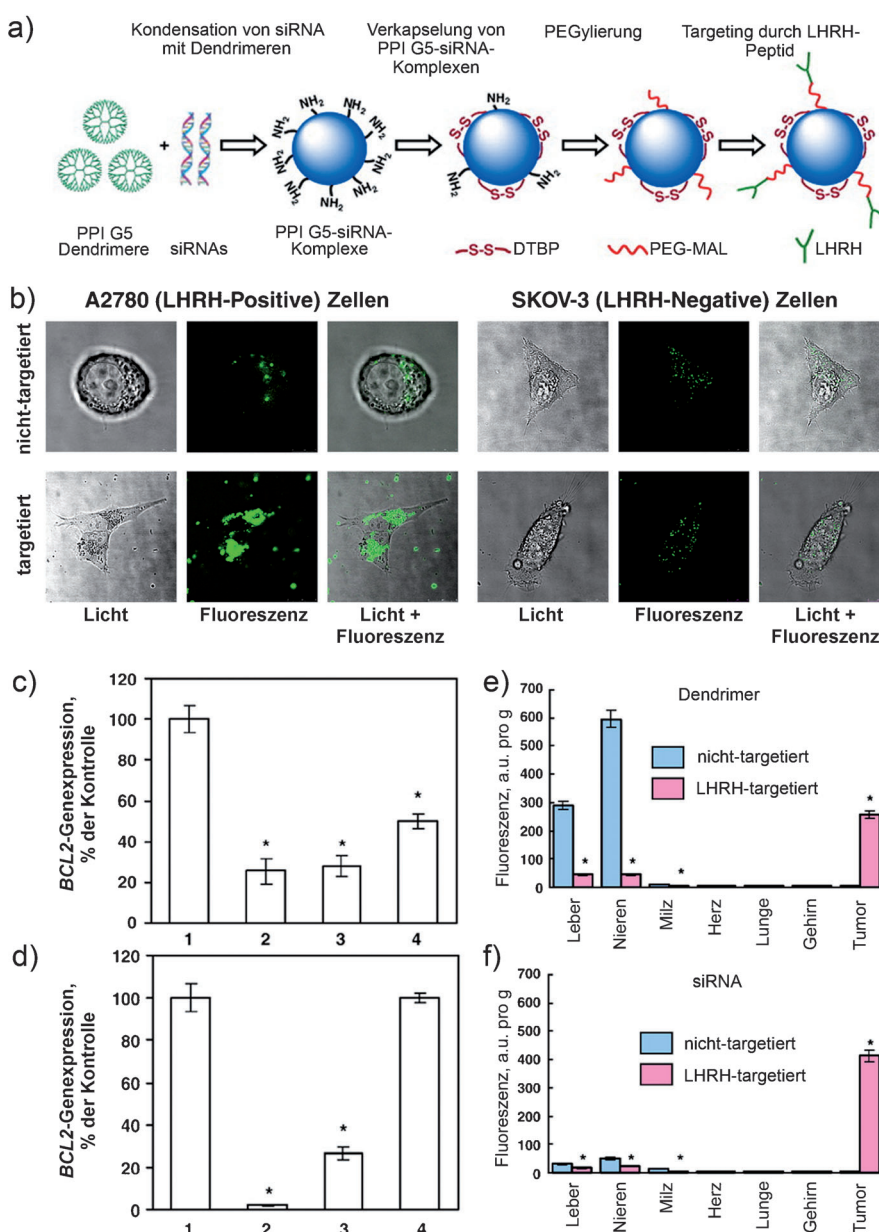


Abbildung 18. a) Herstellung von stabilen, auf Tumore zielenden Nanopartikeln zum siRNA-Transport. b) Konfokale Mikroskopie von LHRH-Rezeptor-positiven A2780 und humanen LHRH-Rezeptor-negativen SKOV-3-Eierstockkrebszellen, die mit fluoreszenzmarkierten, nicht zielgerichteten PEG-DTBP-PPI-G5-siRNA-6-FAM-Grünpartikeln und zielgerichteten LHRH-PEG-DTBP-PPI-G5-siRNA-6-FAM-Grünpartikeln inkubiert wurden. c,d) Suppression von BCL2-mRNA durch verschiedene, auf BCL2 zielende, siRNA enthaltende Nanopartikel. c) 1. Kontrolle (frisches Medium), 2. PPI G5-siRNA-Nanopartikel, 3. PEG-DTBP-PPI-G5-siRNA-Nanopartikel und 4. PEG-DTBP-siRNA-PPI-G5-Nanopartikel, die mit LHRH-positiven A549-Krebszellen inkubiert wurden. d) 1. Kontrolle (frisches Medium), A549-Krebszellen; 2.–4. Nanopartikel mit zielgerichteter siRNA, die mit LHRH-positiven A2780- (2) und A549-Krebszellen (3) sowie LHRH-negativen SKOV-3-Krebszellen (4) inkubiert wurden. * $P < 0.05$. e,f) Mittlere Konzentration pro Gramm Organengewicht von markierten Dendrimeren (e) oder siRNA (f). * $P < 0.05$. Wiedergabe nach Lit. [300] mit freundlicher Genehmigung, Copyright 2009 Elsevier.

(sowohl für Dendrimere als auch siRNA) sowie eine geringere Clearance durch Leber und Nieren (bei siRNA) aufwies (Abbildung 18e,f).

6.6. Hydrogele

Hydrogele sind dreidimensionale, vernetzte Gerüste aus hydrophilen (wasserlöslichen) Polymeren, die Wasser oder physiologische Flüssigkeiten in großen Mengen zurückhalten können.^[301] Typische Beispiele von natürlich vorkommenden Polymeren, die für Hydrogele verwendet werden, sind Chitosan, Hyaluronsäure, Dextran, Alginat, Kollagen und Gelatine; synthetische Polymere sind Poly(2-hydroxyethylmethacrylat) (HEMA), Poly(2-hydroxypropylmethacrylat) (PHPMA), PAAm, Poly(vinylalkohol) (PVA) und Poly(ethylenoxid) (PEO).^[301b,c,302] Diese wasserlöslichen Polymere werden durch eine physikalisch oder chemisch induzierte Vernetzung wasserunlöslich gemacht. Während Chitosan z. B. in sauren Lösungen löslich ist, wird es bei neutralem pH unlöslich;^[303] Alginat kann in Gegenwart von zweiwertigen Kationen wie Ca^{2+} und Ba^{2+} physikalisch vernetzt werden,^[304] die meisten natürlichen Biopolymere können über Carbodiimidreaktionen vernetzt werden.^[305] Verglichen mit anderen Formulierungen bieten Hydrogele mehrere einzigartige Vorteile. Der hohe Wassergehalt in Hydrogelen macht sie biologischen Geweben ähnlich, was die Grenzflächenspannung mit biologischen Flüssigkeiten verringert und die Biokompatibilität begünstigt.^[301b,c] Die Porosität eines Hydrogels kann über die Vernetzungsdichte eingestellt werden, was starke Auswirkungen auf die Wirkstoffbeladung und die Freisetzungsgeschwindigkeiten hat. Obwohl die meisten synthetischen Hydrogele in ihren ursprünglichen Zusammensetzungen nicht biologisch abbaubar sind, können enzymatische, hydrolytische und stimuli-responsive Einheiten in die Gerüste eingebaut werden, wodurch sie unter den passenden Bedingungen abbaubar werden.^[306] Hydrogele lassen sich als Nanopartikel herstellen und werden dann Nanogele genannt.^[307]

Wang und Mitarbeiter haben ladungskonvertierende Nanogele entwickelt, die durch die Säure im Tumor für Wirkstofftransportanwendungen aktiviert werden konnten.^[308] Sie stellten zunächst das Stammnanogel her, das auf Poly(2-aminomethylmethacrylat-hydrochlorid) (PAMA) mit PEG-Diacrylat (PEGDA) als Vernetzer basierte. Das Nanogel zeigte eine gleichmäßige Größe von 100 nm in Wasser und ein positives Zeta-Potential von +30 mV. Die positiven Ladungen auf der Oberfläche der Nanogele waren für die Zellaufnahme günstig, da sie stark mit den negativ geladenen Zellmembranen wechselwirkten. Allerdings induzieren solche Ladungen auch starke Wechselwirkungen mit Serumproteinen, was zu einer Aggregation und raschen Clearance aus dem Blutkreislauf führte. Um dieses Problem zu lösen, entwickelten die Autoren ein ähnliches Verfahren wie in dem Beispiel, das wir bei den Liposomen vorgestellt haben: Sie addierten eine Schicht aus 2,3-

Dimethylmaleinsäureanhydrid (DMMA) auf die Oberfläche der Nanogele, was das Zeta-Potential der Gele auf -17 mV veränderte. Nach Inkubation in einer sauren Umgebung (pH 6.8) wurden die DMMA-Gruppen allmählich gespalten, um die Oberflächenladung der PAMA-Nanogele von negativ zu positiv zu verwandeln (Abbildung 19a). Wurden die

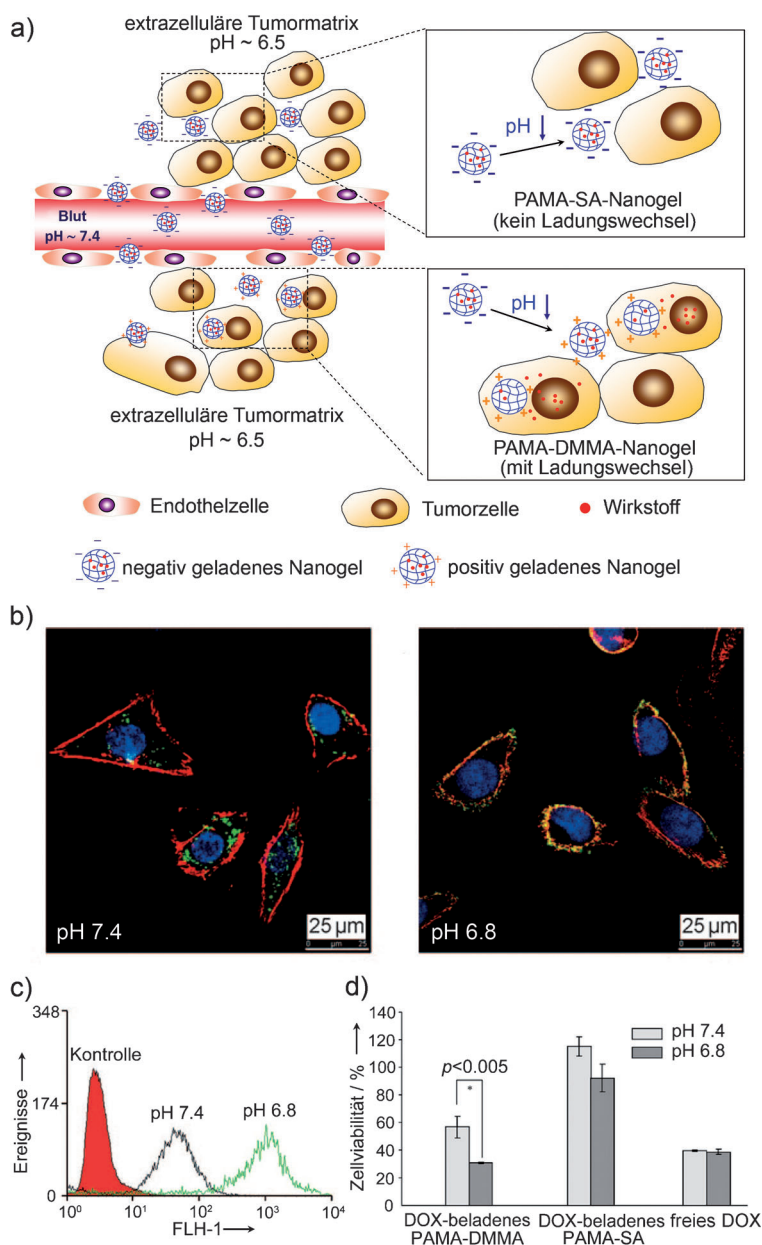


Abbildung 19. a) Vergleich der Wirkstofffreisetzung aus pH-responsiven PAMA-DMMA-Nanogelen und PAMA-SA-Nanogelen, die nicht auf pH-Veränderungen reagieren. b) Konfokale Mikroskopieaufnahmen von MDA-MB-435s-Zellen nach 2 h Inkubation mit PAMA-DMMA-Nanogelen bei pH 6.8 (links) und pH 7.4 (rechts). PAMA-DMMA wurde mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC; grün) markiert; F-Actin und Zellkerne wurden mit Rhodaminphalloidin (rot) bzw. 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI; blau) angefärbt. c) Vergleich der zellulären Aufnahme von FITC-markiertem PAMA-DMMA bei pH 7.4 und 6.8 mittels Durchflusszytometrie. d) Zellüberleben von MDA-MB-435s-Zellen nach Inkubation mit Doxorubicin (DOX)-beladenem PAMA-DMMA, DOX-beladenem PAMA-SA und freiem DOX bei gleicher DOX-Konzentration von 16 mg mL⁻¹. * $P < 0.005$. Wiedergabe nach Lit. [308a] mit freundlicher Genehmigung, Copyright 2010 Wiley-VCH.

PAMA-Nanogele mit Bernsteinsäureanhydrid (SA) beschichtet, erfolgte keine nachhaltige Ladungswandlung und das Zeta-Potential blieb negativ. Die ladungswandelnden PSMA-DMMA-Nanogele führten in vitro bei pH 6.8 zu einer stärkeren Akkumulation in Tumorzellen (MDA-MB-435s) als bei pH 7.4 (Abbildung 19b,c). Bei Beladung mit Doxorubicin verursachten PAMA-DMMA-Nanogele verglichen mit den PAMA-SA-Nanogelen in vitro zudem eine höhere Mortalität bei MDA-MB-435s-Zellen auf eine pH-abhängige Weise (Abbildung 19d).

6.7. Phasenwechselmaterialien

Stimuliresponsive Materialien bieten eine vielversprechende Strategie zur Realisierung einer bedarfsgerechten Freisetzung von Wirkstoffen oder bioaktiven Molekülen. Von den verschiedenen Arten von Stimuli wurden Temperaturveränderungen am häufigsten zum Auslösen der Wirkstofffreisetzung genutzt, da die lokale Körpertemperatur je nach Umgebungsbedingungen und manchmal auch als Reaktion auf eine Erkrankung variieren kann.^[309] Eines der am bekanntesten Systeme basiert auf Poly(*N*-isopropylacrylamid) (pNIPAAm) und seinen Derivaten.^[310] Nanopartikel (oder Gele), die vernetzte PNIPAAm-Ketten enthalten, können bei einer Temperaturerhöhung schrumpfen, wodurch die verkapselten Wirkstoffe gezwungen werden, in das umgebende Medium überzugehen. Im Zusammenhang mit einem pNIPAAm-basierten Transportsystem gibt es zwei wesentliche Nachteile: eine merkliche Zytotoxizität^[310] und das Verbleiben in einem „On“-Zustand aufgrund ihrer Unfähigkeit, die Wirkstoffdiffusion vollständig zu hemmen.

Um die Temperaturveränderung besser als Reiz zum Auslösen einer Wirkstofffreisetzung zu nutzen, führten Xia und Mitarbeiter Phasenwechselmaterialien (PCM) ein, die als Reaktion auf Temperaturveränderungen reversibel Fest/flüssig-Phasenübergänge durchlaufen können.^[311] Im festen Zustand verhindern PCM effizient jegliches Austreten von verkapselten Wirkstoffen bei Temperaturen unterhalb ihres Schmelzpunkts. Bei Erhitzen über ihren Schmelzpunkt hinaus zeigen sie jedoch einen raschen Phasenwechsel in den flüssigen Zustand, und die Beladung wird freigesetzt. Besonders gut geeignet für Wirkstofftransportanwendungen in vivo sind auf Fettalkoholen und Fettsäuren basierende PCM, da dies ausgezeichnet biokompatibel sind. Wichtige Beispiele sind 1-Tetradecanol (Schmelzpunkt 38–39°C), Tridecansäure (41–42°C) und Dodecansäure (43–46°C). Praktisch können die Schmelzpunkte von PCM präzise im Bereich von 38–46°C eingestellt werden, indem binäre oder ternäre Mischungen dieser Verbindungen in passenden Verhältnissen verwendet werden.

Wie in Abbildung 20a dargestellt, wurde ein Modellwirkstoff, nämlich Fluoresceinisothiocyanat(FITC)-Dextran, in Gelatine-Mikroperlen geladen, die dann in einem 1-Tetradecanol-Block (oder Perlen) verkapselt wurden. Der Block wurde dann auf dem Boden eines Behälters befestigt und in phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) getaucht. Bei Erhöhung der Temperatur begann der Block zu schmelzen und setzte die Gelatine-Perlen nach 60 s frei. Das PCM

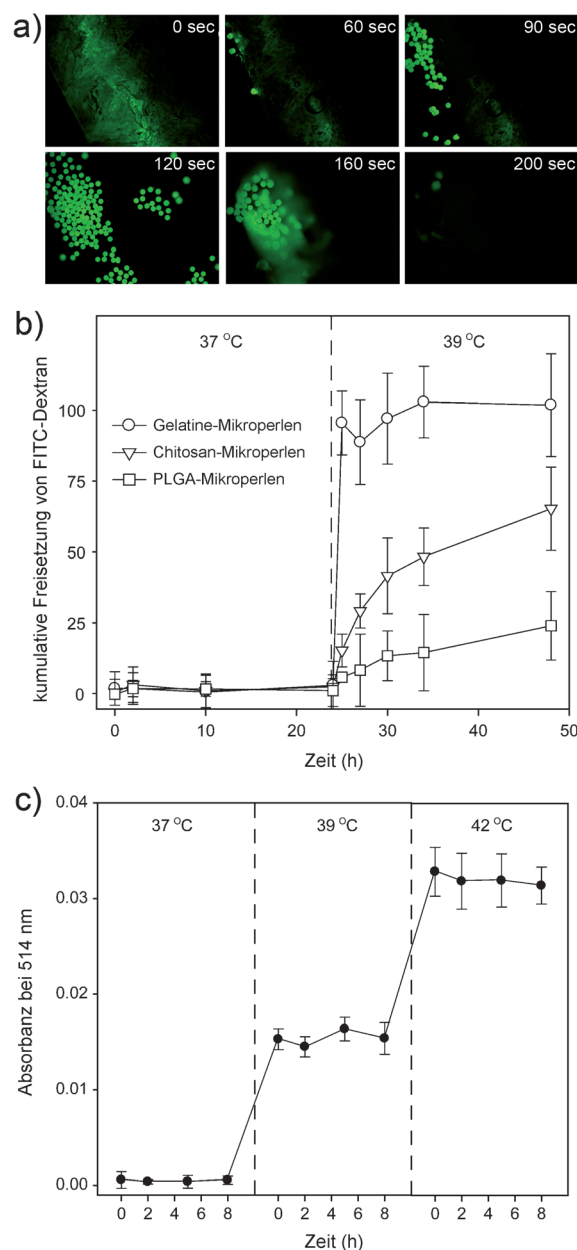


Abbildung 20. a) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Freisetzung von FITC-Dextran aus Gelatine-Mikroperlen in einem 1-Tetradecanol-Block. Die Temperatur wurde langsam durch Zugabe von warmem Wasser (60°C) unter sanftem Rühren erhöht. b) Freisetzungsprofile bei 37 und 39°C von FITC-Dextran aus Gelatine-, Chitosan- und PLGA-Mikroperlen, die in 1-Tetradecanol-Blöcken verkapselt sind. c) Freisetzungsprofil von FITC-Dextran bei 37, 39 und 42°C aus Gelatine-Mikroperlen, die jeweils in Blöcken aus 1-Tetradecanol bzw. Dodecansäure verkapselt sind. Wiedergabe nach Lit. [309a] mit freundlicher Genehmigung, Copyright 2010 Wiley-VCH.

verschwand nach 120 s vollständig und setzte dabei die gesamten Gelatine-Mikroperlen frei. Darauf folgte die Freisetzung von FITC-Dextran, da kontinuierliches Erhitzen zu einer beschleunigten Auflösung der Gelatine-Mikroperlen führte. Die Geschwindigkeit der FITC-Dextran-Freisetzung konnte durch eine sorgfältige Auswahl der für das PCM und die Mikroperlen verwendeten Materialien moduliert werden. Wie in Abbildung 20b dargestellt, konnten Gelatine-Mikro-

perlen verwendet werden, um aufgrund des Ansprechens auf Temperaturveränderungen und der hydrophilen Natur von Gelatine eine höhere Geschwindigkeit der Wirkstofffreisetzung zu erreichen. Im Gegensatz dazu zeigte die Freisetzung von in Chitosan-Mikropellets verkapseltem FITC-Dextran ein stärker verzögertes Profil, da Chitosan in einem wässrigen Medium bei neutralem pH unlöslich ist. Bei der Verwendung von PLGA-Mikropellets wurde die Freisetzungsgeschwindigkeit weiter verringert, und zwar aufgrund der starken Hydrophobie des Polymers. Zudem wurde gezeigt, dass auch eine duale, temperaturgesteuerte Wirkstofffreisetzung erreicht werden kann, indem zusätzlich ein Block aus Dodecansäure eingebaut wurde, das einen höheren Schmelzpunkt aufweist als 1-Tetradecanol. Die Freisetzung von FITC-Dextran aus Gelatine-Mikropellets innerhalb dieses Diblocks zeigte ein Stufenprofil, das von der spezifischen Temperatur abhing, der der Block ausgesetzt wurde (Abbildung 20c). Es sollte darauf hingewiesen werden, dass Phasenwechselmaterialien potenziell auch in nanoskaliger Größe hergestellt werden können, auch wenn in den Beispielen hier mikrometergroße Materialien genutzt wurden.^[311]

6.8. Anorganische Nanopartikel

Anorganische Nanopartikel stellen eine bedeutende Kategorie von Wirkstofftransportsystemen dar, da sie in verschiedensten Arten vorkommen, Größe und Form präzise gesteuert werden können und die physikochemischen Eigenschaften und Multifunktionalität exzellent sind. Allerdings ist ihr Anwendungsbereich insofern eingeschränkt, als dass sie nicht abgebaut werden können. Die häufigsten anorganischen Nanopartikel sind MSN, kohlenstoffbasierte Nanostrukturen (Fulleren, Kohlenstoffnanoröhren (CNTs) und Graphen), Edelmetall-Nanostrukturen (typischerweise Au), poröses Silicium und Hydroxyapatit. Hier konzentrieren wir uns nur auf die ersten drei Materialarten.

MSN wurden in den frühen 1990er Jahren entwickelt^[312] und sind seither das erfolgreichste anorganische System für den Wirkstofftransport. MSN sind Siliciumdioxid-Nanopartikel mit Größen im Bereich von 50–300 nm, die Hunderte von leeren Kanälen (d.h. Mesoporen) in einer honigwabenhähnlichen Anordnung enthalten. Diese Nanopartikel zeichnen sich durch eine große Oberfläche und große Porenvolumina sowie eine stabile Mesostruktur, einstellbare Porendurchmesser (etwa 2–10 nm) und einfach funktionalisierbare Oberflächen und Kanäle aus. Außerdem zeigen MSN eine gute biologische Verträglichkeit und nur geringe Immunogenität.^[313] MSN wurden erfolgreich in Anwendungen zum Transport verschiedener Therapeutika wie etwa Wirkstoffe, Diagnosesonden, Enzyme und Oligonucleotide verwendet.^[313a,b]

CNTs wurden zum Transport verschiedener Arten von Therapeutika wie etwa Wirkstoffen,^[314] Peptiden/Proteinen,^[315] plasmidischer DNA^[315b,316] und RNA über Endozytose an Zielzellen genutzt.^[317] Die außerordentlich großen spezifischen Oberflächen der CNTs ermöglichen eine effiziente Wirkstoffbeladung. Zudem besitzen CNTs ausgezeichnete optische Eigenschaften.^[318] Die Absorption von NIR-

Strahlung durch CNTs kann zur photothermischen Zerstörung von Tumorzellen genutzt werden,^[319] während die NIR-Photolumineszenz eine direkte Bildgebung der Zielzellen und Gewebe ermöglicht.^[320] Darüber hinaus zeigen CNTs charakteristische, resonanzverstärkte Raman-Signaturen, die für einen Raman-Nachweis mit großen Streuquerschnitten einzigartig sind.^[321] Zum Beispiel konjugierten Dai und Mitarbeiter Paclitaxel an PEG-Ketten, die auf einwandigen CNTs (SWCNTs) verankert waren (Abbildung 21a).^[314b] Bei einem Test in vivo an Mäusen mit 4T1-Brustkrebstumoren

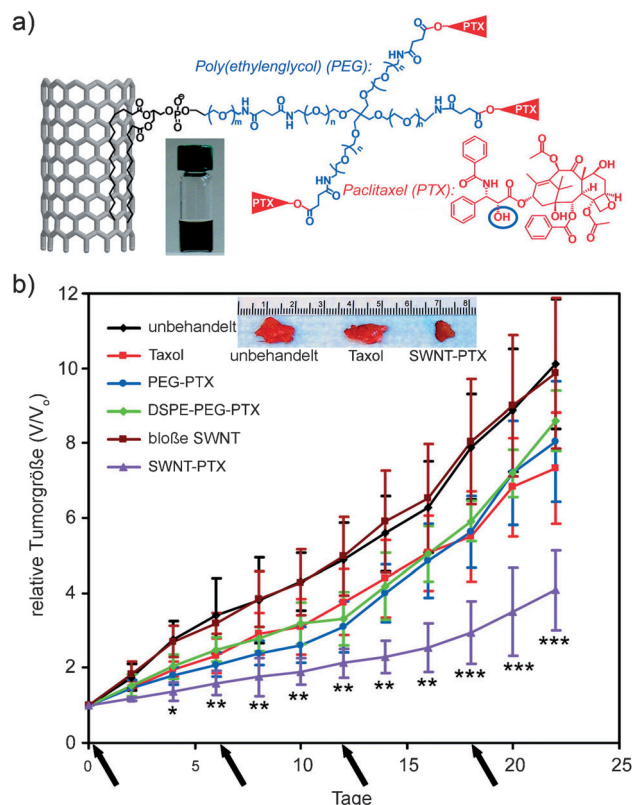


Abbildung 21. a) Konjugation von Paclitaxel (PTX) an einwandige Kohlenstoffnanoröhren (SWCNTs), die durch Phospholipide mit verzweigten PEG-Ketten funktionalisiert sind. b) Die Verabreichung der Nanoröhren-PTX-Konjugate unterdrückte nachweislich das Tumorgewachstum in einem 4T1-Brustkrebs-Mausmodell. Wiedergabe nach Lit. [314b] mit freundlicher Genehmigung, Copyright 2008 American Association for Cancer Research.

(Abbildung 21b) zeigten die SWCNT-Paclitaxel-Konjugate im Vergleich zu freiem Paclitaxel eine verlängerte Zirkulation im Blutkreislauf, eine 10-fach höhere Wirkstoffaufnahme durch den Tumor und eine effizientere Unterdrückung des Tumorgewachstums.

Goldnanostrukturen sind ein vergleichsweise neues System zum Wirkstofftransport. Ganz ähnlich wie CNTs besitzen auch Au-Nanostrukturen ausgeprägte photothermische Eigenschaften für eine direkte Krebstherapie ohne Beteiligung eines Antitumormittels. Dazu kommen noch verschiedene optische Eigenschaften (z.B. Fluoreszenz bei Au-Clustern,^[322] Multiphotonenlumineszenz bei Au-Nanostäbchen und Nanokäfigen^[323] sowie eine starke optische Absorption

bei allen Spezies) für die Diagnostik. Während an die Oberfläche von festen Au-Nanostrukturen (z.B. Nanokugeln und Nanostäbchen) Wirkstoffe konjugiert werden können, ermöglichen Au-Strukturen mit hohlen Innenräumen (z.B. Nanoschalen^[324] und Nanokäfige)^[217] eine sehr viel effizientere Verkapselung von Wirkstoffen innerhalb dieser Hohlräume.

Goldnanokäfige stellen eine neue Klasse von Au-Nanostrukturen mit dünnen, porösen Wänden und hohlem Innenraum dar (Abbildung 22a) und können ohne Weiteres unter Verwendung einer galvanischen Austauschreaktion zwischen Ag-Templaten und Au³⁺ in einer wässrigen Lösung hergestellt werden. Die Kantenlänge und Wanddicke von Au-Nanokäfigen kann separat angepasst werden, um eine ganze Palette von optischen Eigenschaften, darunter Multiphotonenlumineszenz und optische Streuung/Absorption, auf ge-

wünschte Wellenlängen einzustellen. Dank dieser Eigenschaften wurden Au-Nanokäfige aktiv als Kontrastmittel für verschiedene Methoden der Bildgebung wie der optischen Kohärenztomographie,^[325] Multiphotonenmikroskopie,^[323b,c,326] photoakustischen Tomographie^[326,327] und oberflächenverstärkten Raman-Streuung untersucht.^[328] Hier konzentrieren wir uns nur auf die Anwendungen von Au-Nanokäfigen für den Wirkstofftransport und in der Krebstherapie. Abbildung 22b zeigt, wie ein Wirkstoff innerhalb der Hohlräume von Au-Nanokäfigen verkapselt werden kann.^[121c] Um die Freisetzung des Wirkstoffs zu steuern, wurde eine dünne Schicht eines thermoresponsiven Polymers auf PNIPAAm-Basis durch Au-S-Bindungen auf die Oberfläche der Nanokäfige aufgebracht.^[121c] Die anfängliche Wirkstoffbeladung wurde über Diffusion bei erhöhter Temperatur erreicht, bei der die Polymerketten schrumpften, um

die Poren in den Wänden der Nanokäfige freizugeben. Beim Abkühlen auf physiologische Temperatur relaxierten die Polymerketten in ihre ausgedehnte Konformation und versiegelten die Poren auf effiziente Weise, wodurch die Wirkstoffmoleküle an einem Entkommen in das Medium gehindert wurden. War eine Wirkstofffreisetzung gewünscht, wurde ein Laser auf die Nanokäfige gerichtet, um die Polymerbeschichtung zu erwärmen und deren starke Reaktion auf den photothermischen Reiz auszunutzen. Infolgedessen wurden die Poren in den Wänden der Nanokäfige geöffnet, was eine schnellere Diffusion der verkapselten Wirkstoffe ermöglichte (Abbildung 22c). Es ist zu betonen, dass die Au-Nanokäfige selbst direkt für die Krebstherapie ohne Verkapselung irgendeines Wirkstoffs genutzt werden können. Die Abbildungen 22d–f zeigen die photothermische Behandlungswirkung von PEGylierten Au-Nanokäfigen bei Mäusen mit U87MGwtEGFR-Tumoren.^[329] Nach 24 h Bestrahlung mit einem Diodenlaser bei einer Leistung von 0.7 W cm⁻² (10 min) war die metabolische Aktivität des behandelten Tumors im Vergleich zu einer Kochsalzkontrolle signifikant gesunken (gemessen mittels ¹⁸FDG/PET-Bildgebung).

7. Zusammenfassung und Ausblick

Die Verwendung von Nanopartikeln als Wirkstoffträger verspricht

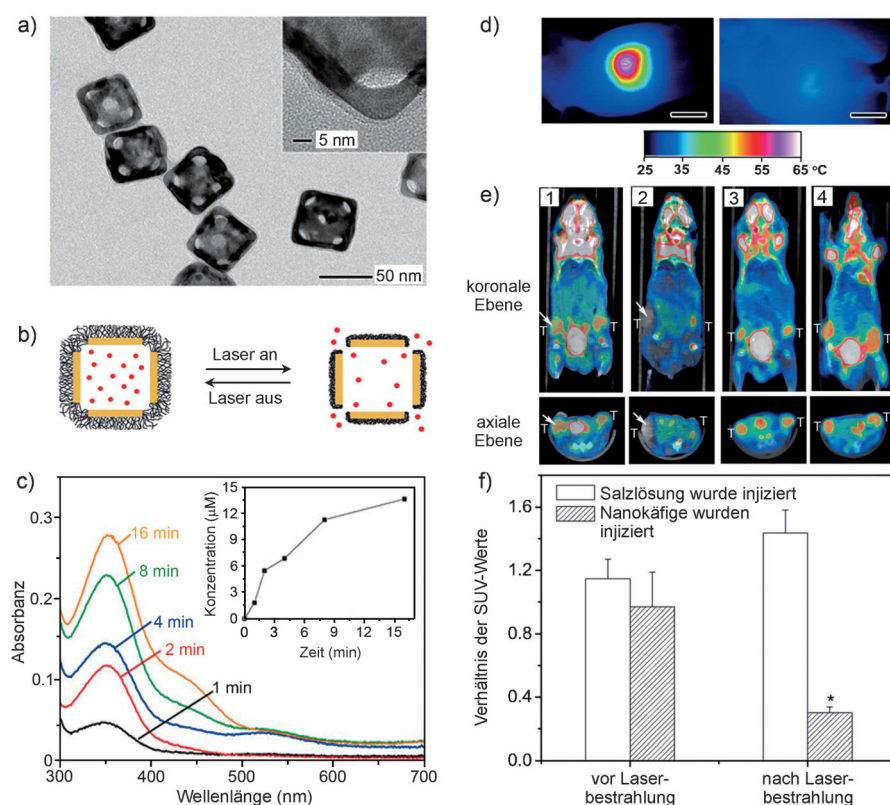


Abbildung 22. a) TEM-Aufnahmen von Au-Nanokäfigen, deren Oberfläche mit einer Polymerbürste aus pNIPAAm-co-pAAM mit einer unteren kritischen Lösungstemperatur von 39 °C bedeckt waren. Der Einschub zeigt eine vergrößerte TEM-Aufnahme der Kante eines solchen Nanokäfigs. b) Schematische Darstellung der photoinduzierten Wirkstofffreisetzung. c) Absorptionsspektren von Alizarin-PEG, das aus den mit Copolymer bedeckten Au-Nanokäfigen bei Bestrahlung mit einem gepulsten NIR-Laser mit einer Leistungsdichte von 10 mW cm⁻² über 1, 2, 4, 8 bzw. 16 min freigesetzt wurde. d) Thermographien von tumortragenden Mäusen nach 10-minütiger Injektion von Au-Nanokäfigen (links) und Kochsalzlösung (rechts). e) Kombinierte PET/CT-Aufnahmen mit ¹⁸F-FDG von tumortragenden Mäusen, denen intravenös entweder Au-Nanokäfige oder Kochsalzlösung injiziert wurde: 1,2) Maus mit injizierten Nanokäfigen vor und nach Laserbestrahlung (CW-NIR-Laser); 3,4) Maus mit injizierter Kochsalzlösung vor und nach Laserbestrahlung. Die weißen Pfeile geben die Tumore an, die dem Laser bei einer Leistungsdichte von 0.7 W cm⁻² 10 min lang ausgesetzt waren. f) Auftragung der Verhältnisse von standardisierten ¹⁸F-FDG-Aufnahmewerten (SUV, *P < 0.001) bei einem laserbehandelten Tumor (rechter Tumor) und einem nicht behandelten Tumor (linker Tumor). Wiedergabe von (a)–(c) aus Lit. [121c] mit freundlicher Genehmigung, Copyright 2009 Nature Publishing Group. Wiedergabe von (d)–(f) aus Lit. [329] mit freundlicher Genehmigung, Copyright 2010 Wiley-VCH.

eine signifikante Verbesserung der Krebstherapie. Ein zielgerichteter Transport kann die systemischen Nebenwirkungen verringern, unter denen die Patienten in der herkömmlichen Chemotherapie leiden, indem sichergestellt wird, dass ausgesprochen zytotoxische Wirkstoffspiegel nur an Tumorstellen vorkommen. Abgesehen vom Targeting wurden Nanopartikel auch so entworfen, dass sie ihre Fracht in Reaktion auf verschiedenste Reize freisetzen. Dabei wurden sowohl für die Tumorumgebung spezifische Reize, wie etwa niedrigere pH-Werte und erhöhte Sekretion bestimmter Enzyme (z.B. Matrixmetalloproteinase, MMP),^[330] oder äußere Reize wie etwa Lichtexposition oder Erwärmen genutzt. Mit Nanopartikeln lässt sich auch eine Multifunktionalität realisieren, indem sowohl diagnostische (d.h. Bildgebungscontrastverstärkung oder molekulare Erkennungsfähigkeit) als auch therapeutische Merkmale kombiniert werden: Diese Kombination wird als *Theranostika* bezeichnet.

In den letzten Jahren gab es auch erstmals Anlass zur Hoffnung, dass nanopartikelbasierte Transportsysteme für die Krebsimmuntherapie von Nutzen sein könnten, da sie den (gemeinsamen) Transport von tumorassoziierten, immunmodulatorischen Substanzen und/oder Antigenen an dendritische Zellen erlauben. Die aktivierten dendritischen Zellen tragen daraufhin die „Gefahr“-Information zu den T-Zellen weiter, die dann eine kontinuierliche und langfristige Eliminierung der betreffenden Tumorzellen initiieren.^[331] Man kann davon ausgehen, dass dieses faszinierende Forschungsthema umfassend und intensiv untersucht wird, was die Vielseitigkeit und Wirksamkeit von Nanopartikeln als Krebstherapeutika deutlich erweitern wird.

Trotz des beeindruckenden Fortschritts sind jedoch noch viele Herausforderungen auf dem Weg zu einer weitverbreiteten Anwendung der Nanomedizin zu bewältigen. Zum Beispiel liegt eine wesentliche Hürde in der Entwicklung von Verfahren für eine optimale Wirkstoffbeladung und Freisetzung aus den Nanopartikeln. Physikochemische Eigenschaften eines Trägers müssen präzise maßgeschneidert werden, um sicherzustellen, dass dieser die verkapselten Wirkstoffmoleküle während inerte Phasen (z.B. Lagerung, Blutzirkulation) stabilisiert, aber auch zur Freisetzung des Wirkstoffs aktiviert werden kann, sobald die Tumorstelle erreicht ist. Grundsätzlich sollte ein nanopartikelbasiertes Transportsystem gleichermaßen eine hohe Wirkstoffbeladungskapazität, eine lange Halbwertszeit im Blutkreislauf, eine effiziente Targeting-Fähigkeit, die Möglichkeit einer programmierten Freisetzung, Reaktionsfähigkeit auf Reize und diagnostische Merkmale vereinen.

Häufig sind die Targeting- und therapeutischen Fähigkeiten von Nanopartikeln eher begrenzt, da die Tumormikroumgebung hoch heterogen und komplex aufgebaut ist und eine Mischung mehrerer Unterpopulationen enthält, wie etwa primäre Krebszellen, Krebsstammzellen, mutierte Varianten und tumorassoziierte Stromazellen.^[332] Andererseits haben viele Tumore einige Eigenschaften mit normalen Geweben gemeinsam, wie etwa die Sekretion von MMP und Expression von Folatrezeptoren, die auch an vielen anderen Stellen als auf Tumoren auftreten, jedoch in geringerer Konzentration.^[333] Um dieses Problem zu bewältigen, wurden zwei Ansätze entwickelt, an denen mehrere Transport- und

Targeting-Mechanismen beteiligt sind. Anstatt nur ein Ziel im Tumor anzusteuern, können Nanopartikel entwickelt werden, die gleichzeitig zwei oder mehr Wirkstoffe mit programmierten Freisetzungsprofilen tragen, oder der Wirkstoff selbst kann so modifiziert werden, dass er gleichzeitig mehrere Antitumoreinheiten ansteuert.^[334] Ebenso können mehrere Antikörper, die für einen Tumortyp spezifisch sind (z.B. HER-2- und MMP-Antikörper bei einigen Brusttumoren),^[335] an die Oberfläche von Nanopartikelträgern konjugiert werden, um die Wahrscheinlichkeit und Genauigkeit der Tumorerkennung zu maximieren.

Die Clearance von Nanopartikeln *in vivo* ist ein weiterer entscheidender Aspekt, der bei deren Design berücksichtigt werden muss. Während die meisten polymerbasierten Nanopartikel so entworfen werden können, dass sie nach Erfüllung ihrer Aufgabe als Wirkstofftransportvehikel (zumindest in gewissem Maße) abgebaut werden, gibt es viele andere Systeme (z.B. anorganische Nanopartikel), die nicht so ohne Weiteres abgebaut werden, jedoch zu wirksam sind, um sie von einer Verwendung auszuschließen. In diesen Fällen ist für den Aufbau der Transportsysteme ein höheres Maß an Komplexität erforderlich, die auf der physiologischen Relevanz dieses Systems sowohl in den kanzerösen als auch den normalen Geweben basiert. Eine mögliche Lösung liegt in mehrstufigen, programmierten Systemen, bei denen größere Partikel (etwa 50 nm) durch die Verwendung von abbaubaren Linkern aus zahlreichen kleineren Partikeln (< 6 nm groß) zusammengefügt werden.^[336] Die zunächst verabreichten großen Partikel können die durch den EPR-Effekt des Tumorgefäßsystems begünstigte Targeting-Effizienz verbessern, aber sobald sie in die Tumorregionen gelangen, werden die Linker durch tumorspezifische Enzyme abgebaut, sodass die kleinen, < 6 nm großen Partikel frei werden und anschließend vom Körper über Nierenfiltration eliminiert werden können.

Neben den Bemühungen an den Nanopartikeln selbst ist die Entwicklung von realistischen *In-vitro*-Testplattformen unerlässlich, mit denen sich die Leistung von nanopartikelbasierten Wirkstofftransportsystemen effizient bewerten lässt. Bis heute funktionieren die meisten Transportsysteme *in vitro* sehr gut, versagen jedoch, wenn sie in der viel komplexeren Mikroumgebung *in vivo* getestet werden. Zwischen *In-vitro*-Tumormodellen und vorklinischen Modellen (d.h. kleinen oder großen Labortieren) sowie zwischen Tieren und menschlichen Körpern bestehen ausgeprägte Unterschiede. Im vergangenen Jahrzehnt haben dreidimensionale (3D) Kultursysteme, die auf porösen Gerüsten oder Hydrogelen basieren, allmählich die herkömmlichen zweidimensionalen (2D) Kulturen auf Kunststoffgewebekulturplatten (tissue culture plates, TCP) abgelöst, um die Organisation von Geweben *in vivo* besser nachzuahmen. Beruhigenderweise wurde vor einigen Jahren ein neues und spannendes Konzept, das „organ-on-a-chip“ von Ingber und Mitarbeitern vorgeschlagen, basierend auf eigenen Arbeiten und solchen von Schuler et al.^[337] Bei diesem Ansatz werden miniaturisierte, menschliche 3D-Gewebe/Organe (z.B. Leber, Lunge, Herz, Niere und Blutgefäße) *in vitro* aus Perfusionskulturen auf Mikrofluidikchips geschaffen und miteinander verbunden, um eine den Menschen nachahmende Multiorganplattform zu bilden, die zum Testen von Wirkstoffen und Nanopartikeln

verwendet werden kann. Unter Verwendung dieser „organ-on-a-chip“-Plattform kann die Beurteilung von Nanopartikeln als Wirkstofftransportsystemen sehr viel effizienter erfolgen und so ihr In-vivo-Verhalten vorhergesagt werden. Von besonderer Bedeutung ist darüber hinaus, dass aufgrund der „humanisierten“ Merkmale auf der Plattform vorklinische Modelle am Ende womöglich nicht mehr erforderlich sind.

Angeichts des jüngsten technischen Fortschritts sowie des in den vergangenen Jahrzehnten angesammelten Wissens sind wir der Ansicht, dass intelligente, zielgerichtete Nanopartikel als Wirkstoffträger das Gebiet der Krebstherapie revolutionieren werden und damit sowohl die Lebensqualität wie auch die Lebenszeit von Patienten signifikant verbessern werden. Wir hoffen, schon in naher Zukunft die Entwicklung personalisierter Krebstherapeutika zu erleben, die auf Nanopartikel mit zunehmend ausgereifteren Designs und Netzwerken basieren.

Eingegangen am 5. März 2014

Online veröffentlicht am 7. Oktober 2014

Übersetzt von Dr. Christiane Feldmann-Leben, Ettlingen

- [1] Globocan 2012, IARC **2013**.
- [2] S. D. Steichen, M. Caldorera-Moore, N. A. Peppas, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *48*, 416–427.
- [3] Neuste Weltkrebsstatistik, IARC **2013**.
- [4] American Cancer Society **2013**.
- [5] U. Aruna, R. Rajalakshmi, Y. I. Muzib, V. Vinesha, M. Sushma, K. R. Vandana, N. V. Kumar, *Inter. J. Inn. Pharm. Res.* **2013**, *4*, 318–324.
- [6] D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 751–760.
- [7] a) G. M. Whitesides, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1161–1165; b) D. A. LaVan, T. McGuire, R. Langer, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1184–1191; c) M. Ferrari, *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 161–171; d) O. C. Farokhzad, J. M. Karp, R. Langer, *Expert Opin. Drug Delivery* **2006**, *3*, 311–324; e) L. Zhang, F. X. Gu, J. M. Chan, A. Z. Wang, R. Langer, O. C. Farokhzad, *Clin. Pharmacol. Ther.* **2008**, *83*, 761–769; f) R. Langer, *Nature* **1998**, *392*, 5–10; g) R. Langer, *Science* **1990**, *249*, 1527–1533; h) O. C. Farokhzad, R. Langer, *ACS Nano* **2009**, *3*, 16–20.
- [8] a) M. E. Lobatto, V. Fuster, Z. A. Fayad, W. J. M. Mulder, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2011**, *10*, 835–852; b) C. R. Thomas, D. P. Ferris, J. H. Lee, E. Choi, M. H. Cho, E. S. Kim, J. F. Stoddart, J. S. Shin, J. Cheon, J. I. Zink, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10623–10625; c) J. H. Gao, B. Xu, *Nano Today* **2009**, *4*, 37–51.
- [9] A. Z. Wang, R. Langer, O. C. Farokhzad, *Annu. Rev. Med.* **2012**, *63*, 185–198.
- [10] A. J. Montero, B. Adams, C. M. Diaz-Montero, S. Gluck, *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **2011**, *4*, 329–334.
- [11] M. E. R. 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. Alland, C. Tendler, *Ann. Oncol.* **2004**, *15*, 440–449.
- [12] a) C. E. Petre, D. P. Dittmer, *Int. J. Nanomed.* **2007**, *2*, 277–288; b) „Kaposi's sarcoma: DaunoXome approved“: *AIDS Treat News* **1996**, *246*, 3–4.
- [13] M. S. Angst, D. R. Drover, *Clin. Pharmacokinet.* **2006**, *45*, 1153–1176.
- [14] Y. Barenholz, *J. Controlled Release* **2012**, *160*, 117–134.
- [15] C. Oerlemans, W. Bult, M. Bos, G. Storm, J. F. Nijsen, W. E. Hennink, *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 2569–2589.
- [16] a) „FDA approves liposomal vincristine (Marqibo) for rare leukemia“: *Oncology* **2012**, *26*, 841; b) J. A. Silverman, S. R. Deitcher, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2013**, *71*, 555–564.
- [17] J. Lao, J. Madani, T. Puertolas, M. Álvarez, A. Hernández, R. Pazo-Cid, Á. Artal, A. A. Torres, *J. Drug Delivery* **2013**, 456409.
- [18] P. A. Dinndorf, J. Gootenberg, M. H. Cohen, P. Keegan, R. Pazdur, *Oncologist* **2007**, *12*, 991–998.
- [19] a) T. Okusaka, S. Okada, H. Ueno, M. Ikeda, R. Iwata, H. Furukawa, K. Takayasu, N. Moriyama, T. Sato, K. Sato, *Oncology* **2002**, *62*, 228–233; b) K. Greish, J. Fang, T. Inutsuka, A. Nagamitsu, H. Maeda, *Clin. Pharmacokinet.* **2003**, *42*, 1089–1105; c) H. Ishii, J. Furuse, M. Nagase, Y. Maru, M. Yoshino, T. Hayashi, *Jpn. J. Clin. Oncol.* **2003**, *33*, 570–573.
- [20] K. Kato, K. Chin, T. Yoshikawa, K. Yamaguchi, Y. Tsuji, T. Esaki, K. Sakai, M. Kimura, T. Hamaguchi, Y. Shimada, Y. Matsumura, R. Ikeda, *Invest. New Drugs* **2012**, *30*, 1621–1627.
- [21] a) J. Hrkach, D. Von Hoff, M. M. Ali, E. Andrianova, J. Auer, T. Campbell, D. De Witt, M. Figa, M. Figueiredo, A. Horhota, S. Low, K. McDonnell, E. Peeke, B. Retnarajan, A. Sabnis, E. Schnipper, J. J. Song, Y. H. Song, J. Summa, D. Tompsett, G. Troiano, T. Van Geen Hoven, J. Wright, P. LoRusso, P. W. Kantoff, N. H. Bander, C. Sweeney, O. C. Farokhzad, R. Langer, S. Zale, *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 128ra139; b) P. R. Gil, D. Huhn, L. L. del Mercato, D. Sasse, W. J. Parak, *Pharmacol. Res.* **2010**, *62*, 115–125; c) J. M. Chan, L. F. Zhang, R. Tong, D. Ghosh, W. W. Gao, G. Liao, K. P. Yuet, D. Gray, J. W. Rhee, J. J. Cheng, G. Golomb, P. Libby, R. Langer, O. C. Farokhzad, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 2213–2218; d) S. Dhar, F. X. Gu, R. Langer, O. C. Farokhzad, S. J. Lippard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 17356–17361; e) J. Cheng, B. A. Teply, I. Sherifi, J. Sung, G. Luther, F. X. Gu, E. Levy-Nissenbaum, A. F. Radovic-Moreno, R. Langer, O. C. Farokhzad, *Biomaterials* **2007**, *28*, 869–876.
- [22] a) J. L. Lee, J. H. Ahn, S. H. Park, H. Y. Lim, J. H. Kwon, S. Ahn, C. Song, J. H. Hong, C. S. Kim, H. Ahn, *Invest. New Drugs* **2012**, *30*, 1984–1990; b) D. W. Kim, S. Y. Kim, H. K. Kim, S. W. Kim, S. W. Shin, J. S. Kim, K. Park, M. Y. Lee, D. S. Heo, *Ann. Oncol.* **2007**, *18*, 2009–2014; c) M. W. Saif, *JOP* **2007**, *8*, 166–176.
- [23] a) G. J. Weiss, J. Chao, J. D. Neidhart, R. K. Ramanathan, D. Bassett, J. A. Neidhart, C. H. Choi, W. Chow, V. Chung, S. J. Forman, E. Garmey, J. Hwang, D. L. Kalinoski, M. Koczywas, J. Longmate, R. J. Melton, R. Morgan, J. Oliver, J. J. Peterkin, J. L. Ryan, T. Schluep, T. W. Synold, P. Twardowski, M. E. Davis, Y. Yen, *Invest. New Drugs* **2013**, *31*, 986–1000; b) T. Schluep, J. Hwang, J. Cheng, J. D. Heidel, D. W. Bartlett, B. Hollister, M. E. Davis, *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 1606–1614; c) T. Schluep, J. Cheng, K. T. Khin, M. E. Davis, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2006**, *57*, 654–662; d) J. Cheng, K. T. Khin, M. E. Davis, *Mol. Pharm.* **2004**, *1*, 183–193; e) J. J. Cheng, K. T. Khin, G. S. Jensen, A. J. Liu, M. E. Davis, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 1007–1017.
- [24] S. K. Libutti, G. F. Paciotti, A. A. Byrnes, H. R. Alexander, Jr., W. E. Gannon, M. Walker, G. D. Seidel, N. Yuldasheva, L. Tamarkin, *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 6139–6149.
- [25] T. M. Allena, P. R. Cullish, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2013**, *65*, 36–48.
- [26] Y. Iwase, Y. Maitani, *Mol. Pharmaceutics* **2011**, *8*, 330–337.
- [27] S. P. Chawla, V. S. Chua, L. Fernandez, D. Quon, W. C. Blackwelder, E. M. Gordon, F. L. Hall, *Mol. Ther.* **2010**, *18*, 435–441.
- [28] C. Mamot, R. Ritschard, A. Wicki, G. Stehle, T. Dieterle, L. Bubendorf, C. Hilker, S. Deuster, R. Herrmann, C. Rochlitz, *Lancet Oncol.* **2012**, *13*, 1234–1241.
- [29] C. Potera, *Genet. Eng. Biotechnol. News* **2011**, *31*, 45–47.
- [30] S. P. Egusquiguirre, M. Igartua, R. M. Hernández, J. L. Pedraz, *Clin. Transl. Oncol.* **2012**, *14*, 83–93.

- [31] a) M. E. Davis, *Mol. Pharmaceutics* **2009**, *6*, 659–668; b) M. E. Davis, J. E. Zuckerman, C. H. Choi, D. Seligson, A. Tolcher, C. A. Alabi, Y. Yen, J. D. Heidel, A. Ribas, *Nature* **2010**, *464*, 1067–1070.
- [32] D. Lazarus, S. Kabir, S. Eliasof, *Cancer Res.* **2012**, *72*, 5643.
- [33] P. X. Zhao, D. Astruc, *ChemMedChem* **2012**, *7*, 952–997.
- [34] K. H. Jung, K. P. Kim, D. H. Yoon, Y. S. Hong, C. M. Choi, J. H. Ahn, D. H. Lee, J. L. Lee, M. H. Ryu, B. Y. Ryoo, H. M. Chang, T. W. Kim, S. B. Kim, S. W. Kim, C. Suh, Y. K. Kang, J. Lee, K. S. Bae, Y. M. Kim, *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, e13104.
- [35] H. Shen, T. Sun, M. Ferrari, *Cancer Gene Ther.* **2012**, *19*, 367–373.
- [36] R. Friedman, *J. Natl. Cancer Inst.* **2011**, *103*, 1428–1429.
- [37] a) Y. Matsumura, H. Maeda, *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387–6392; b) T. Minko, P. Kopeckova, J. Kopecek, *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 986–996; c) P. Couvreur, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2013**, *65*, 21–23; d) G. Bao, S. Mitragotri, S. Tong, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2013**, *15*, 253–282.
- [38] P. Singh, A. Singh, *J. Cancer Ther. Res.* **2012**, *1*, 5.
- [39] L. M. Hilliard, R. L. Berkow, J. Watterson, E. A. Ballard, G. K. Balzer, C. L. Moertel, *Med. Pediatr. Oncol.* **1997**, *28*, 310–313.
- [40] B. Damascelli, G. Cantù, F. Mattavelli, P. Tamplenizza, P. Bidoli, E. Leo, F. Dosio, A. M. Cerrotta, G. Di Tolla, L. F. Frigerio, F. Garbagnati, R. Lanocita, A. Marchionò, G. Patelli, C. Spreafico, V. Tichà, V. Vespro, F. Zunino, *Cancer* **2001**, *92*, 2592–2602.
- [41] N. Ferrara, K. J. Hillan, H.-P. Gerber, W. Novotny, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 391–400.
- [42] C. G. Foerster, C. Cursiefen, F. E. Kruse, *Cornea* **2008**, *27*, 612–614.
- [43] G. Xu, H. L. McLeod, *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 3314–3324.
- [44] L. Toschi, G. Finocchiaro, S. Bartolini, V. Gioia, F. Cappuzzo, *Future Oncol.* **2005**, *1*, 7–17.
- [45] A. Otte, C. van de Wiele, R. A. Dierckx, *Nucl. Med. Commun.* **2009**, *30*, 5–15.
- [46] U. K. Narta, S. S. Kanwar, W. Azmi, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2007**, *61*, 208–221.
- [47] L. Saltz, C. Easley, P. Kirkpatrick, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 987–988.
- [48] T. E. Witzig, A. M. Vukov, T. M. Habermann, S. Geyer, P. J. Kurtin, W. R. Friedenberg, W. L. White, H. I. Chachal, P. J. Flynn, T. R. Fitch, D. A. Welker, *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 1103–1108.
- [49] J. M. Vose, *Oncologist* **2004**, *9*, 160–172.
- [50] R. Nahta, F. J. Esteva, *Cancer Lett.* **2006**, *232*, 123–138.
- [51] S. C. Owen, A. K. Doak, P. Wassam, M. S. Shoichet, B. K. Shoichet, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1429–1435.
- [52] A. Kumari, S. K. Yadav, S. C. Yadav, *Colloids Surf. B* **2010**, *75*, 1–18.
- [53] J. Liu, H. Lee, M. Huesca, A. Young, C. Allen, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2006**, *58*, 306–318.
- [54] K. M. Huh, S. C. Lee, Y. W. Cho, J. Lee, J. H. Jeong, K. Park, *J. Controlled Release* **2005**, *101*, 59–68.
- [55] H. K. Makadia, S. J. Siegel, *Polymer* **2011**, *3*, 1377–1397.
- [56] V. P. Torchilin, A. N. Lukyanov, Z. Gao, B. Papahadjopoulos-Sternberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 6039–6044.
- [57] E. Fattal, A. Bochota, *Int. J. Pharm.* **2008**, *364*, 237–248.
- [58] a) Y. P. Li, Y. Y. Pei, X. Y. Zhang, Z. H. Gu, Z. H. Zhou, W. F. Yuan, J. J. Zhou, J. H. Zhu, X. J. Gao, *J. Controlled Release* **2001**, *71*, 203–211; b) E. Fattal, G. Barratt, *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157*, 179–194; c) M. George, T. E. Abraham, *J. Controlled Release* **2006**, *114*, 1–14; d) C. Bouclier, L. Moine, H. Hillaireau, V. Marsaud, E. Connault, P. Opolon, P. Couvreur, E. Fattal, J. M. Renoir, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2881–2890; e) T. Ishihara, T. Mizushima, *Expert Opin. Drug Delivery* **2010**, *7*, 565–575.
- [59] a) Z. Chen, *Trends Mol. Med.* **2010**, *16*, 594–602; b) Y. C. Wang, P. W. Li, L. X. Kong, Z. Peng, Y. Y. Luo, *2010 3rd International Conference on Biomedical Engineering and Informatics* **2010**, 1686–1689; c) M. Wang, K. Alberti, S. Sun, C. L. Arellano, Q. Xu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 2893–2898.
- [60] P. A. McCarron, M. Hall, *Int. J. Pharm.* **2008**, *348*, 115–124.
- [61] E. Leo, S. Pecquet, J. Rojas, P. Couvreur, E. Fattal, *J. Microencapsulation* **1998**, *15*, 421–430.
- [62] R. Bodmeier, J. W. McGinity, *J. Microencapsulation* **1988**, *5*, 325–330.
- [63] a) R. Gref, Y. Minamitake, M. T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin, R. Langer, *Science* **1994**, *263*, 1600–1603; b) R. Gref, A. Domb, P. Quellec, T. Blunk, R. H. Muller, J. M. Verbavatz, R. Langer, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, *64*, 316–326; c) J. H. Lee, K. Lee, S. H. Moon, Y. Lee, T. G. Park, J. Cheon, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *121*, 4238–4243; d) N. Zheng, L. C. Yin, Z. Y. Song, L. Ma, H. Y. Tang, N. P. Gabrielson, H. Lu, J. J. Cheng, *Biomaterials* **2014**, *35*, 1302–1314.
- [64] J. J. Shi, A. R. Votruba, O. C. Farokhzad, R. Langer, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 3223–3230.
- [65] a) M. Wang, S. Sun, K. A. Alberti, Q. B. Xu, *ACS Synth. Biol.* **2012**, *1*, 403–407; b) J. Zhou, K. T. Shum, J. C. Burnett, J. J. Rossi, *Pharmaceutics* **2013**, *6*, 85–107; c) S. H. Ku, K. Kim, K. Choi, S. H. Kim, I. C. Kwon, *Adv. Healthcare Mater.* **2014**, *3*, 1182–1193; d) Y. Ding, Z. Jiang, K. Saha, C. S. Kim, S. T. Kim, R. F. Landis, V. M. Rotello, *Mol. Ther.* **2014**, *22*, 1075–1083.
- [66] a) A. Akinc, A. Zumbuehl, M. Goldberg, E. S. Leshchiner, V. Busini, N. Hossain, S. A. Bacallado, D. N. Nguyen, J. Fuller, R. Alvarez, A. Borodovsky, T. Borland, R. Constien, A. de Fougères, J. R. Dorkin, K. N. Jayaprakash, M. Jayaraman, M. John, V. Kotliansky, M. Manoharan, L. Nechev, J. Qin, T. Racie, D. Raitcheva, K. G. Rajeev, D. W. Y. Sah, J. Soutschek, I. Toudjarska, H. P. Vornlocher, T. S. Zimmermann, R. Langer, D. G. Anderson, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 561–569; b) D. G. Anderson, W. D. Peng, A. Akinc, N. Hossain, A. Kohn, R. Padera, R. Langer, J. A. Sawicki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 16028–16033; c) K. A. Woodrow, Y. Cu, C. J. Booth, J. K. Saucier-Sawyer, M. J. Wood, W. M. Saltzman, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 526–533.
- [67] T. M. Sun, J. Z. Du, L. F. Yan, H. Q. Mao, J. Wang, *Biomaterials* **2008**, *29*, 4348–4355.
- [68] W. H. De Jong, P. J. A. Borm, *Int. J. Nanomed.* **2008**, *3*, 133–149.
- [69] a) W. S. Seferos, D. A. Giljohann, H. D. Hill, A. E. Prigodich, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15477–15479; b) J. I. Cutler, K. Zhang, D. Zheng, E. Auyeung, A. E. Prigodich, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9254–9257; c) J. I. Cutler, E. Auyeung, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1376–1391.
- [70] a) R. Duncan, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 347–360; b) R. Duncan, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 688–701; c) A. O. El-zoghby, W. M. Samy, N. A. Elgindy, *J. Controlled Release* **2012**, *157*, 168–182; d) E. Fleige, M. A. Quadir, R. Haag, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, *64*, 866–884; e) S. Mura, J. Nicolas, P. Couvreur, *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 991–1003; f) Y. C. Wang, M. S. Shim, H. W. Sung, Y. Xia, *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24*, 4206–4220.
- [71] a) K. E. Uhrich, S. M. Cannizzaro, R. Langer, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 3181–3198; b) A. A. Robitzki, R. Kurz, *Handb. Exp. Pharmacol.* **2010**, *197*, 87–112.
- [72] a) R. Langer, N. Peppas, *Biomaterials* **1981**, *2*, 201–214; b) D. Y. Arifin, L. Y. Lee, C. H. Wang, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2006**, *58*, 1274–1325; c) J. Siepmann, F. Siepmann, *Int. J. Pharm.* **2008**, *364*, 328–343.
- [73] S. Pundir, A. Badola, D. Sharma, *Int. J. Drug Res. Technol.* **2013**, *3*, 12–20.

- [74] a) H. Huang, E. E. Remsen, T. Kowalewski, K. L. Wooley, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3805–3806; b) M. S. Wong, J. N. Cha, K. S. Choi, T. J. Deming, G. D. Stucky, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 583–587; c) H. P. Hentze, E. W. Kaler, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2003**, *8*, 164–178; d) G. L. Li, H. Möhwald, D. G. Shchukin, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 3628–3646.
- [75] J. Siepmann, R. A. Siegel, M. J. Rathbone, *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*, Springer, Amsterdam, **2012**.
- [76] a) J. H. Gao, G. L. Liang, B. Zhang, Y. Kuang, X. X. Zhang, B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1428–1433; b) S. W. Cao, Y. J. Zhu, M. Y. Ma, L. Li, L. Zhang, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 1851–1856; c) Y. Chen, H. R. Chen, L. M. Guo, Q. J. He, F. Chen, J. Zhou, J. W. Feng, J. L. Shi, *ACS Nano* **2010**, *4*, 529–539; d) S. Yang, N. Li, D. Chen, X. Qi, Y. Xu, Y. Xu, Q. Xu, H. Li, J. Lu, *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 4628–4636.
- [77] K. Cheng, S. Peng, C. Xu, S. Sun, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10637–10644.
- [78] V. J. Mohanraj, Y. Chen, *J. Pharm. Res.* **2006**, *5*, 561–573.
- [79] A. Dessy, A. M. Piras, M. Alderighi, S. Sandreschi, F. Chiellini, *Nano Biomed. Eng.* **2012**, *4*, 83–88.
- [80] Y. D. Ma, Y. Zheng, X. W. Zeng, L. Q. Jiang, H. B. Chen, R. Y. Liu, L. Q. Huang, L. Mei, *Int. J. Nanomed.* **2011**, *6*, 2679–2688.
- [81] a) X. Chen, C. P. Ooi, *J. Biomater. Appl.* **2006**, *20*, 287–302; b) P. Johansen, L. Moon, H. Tamber, H. P. Merkle, B. Gander, D. Sesardic, *Vaccine* **1999**, *18*, 209–215; c) M. Husmann, S. Schenderlein, M. Lück, H. Lindner, P. Kleiebudde, *Int. J. Pharm.* **2002**, *242*, 277–280; d) L. Lu, C. A. Garcia, A. G. Mikos, *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, *46*, 236–244; e) M. Zilberman, O. Grinber, *J. Biomater. Appl.* **2008**, *22*, 391–407.
- [82] A. Göpferich, *Biomaterials* **1996**, *17*, 103–114.
- [83] T. Välimaa, S. Laaksovirta, *Biomaterials* **2004**, *25*, 1225–1232.
- [84] S. Zuleger, B. C. Lippold, *Int. J. Pharm.* **2001**, *217*, 139–152.
- [85] J. A. Tamada, R. Langer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 552–556.
- [86] A. N. F. Versypt, D. L. W. Pack, R. D. Braatz, *J. Controlled Release* **2013**, *165*, 29–37.
- [87] H. J. Kim, H. Matsuda, H. Zhou, I. Honma, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 3083–3088.
- [88] J. Kost, *Clin. Mater.* **1993**, *13*, 155–161.
- [89] a) J. Kost, R. Langer, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1991**, *6*, 19–50; b) I. Lavon, J. Kost, *J. Controlled Release* **1998**, *54*, 1–7.
- [90] a) R. Mo, T. Jiang, R. DiSanto, W. Tai, Z. Gu, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3364; b) B. Khorsand, G. Lapointe, C. Brett, J. K. Oh, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 2103–2111; c) R. Duan, F. Xia, L. Jiang, *ACS Nano* **2013**, *7*, 8344–8349; d) Y. Zhang, H. F. Chan, K. W. Leong, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2013**, *65*, 104–120.
- [91] a) X. Zhao, J. Kim, C. A. Cezar, N. Huebsch, K. Lee, K. Bouhadir, D. J. Mooney, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 67–72; b) R. Cheng, F. Meng, C. Deng, H. A. Klok, Z. Zhong, *Biomaterials* **2013**, *34*, 3647–3657; c) S. R. Sirsi, M. A. Borden, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2013**, *72*, 3–14; d) V. Pillay, T. S. Tsai, Y. E. Choonara, L. C. du Toit, P. Kumar, G. Modi, D. Naidoo, L. K. Tomar, C. Tyagi, V. M. K. Ndesendo, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2014**, *102*, 2039–2054.
- [92] a) K. Loomis, K. McNeeley, R. V. Bellamkonda, *Soft Matter* **2011**, *7*, 839–856; b) R. Lehner, P. Hunziker, *Eur. J. Nanomed.* **2012**, *4*, 73–80; c) D. Roy, J. N. Cambre, B. S. Sumerlin, *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 278–301; d) R. Haag, F. Kratz, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1218–1237; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1198–1215; e) J. Khandare, M. Calderón, N. M. Dagia, R. Haag, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2824–2848.
- [93] a) J. Kost, R. Langer, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *46*, 125–148; b) A. V. Ambade, E. N. Savariar, S. Thayumanavan, *Mol. Pharmaceutics* **2005**, *2*, 264–272; c) E. S. Lee, K. Na, Y. H. Bae, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 325–329; d) D. Schmaljohann, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2006**, *58*, 1655–1670; e) P. Bawa, V. Pillay, Y. E. Choonara, L. C. du Toit, *Biomed. Mater.* **2009**, *4*, 022001.
- [94] a) J. O. Kim, A. V. Kabanov, T. K. Bronich, *J. Controlled Release* **2009**, *138*, 197–204; b) C. L. Lo, C. K. Huang, K. M. Lin, G. H. Hsiue, *Biomaterials* **2007**, *28*, 1225–1235.
- [95] U. Borchert, U. Lipprandt, M. Bilanz, A. Kimpfner, A. Rank, R. Peschka-Süss, R. Schubert, P. Lindner, S. Förster, *Langmuir* **2006**, *22*, 5843–5847.
- [96] M. Oishi, H. Hayashi, M. Iijima, Y. Nagasaki, *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 3720–3725.
- [97] K. Na, E. S. Lee, Y. H. Bae, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1568–1574.
- [98] a) A. E. Felber, M. H. Dufresne, J. C. Leroux, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, *64*, 979–992; b) M. S. Shim, Y. J. Kwon, *Biomaterials* **2010**, *31*, 3404–3413; c) E. R. Gillies, J. M. J. Fréchet, *Chem. Commun.* **2003**, 1640–1641; d) H. Akita, R. Ishiba, H. Hatakeyama, H. Tanaka, Y. Sato, K. Tange, M. Arai, K. Kubo, H. Harashima, *Adv. Healthcare Mater.* **2013**, *2*, 1120–1125; e) S. Binauld, M. H. Stenzel, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2082–2102; f) C. Du, D. Deng, L. Shan, S. Wan, J. Cao, J. Tian, S. Achilefu, Y. Gu, *Biomaterials* **2013**, *34*, 3087–3097.
- [99] K. Ulbrich, T. Etrych, P. Chytil, M. Jelínková, B. Říhová, *J. Drug Targeting* **2004**, *12*, 477–489.
- [100] C. C. Lee, E. R. Gillies, M. E. Fox, S. J. Guillaudeu, J. M. J. Fréchet, E. E. Dy, F. C. Szoka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 16649–16654.
- [101] M. Calderón, P. Welker, K. Licha, I. Fichtner, R. Graeser, R. Haag, F. Kratz, *J. Controlled Release* **2011**, *151*, 295–301.
- [102] R. Tomlinson, J. Heller, S. Brocchini, R. Duncan, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 1096–1106.
- [103] a) Y. Bae, S. Fukushima, A. Harada, K. Kataoka, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4788–4791; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4640–4643; b) Y. Bae, K. Kataoka, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, *61*, 768–784.
- [104] a) S. R. Van Tomme, G. Storm, W. E. Hennink, *Int. J. Pharm.* **2008**, *355*, 1–18; b) C. A. Lorenzo, A. Concheiro, *Smart Materials for Drug Delivery*, RSC, London, **2013**; c) X. H. Xia, M. X. Yang, L. K. Oetjen, Y. Zhang, Q. G. Li, J. Y. Chen, Y. Xia, *Nanoscale* **2011**, *3*, 950–953.
- [105] a) R. V. Ulijn, *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 2217–2225; b) B. Law, C. H. Tung, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1683–1695.
- [106] R. de La Rica, D. Aili, M. M. Stevens, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, *64*, 967–978.
- [107] a) Z. Yang, G. Liang, L. Wang, B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3038–3043; b) Z. M. Yang, G. L. Liang, M. L. Ma, Y. Gao, B. Xu, *Small* **2007**, *3*, 558–562.
- [108] a) C. Park, H. Kim, S. Kim, C. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16614–16615; b) T. H. Ku, M. P. Chien, M. P. Thompson, R. S. Sinkovits, N. H. Olson, T. S. Baker, N. C. Gianneschi, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8392–8395; c) K. Haba, M. Popkov, M. Shamis, R. A. Lerner, C. F. Barbas, D. Shabat, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 726–730; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 716–720.
- [109] L. Zhu, P. Kate, V. P. Torchilin, *ACS Nano* **2012**, *6*, 3491–3498.
- [110] R. Dorresteyn, N. Billecke, M. Schwendy, S. Pütz, M. Bonn, S. H. Parekh, M. Klapper, K. Müllen, *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24*, 4026–4033.
- [111] T. J. Harris, G. von Maltzahn, M. E. Lord, J. H. Park, A. Agrawal, D. H. Min, M. J. Sailor, S. N. Bhatia, *Small* **2008**, *4*, 1307–1312.
- [112] H. Hatakeyama, H. Akita, E. Ito, Y. Hayashi, M. Oishi, Y. Nagasaki, R. Danev, K. Nagayama, N. Kaji, H. Kikuchi, Y. Baba, H. Harashima, *Biomaterials* **2011**, *32*, 4306–4316.
- [113] A. Bernardos, L. Mondragon, E. Aznar, M. D. Marcos, R. M. Mañez, F. Sancenon, J. Soto, J. M. Barat, E. P. Paya, C. Guillem, P. Amorós, *ACS Nano* **2010**, *4*, 6353–6368.

- [114] C. Zhang, D. Pan, K. Luo, W. She, C. Guo, Y. Yang, Z. Gu, *Adv. Healthcare Mater.* **2014**, 3, 1299–1308.
- [115] a) M. H. Xiong, Y. Bao, X. Z. Yang, Y. C. Wang, B. Sun, J. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 4355–4362; b) M. Tanihara, Y. Suzuki, Y. Nishimura, K. Suzuki, Y. Kakimaru, Y. Fukunisi, *J. Pharm. Sci.* **1999**, 88, 510–514.
- [116] T. Ta, T. M. Porter, *J. Controlled Release* **2013**, 169, 112–125.
- [117] a) T. Tagami, W. D. Foltz, M. J. Ernsting, C. M. Lee, I. F. Tannock, J. P. May, S. D. Li, *Biomaterials* **2011**, 32, 6570–6578; b) Z. S. Al-Ahmady, W. T. Al-Jamal, J. V. Bossche, T. T. Bui, A. F. Drake, A. J. Mason, K. Kostarelos, *ACS Nano* **2012**, 6, 9335–9346; c) K.-J. Chen, H.-F. Liang, H.-L. Chen, Y. Wang, P.-Y. Cheng, H.-L. Liu, Y. Xia, H. W. Sung, *ACS Nano* **2013**, 7, 438–446; d) K.-J. Chen, E.-Y. Chaung, S.-P. Wey, K.-J. Lin, F. Cheng, C.-C. Lin, H.-L. Liu, H.-W. Tseng, C.-P. Liu, M.-C. Wei, C.-M. Liu, H.-W. Sung, *ACS Nano* **2014**, 8, 5105–5115; e) M.-F. Chung, K.-J. Chen, H.-F. Liang, Z.-X. Liao, W.-T. Chia, Y. Xia, H.-W. Sung, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 10236–10240; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 10089–10093.
- [118] T. Tanaka, *Phys. Rev. A* **1978**, 17, 763–766.
- [119] a) A. Hatefi, B. Amsden, *J. Controlled Release* **2002**, 80, 9–28; b) T. Okano, Y. H. Bae, H. Jacobs, S. W. Kim, *J. Controlled Release* **1990**, 11, 255–265; c) L. Klouda, A. G. Mikos, *J. Pharm. Biopharm.* **2008**, 68, 34–45.
- [120] a) T. Y. Liu, S. H. Hu, D. M. Liu, S. Y. Chen, I. W. Chen, *Nano Today* **2009**, 4, 52–65; b) L. Martín, M. Alonso, A. Girotti, F. J. Arias, J. C. Rodríguez-Cabello, *Biomacromolecules* **2009**, 10, 3015–3022.
- [121] a) S. Aluri, S. M. Janib, J. A. Mackay, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, 61, 940–952; b) M. Das, N. Sanson, D. Fava, E. Kumacheva, *Langmuir* **2007**, 23, 196–201; c) M. S. Yavuz, Y. Cheng, J. Y. Chen, C. M. Cobley, Q. Zhang, M. Rycenga, J. Xie, C. Kim, K. H. Song, A. G. Schwartz, L. V. Wang, Y. Xia, *Nat. Mater.* **2009**, 8, 935–939; d) J. Thévenot, H. Oliveira, O. Sandre, S. Lecommandoux, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 7099–7116; e) L. C. Yin, H. Y. Tang, K. H. Kim, N. Zheng, Z. Y. Song, N. P. Gabrielson, H. Lu, J. J. Cheng, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 9352–9356; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 9182–9186.
- [122] a) N. Fomina, C. McFearn, M. Sermsakdi, O. Edigin, A. Almutairi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 9540–9542; b) J. S. Katz, J. A. Burdick, *Macromol. Biosci.* **2010**, 10, 339–348; c) Y. Zhang, Q. Yin, L. Yin, L. Ma, L. Tang, J. Cheng, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 6563–6567; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 6435–6439.
- [123] a) C. Alvarez-Lorenzo, L. Bromberg, A. Concheiro, *Photochem. Photobiol.* **2009**, 85, 848–860; b) S. Sortino, *J. Mater. Chem.* **2012**, 22, 301–318.
- [124] J. Lu, E. Choi, F. Tamasoi, J. I. Zink, *Small* **2008**, 4, 421–426.
- [125] Q. Yuan, Y. Zhang, T. Chen, D. Lu, Z. Zhao, X. Zhang, Z. Li, C. H. Yan, W. Tan, *ACS Nano* **2012**, 6, 6337–6344.
- [126] H. Yan, C. Teh, S. Sreejith, L. L. Zhu, A. Kwok, W. Q. Fang, X. Ma, K. T. Nguyen, V. Korzh, Y. L. Zhao, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 8498–8502; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 8373–8377.
- [127] Y. C. Liu, A. L. Le Ny, J. Schmidt, Y. Talmon, B. F. Chmelka, C. T. Lee, *Langmuir* **2009**, 25, 5713–5724.
- [128] a) A. Schroeder, M. S. Goldberg, C. Kastrup, Y. Wang, S. Jiang, B. J. Joseph, C. G. Levins, S. T. Kannan, R. Langer, D. G. Anderson, *Nano Lett.* **2012**, 12, 2685–2689; b) B. Moses, Y. You, *Med. Chem.* **2013**, 3, 192–198; c) S. S. Agasti, A. Chompoosor, C. C. You, P. Ghosh, C. K. Kim, V. M. Rotello, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 5728–5729.
- [129] a) J. You, R. Zhang, C. Xiong, M. Zhong, M. Melancon, S. Gupta, A. M. Nick, A. K. Sood, C. Li, *Cancer Res.* **2012**, 72, 4777–4786; b) Z. Xiao, C. Ji, J. Shi, E. M. Pridgen, J. Frieder, J. Wu, O. C. Farokhzad, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 12023–12027; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 11853–11857; c) Y. T. Chang, P. Y. Liao, H. S. Sheu, Y. J. Tseng, F. Y. Cheng, C. S. Yeh, *Adv. Mater.* **2012**, 24, 3309–3314; d) S. J. Leung, M. Romanowski, *Theranostics* **2012**, 2, 1020–1036.
- [130] S. Sharifi, S. Behzadi, S. Laurent, M. L. Forrest, P. Stroeve, M. Mahmoudi, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 2323–2343.
- [131] a) C. Yue, P. Liu, M. Zheng, P. Zhao, Y. Wang, Y. Ma, L. Cai, *Biomaterials* **2013**, 34, 6853–6861; b) L. Cheng, W. He, H. Gong, C. Wang, Q. Chen, Z. Cheng, Z. Liu, *Adv. Funct. Mater.* **2013**, 23, 5893–5902; c) E. G. Graham, C. M. Macneill, N. H. Levi-Polyachenko, *Nano LIFE* **2013**, 3, 1330002.
- [132] a) J. Yu, D. Javier, M. A. Yaseen, N. Nitin, R. Richards-Kortum, B. Anvari, M. S. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 1929–1938; b) X. Zheng, F. Zhou, B. Wu, W. R. Chen, D. Xing, *Mol. Pharmaceutics* **2012**, 9, 514–522; c) A. J. Gomes, L. O. Lunardi, J. M. Marchetti, C. N. Lunardi, A. C. Tedesco, *Photomed. Laser Surg.* **2006**, 24, 514–521; d) H. Mok, H. Jeong, S. J. Kim, B. H. Chung, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 8628–8630.
- [133] M. Zheng, C. Yue, Y. Ma, P. Gong, P. Zhao, C. Zheng, Z. Sheng, P. Zhang, Z. Wang, L. Cai, *ACS Nano* **2013**, 7, 2056–2067.
- [134] a) A. Kunzmann, B. Andersson, T. Thurnherr, H. Krug, A. Scheynius, B. Fadeel, *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, 1810, 361–373; b) M. A. Dobrovolskaia, S. E. McNeil, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, 2, 469–478; c) L. M. Bareford, P. W. Swaan, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, 59, 748–758; d) T. G. Iversen, T. Skotland, K. Sandvig, *Nano Today* **2011**, 6, 176–185.
- [135] S. D. Conner, S. L. Schmid, *Nature* **2003**, 422, 37–44.
- [136] R. A. Petros, J. M. DeSimone, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, 9, 615–627.
- [137] a) A. M. Wen, N. F. Steinmetz, *Adv. Healthcare Mater.* **2014**, DOI: 10.1002/adhm.201400141; b) H. Herd, N. Daum, A. T. Jones, H. Huwer, H. Ghandehari, C.-M. Lehr, *ACS Nano* **2013**, 7, 1961–1973; c) C. Huang, Y. Zhang, H. Yua, H. Gao, S. Zhang, *Nano Lett.* **2013**, 13, 4546–4550.
- [138] A. K. Gupta, M. Gupta, *Biomaterials* **2005**, 26, 1565–1573.
- [139] a) I. Raynal, P. Prigent, S. Peyramaure, A. Najid, C. Rebuzzi, C. Corot, *Invest. Radiol.* **2004**, 39, 56–63; b) G. Fleige, F. Seiberger, D. Laux, M. Kresse, M. Taupitz, H. Pilgrimm, C. Zimmer, *Invest. Radiol.* **2002**, 37, 482–488.
- [140] P. C. Patel, D. A. Giljohann, W. L. Daniel, D. Zheng, A. E. Prigodich, C. A. Mirkin, *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21, 2250–2256.
- [141] a) T. H. Chung, S. H. Wu, M. Yao, C. W. Lu, Y. S. Lin, Y. Hung, C. Y. Mou, Y. C. Chen, D. M. Huang, *Biomaterials* **2007**, 28, 2959–2966; b) Z. Tao, B. B. Toms, J. Goodisman, T. Asefa, *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, 22, 1869–1880.
- [142] B. D. Chithrani, W. C. W. Chan, *Nano Lett.* **2007**, 7, 1542–1550.
- [143] a) M. S. Cartiera, K. M. Johnson, V. Rajendran, M. J. Caplan, W. M. Saltzman, *Biomaterials* **2009**, 30, 2790–2798; b) L. Y. T. Chou, K. Ming, W. C. W. Chan, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 233–245.
- [144] G. Ruan, A. Agrawal, A. I. Marcus, S. M. Nie, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 14759–14766.
- [145] K. Ma, D. D. Wang, Y. Lin, J. Wang, V. Petrenko, C. Mao, *Adv. Funct. Mater.* **2013**, 23, 1172–1181.
- [146] a) F. Li, Z. P. Zhang, J. Peng, Z. Q. Cui, D. W. Pang, K. Li, H. P. Wei, Y. F. Zhou, J. K. Wen, X. E. Zhang, *Small* **2009**, 5, 718–726; b) S. Acharya, S. K. Sahoo, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2011**, 63, 170–183.
- [147] a) J. E. Fuller, G. T. Zugates, L. S. Ferreira, H. S. Ow, N. N. Nguyen, U. B. Wiesner, R. S. Langer, *Biomaterials* **2008**, 29, 1526–1532; b) M. V. Yezhelyev, L. Qi, R. M. O'Regan, S. M. Nie, X. H. Gao, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 9006–9012; c) Y. H. Li, J. Wang, M. G. Wientjes, J. L. S. Au, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, 64, 29–39.
- [148] H. Duan, S. M. Nie, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 3333–3338.
- [149] J. Panyam, W. Z. Zhou, S. Prabha, S. K. Sahoo, V. Labhasetwar, *FASEB J.* **2002**, 16, 1217–1226.

- [150] W. J. Li, F. Nicol, F. C. Szoka, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 967–985.
- [151] Y. C. Tseng, S. Mozumdar, L. Huang, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, *61*, 721–731.
- [152] K. Avgoustakis, A. Beletsi, Z. Panagi, P. Klepetsanis, A. G. Karydas, D. S. Ithakissios, *J. Controlled Release* **2002**, *79*, 123–135.
- [153] J. O. Martinez, C. Chiappini, A. Ziemys, A. M. Faust, M. Kojic, X. Liu, M. Ferrari, E. Tasciotti, *Biomaterials* **2013**, *34*, 8469–8477.
- [154] R. Krishna, L. D. Mayer, *Eur. J. Cancer Sci.* **2000**, *11*, 265–283.
- [155] a) Q. He, J. Shi, *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 391–411; b) M. Saraswathy, S. Gong, *Biotechnol. Adv.* **2013**, *31*, 1397–1407.
- [156] L. E. van Vlerken, Z. Duan, M. V. Seiden, M. M. Amiji, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 4843–4850.
- [157] Q. He, Y. Gao, L. Zhang, Z. Zhang, F. Gao, X. Ji, Y. Li, J. Shi, *Biomaterials* **2011**, *32*, 7711–7720.
- [158] X. Zhang, S. Guo, R. Fan, M. Yu, F. Li, C. Zhu, Y. Gan, *Biomaterials* **2012**, *33*, 7103–7114.
- [159] Y. Z. Zhao, D. D. Dai, C. T. Lu, L. J. Chen, M. Lin, X. T. Shen, X. K. Li, M. Zhang, X. Jiang, R. R. Jin, X. Li, H. F. Lv, L. Cai, P. T. Huang, *Cancer Lett.* **2013**, *330*, 74–83.
- [160] a) S. M. Nie, *Nanomedicine* **2010**, *5*, 523–528; b) C. Zhou, M. Long, Y. Qin, X. Sun, J. Zheng, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 3226–3230; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3168–3172.
- [161] C. Burda, X. Chen, R. Narayanan, M. A. El-Sayed, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1025–1102.
- [162] a) A. M. Derfus, W. C. W. Chan, S. N. Bhatia, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 11–18; b) R. Hardman, *Environ. Health Perspect.* **2006**, *114*, 165–172; c) M. C. Mancini, B. A. Kairdolf, A. M. Smith, S. M. Nie, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10836–10837; d) W. E. Smith, J. Brownell, C. C. White, Z. Afsharinejad, J. Tsai, X. H. Hu, S. J. Polyak, X. H. Gao, T. J. Kavanagh, D. L. Eaton, *ACS Nano* **2012**, *6*, 9475–9484.
- [163] a) X. H. Gao, L. Yang, J. A. Petros, F. F. Marshall, J. W. Simons, S. M. Nie, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 63–72; b) B. A. Kairdolf, A. M. Smith, T. H. Stokes, M. D. Wang, A. N. Young, S. M. Nie, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2013**, *6*, 143–162; c) C. E. Probst, P. Zrazhevskiy, V. Bagalkot, X. H. Gao, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2013**, *65*, 703–718.
- [164] J. Zhao, V. Castranova, *J. Toxicol. Environ. Health Part B* **2011**, *14*, 593–632.
- [165] M. Longmire, P. L. Choyke, H. Kobayashi, *Nanomedicine* **2008**, *3*, 703–717.
- [166] H. S. Choi, W. Liu, P. Misra, E. Tanaka, J. P. Zimmer, B. I. Ipe, M. G. Bawendi, J. V. Frangioni, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1165–1170.
- [167] a) R. P. Garay, R. El-Gewely, J. K. Armstrong, G. Garratty, P. Richette, *Expert Opin. Drug Delivery* **2012**, *9*, 1319–1323; b) T. Shimizu, M. Ichihara, Y. Yoshioka, T. Ishida, S. Nakagawa, H. Kiwada, *Biol. Pharm. Bull.* **2012**, *35*, 1336–1342.
- [168] H. Kettiger, A. Schipanski, P. Wick, J. Huwyler, *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 3255–3269.
- [169] A. Albanese, P. S. Tang, W. C. W. Chan, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2012**, *14*, 1–16.
- [170] J. W. Yoo, C. Elizabeth, M. Samir, *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *16*, 2298–2307.
- [171] a) H. Maeda, *Adv. Enzyme Regul.* **2001**, *41*, 189–207; b) H. Maeda, H. Nakamura, J. Fang, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2013**, *65*, 71–79.
- [172] S. D. Perrault, W. C. W. Chan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 11194–11199.
- [173] K. Matsumoto, T. Yamamoto, R. Kamata, H. Maeda, *J. Biochem.* **1984**, *96*, 739–749.
- [174] G. Bergers, L. E. Benjamin, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 401–410.
- [175] H. Hashizume, P. Baluk, S. Morikawa, J. W. McLean, G. Thurston, S. Roberge, R. K. Jain, D. M. McDonald, *Am. J. Pathol.* **2000**, *156*, 1363–1380.
- [176] D. F. Baban, L. W. Seymour, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1998**, *34*, 109–119.
- [177] B. Haley, E. Frenkel, *Urol. Oncol. Semin. Orig. Invest.* **2008**, *26*, 57–64.
- [178] F. Yuan, M. Dellian, D. Fukumura, M. Leunig, D. A. Berk, V. P. Torchilin, R. K. Jain, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 3752–3756.
- [179] R. K. Jain, T. Stylianopoulos, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2010**, *7*, 653–664.
- [180] R. K. Jain, *Cancer Res.* **1987**, *47*, 3039–3051.
- [181] C. H. Heldin, K. Rubin, K. Pietras, A. Ostman, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 806–813.
- [182] M. Caldorera-Moore, N. Guimard, L. Shi, K. Roy, *Expert Opin. Drug Delivery* **2010**, *7*, 479–495.
- [183] P. Decuzzi, S. Lee, B. Bhushan, M. Ferrari, *Ann. Biomed. Eng.* **2005**, *33*, 179–190.
- [184] a) P. Decuzzi, R. Pasqualini, W. Arap, M. Ferrari, *Pharm. Res.* **2009**, *26*, 235–243; b) Y. Geng, P. Dalhaimer, S. Cai, R. Tsai, M. Tewari, T. Minko, D. E. Discher, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 249–255.
- [185] a) M. D. Blanco, C. Teijón, R. Olmo, J. M. Teijón, *Targeted Nanoparticles for Cancer Therapy*, **2012**; b) V. Bagalkot, X. H. Gao, *ACS Nano* **2011**, *5*, 8131–8139; c) Y. C. Wang, J. B. Xu, X. H. Xia, M. X. Yang, S. Vangveravong, J. Y. Chen, R. H. Mach, Y. Xia, *Nanoscale* **2012**, *4*, 421–424; d) T. M. Sun, Y. Wang, Y. C. Wang, J. B. Xu, X. Zhao, S. Vangveravong, R. H. Mach, Y. Xia, *Adv. Healthcare Mater.* **2014**, *3*, 1283–1291.
- [186] A. Nori, K. D. Jensen, M. Tijerina, P. Kopeckova, J. Kopecek, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 44–50.
- [187] a) K. F. Pirollo, E. H. Chang, *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 552–558; b) O. C. Farokhzad, R. Langer, *ACS Nano* **2009**, *3*, 16–20.
- [188] a) A. Verma, O. Uzun, Y. Hu, Y. Hu, H. S. Han, N. Watson, S. Chen, D. J. Irvine, F. Stellacci, *Nat. Mater.* **2008**, *7*, 588–595; b) 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.
- [189] D. B. Kirpotin, D. C. Drummond, Y. Shao, M. R. Shalaby, K. Hong, U. B. Nielsen, J. D. Marks, C. C. Benz, J. W. Park, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 6732–6740.
- [190] a) D. W. Bartlett, H. Su, I. J. Hildebrandt, W. A. Weber, M. E. Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 15549–15554; b) O. C. Farokhzad, J. Cheng, B. A. Teply, I. Sherifi, S. Jon, P. W. Kantoff, J. P. Richie, R. Langer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 6315–6320.
- [191] a) K. de Bruin, N. Ruthardt, K. von Gersdorff, R. Bausinger, E. Wagner, M. Ogris, C. Brauchle, *Mol. Ther.* **2007**, *15*, 1297–1305; b) A. R. Hilgenbrink, P. S. Low, *J. Pharm. Sci.* **2005**, *94*, 2135–2146; c) T. R. Daniels, T. Delgado, J. A. Rodriguez, G. Helguera, M. L. Penichet, *Clin. Immunol.* **2006**, *121*, 144–158; d) C. R. Dass, P. F. M. Choong, *J. Controlled Release* **2006**, *113*, 155–163.
- [192] D. Neri, R. Bicknell, *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 436–446.
- [193] B. Ballou, L. A. Ernst, S. Andreko, T. Harper, J. A. J. Fitzpatrick, A. S. Waggoner, M. P. Bruchez, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 389–396.
- [194] a) R. Gref, M. Lück, P. Quellec, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnisch, T. Blunk, R. H. Müller, *Colloids Surf. B* **2000**, *18*, 301–313; b) T. Cedervall, I. Lynch, M. Foy, T. Berggård, S. C. Donnelly, G. Cagney, S. Linse, K. A. Dawson, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5856–5858; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5754–5756; c) M. Lundqvist, J. Stigler, G. Elia, I. Lynch, T. Cedervall, K. A. Dawson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 14265–14270.

- [195] T. Cedervall, I. Lynch, S. Lindman, T. Berggård, E. Thulin, H. Nilsson, K. A. Dawson, S. Linse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 2050–2055.
- [196] a) A. Gessner, A. Lieske, B. R. Paulke, R. H. Müller, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2002**, *54*, 165–170; b) A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, J. P. Benoit, *Biomaterials* **2006**, *27*, 4356–4373; c) M. Lück, B. R. Paulke, W. Schröder, T. Blunk, R. H. Müller, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **1998**, *39*, 478–485.
- [197] S. M. Moghimi, J. Szebeni, *Prog. Lipid Res.* **2003**, *42*, 463–478.
- [198] E. Kuntz, H.-D. Kuntz, *Hepatology Principles and Practice: History, Morphology, Biochemistry Diagnostics, Clinic, Therapy*, Vol. 3, Springer, Berlin/Heidelberg, **2006**.
- [199] S. M. Moghimi, A. C. Hunter, J. C. Murray, *Pharm. Rev.* **2001**, *53*, 283–318.
- [200] S. M. Moghimi, I. S. Muir, L. Illum, S. S. Davis, V. Kolb-Bachofen, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1993**, *1179*, 157–165.
- [201] W. C. Zamboni, V. Torchilin, A. K. Patri, J. Hrkach, S. Stern, R. Lee, A. Nel, N. J. Panaro, P. Grodzinski, *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 3229–3241.
- [202] S. W. Jones, R. A. Roberts, G. R. Robbins, J. L. Perry, M. P. Kai, K. Chen, T. Bo, M. E. Napier, J. P. Y. Ting, J. M. DeSimone, J. E. Bear, *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 3061–3073.
- [203] W. M. Deen, M. J. Lazzara, B. D. Myers, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2001**, *281*, F579–F596.
- [204] M. Ohlson, J. Sörensson, B. Haraldsson, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2001**, *280*, F396–F405.
- [205] J. I. Johnson, S. Decker, D. Zaharevitz, L. V. Rubinstein, J. M. Venditti, S. Schepartz, S. Kalyandrug, M. Christian, S. Arbut, M. Hollingshead, E. A. Sausville, *Br. J. Cancer* **2001**, *84*, 1424–1431.
- [206] a) D. C. Drummond, O. Meyer, K. Hong, D. B. Kirpotin, D. Papahadjopoulos, *Pharmacol. Rev.* **1999**, *51*, 691–744; b) D. C. Litzinger, A. M. J. Buiting, N. van Rooijen, L. Huang, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1994**, *1190*, 99–107.
- [207] N. La-Beck, B. Zamboni, A. Gabizon, H. Schmeeda, M. Amantea, P. Gehrig, W. Zamboni, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2012**, *69*, 43–50.
- [208] H. Wu, R. K. Ramanathan, B. A. Zamboni, S. Strychor, S. Ramalingam, R. P. Edwards, D. M. Friedland, R. G. Stoller, C. P. Belani, L. J. Maruca, Y. J. Bang, W. C. Zamboni, *J. Clin. Pharmacol.* **2012**, *52*, 180–194.
- [209] E. C. Dreaden, A. M. Alkilany, X. Huang, C. J. Murphy, M. A. El-Sayed, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2740–2779.
- [210] L. Minai, D. Yeheskely-Hayon, D. Yelin, *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 2146.
- [211] D. S. Kohane, R. Langer, *Chem. Sci.* **2010**, *1*, 441–446.
- [212] S. Naahidi, M. Jafari, F. Edalat, K. Raymond, A. Khademhosseini, P. Chen, *J. Controlled Release* **2013**, *166*, 182–194.
- [213] a) M. Mahmoudi, H. Hofmann, B. Rothen-Rutishauser, A. Petri-Fink, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2323–2338; b) S. A. Love, M. A. Maurer-Jones, J. W. Thompson, Y. S. Lin, C. L. Haynes, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2012**, *5*, 181–205; c) A. Elsaesser, C. V. Howard, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, *64*, 129–137.
- [214] M. Chidambaram, K. Krishnasamy, *Int. J. Pharm. Sci.* **2012**, *2*, 117–122.
- [215] A. Alkilany, C. Murphy, *J. Nanopart. Res.* **2010**, *12*, 2313–2333.
- [216] a) P. Monica, M. Dana, A. Simion, *Nanotechnology* **2009**, *20*, 315602; b) A. M. Awwad, N. M. Salem, A. O. Abdeen, *Int. J. Ind. Chem.* **2013**, *4*, 1–6; c) C. Wang, Y. Jiang, L. Chen, S. Li, G. Li, Z. Zhang, *Mater. Chem. Phys.* **2009**, *116*, 388–391.
- [217] a) K. Nagpal, S. K. Singh, D. N. Mishra, *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, *58*, 1423–1430; b) R. C. Mundargi, V. R. Babu, V. Rangaswamy, P. Patel, T. M. Aminabhavi, *J. Controlled Release* **2008**, *125*, 193–209; c) E. Leo, B. Brina, F. Forni, M. A. Vandel, *Int. J. Pharm.* **2004**, *278*, 133–141.
- [218] A. Mahapatro, D. K. Singh, *J. Nanobiotechnol.* **2011**, *9*, 55.
- [219] a) E. C. Dreaden, A. M. Alkilany, X. Huang, C. J. Murphy, M. A. El-Sayed, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2740–2779; b) X. H. Xia, Y. Xia, *Front. Phys.* **2014**, *9*, 378–384.
- [220] A. M. Schrand, M. F. Rahman, S. M. Hussain, J. J. Schlager, D. A. Smith, A. F. Syed, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2010**, *2*, 544–568.
- [221] J. M. Tam, J. O. Tam, A. Murthy, D. R. Ingram, L. L. Ma, K. Travis, K. P. Johnston, K. V. Sokolov, *ACS Nano* **2010**, *4*, 2178–2184.
- [222] a) A. I. Minchinton, I. F. Tannock, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 583–592; b) M. R. Dreher, W. Liu, C. R. Michelich, M. W. Dewhirst, F. Yuan, A. Chilkoti, *J. Natl. Cancer Inst.* **2006**, *98*, 335–344.
- [223] a) A. E. Nel, L. Madler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, M. Thompson, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 543–557; b) M. A. Dobrovolskaia, S. E. McNeil, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 469–478.
- [224] a) H. Jatzkewitz, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1954**, *297*, 149–156; b) H. Jatzkewitz, *Z. Naturforsch. B* **1955**, *10*, 27–31.
- [225] a) K. O. Doh, Y. Yeo, *Ther. Delivery* **2013**, *3*, 1447–1456; b) F. Alexis, E. Pridgen, L. K. Molnar, O. C. Farokhzad, *Mol. Pharmaceutics* **2008**, *5*, 505–515.
- [226] A. O. Elzoghby, *J. Controlled Release* **2013**, *172*, 1075–1091.
- [227] a) D. J. Gan, L. A. Lyon, *Macromolecules* **2002**, *35*, 9634–9639; b) M. A. Dobrovolskaia, D. R. Germolec, J. L. Weaver, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 411–414.
- [228] a) V. J. Mohanraj, Y. Chen, *Trop. J. Pharm. Res.* **2006**, *5*, 561–573; b) N. Kamaly, Z. Xiao, P. M. Valencia, A. F. Radovic-Moreno, O. C. Farokhzad, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2971–3010; c) X. H. Xia, M. X. Yang, Y. C. Wang, Y. Q. Zheng, Q. G. Li, J. Y. Chen, Y. Xia, *ACS Nano* **2012**, *6*, 512–522.
- [229] a) L. Seymour, R. Duncan, J. Strohalm, J. Kopecek, *J. Biomed. Mater. Res.* **1987**, *21*, 1341–1358; b) J. Panyam, V. Labhasetwar, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, *55*, 329–347.
- [230] M. P. Desai, V. Labhasetwar, E. Walter, R. J. Levy, G. L. Amidon, *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 1568–1573.
- [231] M. P. Desai, V. Labhasetwar, G. L. Amidon, R. J. Levy, *Pharm. Res.* **1996**, *13*, 1838–1845.
- [232] R. A. Kroll, M. A. Pagel, L. L. Muldoon, S. Roman-Goldstein, S. A. Fiamengo, E. A. Neuwelt, *Neurosurgery* **1998**, *43*, 879–886.
- [233] a) J. Kreuter, P. Ramge, V. Petrov, S. Hamm, S. E. Gelperina, B. Engelhardt, R. Alyautdin, H. von Briesen, D. J. Begley, *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 409–416; b) Y. S. Yim, J. Choi, G. T. Kim, C. H. Kim, T. H. Shin, D. G. Kim, J. Cheon, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 61–63.
- [234] W. Zauner, N. A. Farrow, A. M. Haines, *J. Controlled Release* **2001**, *71*, 39–51.
- [235] R. Vácha, F. J. Martinez-Veracoechea, D. Frenkel, *Nano Lett.* **2011**, *11*, 5391–5395.
- [236] B. J. Reynwar, G. Illya, V. A. Harmandaris, M. M. Muller, K. Kremer, M. Deserno, *Nature* **2007**, *447*, 461–464.
- [237] K. Yang, Y. Q. Ma, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 579–583.
- [238] a) J. M. Harris, N. E. Martin, M. Modi, *Clin. Pharmacokinet.* **2001**, *40*, 539–551; b) M. L. Adams, A. Lavasanifar, G. S. Kwon, *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92*, 1343–1355.
- [239] M. Elsaybahy, K. L. Wooley, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2545–2561.
- [240] P. Couvreur, G. Barratt, E. Fattal, P. Legrand, C. Vauthier, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2002**, *19*, 99–134.
- [241] a) M. E. Davis, Z. G. Chen, D. M. Shin, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2008**, *7*, 771–782; b) J. Jang, S. Jeong, J. W. Seo, M. C. Kim, E. Sim, Y. Oh, S. Nam, B. Park, J. Cheon, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7636–7639.
- [242] a) A. Abuchowski, J. R. McCoy, N. C. Palczuk, T. van Es, F. F. Davis, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 3582–3586; b) A. Abuchowski,

- T. van Es, N. C. Palczuk, F. F. Davis, *J. Biol. Chem.* **1977**, 252, 3578–3581.
- [243] A. L. Klibanov, K. Maruyama, V. P. Torchilin, L. Huang, *FEBS Lett.* **1990**, 268, 235–237.
- [244] S. W. Lee, M. H. Yun, S. W. Jeong, C. H. In, J. Y. Kim, M. H. Seo, C. M. Pai, S. O. Kim, *J. Controlled Release* **2011**, 155, 262–271.
- [245] J. N. Zheng, H. G. Xie, W. T. Yu, X. D. Liu, W. Y. Xie, J. Zhu, X. J. Ma, *Langmuir* **2010**, 26, 17156–17164.
- [246] H. Du, P. Chandaroy, S. W. Hui, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1997**, 1326, 236–248.
- [247] a) R. L. Hong, C. J. Huang, Y. L. Tseng, V. F. Pang, S. T. Chen, J. J. Liu, F. H. Chang, *Clin. Cancer Res.* **1999**, 5, 3645–3652; b) J. Cui, C. Li, W. Guo, Y. Li, C. Wang, L. Zhang, L. Zhang, Y. Hao, Y. Wang, *J. Controlled Release* **2007**, 118, 204–215.
- [248] H. Hatakeyama, H. Akita, H. Harashima, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2011**, 63, 152–160.
- [249] J. Lehtinen, A. Magarkar, M. Stepniewski, S. Hakola, M. Bergman, T. Rog, M. Yliperttula, A. Urtti, A. Bunker, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, 46, 121–130.
- [250] a) K. Remaut, B. Lucas, K. Braeckmans, J. Demeester, S. C. De Smedt, *J. Controlled Release* **2007**, 117, 256–266; b) S. Mishra, P. Webster, M. E. Davis, *Eur. J. Cell Biol.* **2004**, 83, 97–111.
- [251] Z. Amoozgar, Y. Yeo, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2012**, 4, 219–233.
- [252] a) Z. Liu, Y. Jiao, Y. Wang, C. Zhou, Z. Zhang, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, 60, 1650–1662; b) T. Coviello, P. Matricardi, F. Alhaique, *Expert Opin. Drug Delivery* **2006**, 3, 395–404.
- [253] a) C. Passirani, G. Barratt, J. P. Devissaguet, D. Labarre, *Life Sci.* **1998**, 62, 775–785; b) C. Passirani, G. Barratt, J. P. Devissaguet, D. Labarre, *Pharm. Res.* **1998**, 15, 1046–1050.
- [254] a) J. Li, M. Huo, J. Wang, J. Zhou, J. M. Mohammad, Y. Zhang, Q. Zhu, A. Y. Waddad, Q. Zhang, *Biomaterials* **2012**, 33, 2310–2320; b) Z. X. Yuan, Z. R. Zhang, D. Zhu, X. Sun, T. Gong, J. Liu, C. T. Luan, *Mol. Pharmaceutics* **2009**, 6, 305–314; c) I. Rivkin, K. Cohen, J. Koffler, D. Melikhov, D. Peer, R. Margalit, *Biomaterials* **2010**, 31, 7106–7114; d) G. Jiang, K. Park, J. Kim, K. S. Kim, E. J. Oh, H. Kang, S. E. Han, Y. K. Oh, T. G. Park, S. K. Hahn, *Biopolymers* **2008**, 89, 635–642.
- [255] a) F. Shamsipour, A. H. Zarnani, R. Ghods, M. Chamankhah, F. Forouzesh, S. Vafaei, A. A. Bayar, M. M. Akhondi, M. A. Oghabian, M. Jeddi-Tehrani, *Avicenna J. Med. Biotechnol.* **2009**, 1, 27–31; b) M. Mahmoudi, S. Sant, B. Wang, S. Laurent, T. Sen, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2011**, 63, 24–46.
- [256] a) H. Tada, H. Higuchi, T. M. Wanatabe, N. Ohuchi, *Cancer Res.* **2007**, 67, 1138–1144; b) X. Wu, H. Liu, J. Liu, K. N. Haley, J. A. Treadway, J. P. Larson, N. Ge, F. Peale, M. P. Bruchez, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 21, 41–46.
- [257] J. W. Park, K. Hong, D. B. Colbern, R. Shalaby, J. Baselga, Y. Shao, U. B. Nielsen, J. D. Marks, D. Moore, D. Papahadjopoulos, C. C. Benz, *Clin. Cancer Res.* **2002**, 8, 1172–1181.
- [258] J. Y. Chen, D. L. Wang, J. F. Xi, L. Au, A. Siekkinen, A. Warsen, Z. Y. Li, H. Zhang, Y. N. Xia, X. D. Li, *Nano Lett.* **2007**, 7, 1318–1322.
- [259] a) W. Tai, R. Mahato, K. Cheng, *J. Controlled Release* **2010**, 146, 264–275; b) S. B. Uppada, T. Erickson, L. Wojdyla, D. N. Moravec, Z. Song, J. J. Cheng, N. Puri, *Int. J. Nanomed.* **2014**, 9, 43–53.
- [260] a) E. Ruoslahti, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1996**, 12, 697–715; b) R. R. Hantgan, M. C. Stahle, J. H. Connor, D. A. Horita, M. Rocco, M. A. McLane, S. Yakovlev, L. Medved, *Protein Sci.* **2006**, 15, 1893–1906.
- [261] C. Zhang, M. Jugold, E. C. Woenne, T. Lammers, *Cancer Res.* **2007**, 67, 1555–1562.
- [262] E. W. Orava, N. Cicmil, J. Gariepy, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2010**, 1798, 2190–2200.
- [263] C. M. Cobley, L. Au, J. Y. Chen, Y. Xia, *Expert Opin. Drug Delivery* **2010**, 7, 577–587.
- [264] D. S. Lidke, P. Nagy, R. Heintzmann, D. J. Arndt-Jovin, J. N. Post, H. E. Grecco, E. A. Jaras-Erijman, T. M. Jovin, *Nat. Biotechnol.* **2004**, 22, 198–203.
- [265] Z. M. Qian, H. Li, H. Sun, K. Ho, *Pharmacol. Rev.* **2002**, 54, 561–587.
- [266] a) T. Govender, T. Riley, T. Ehtezazi, M. C. Garnett, S. Stolnik, L. Illum, S. S. Davis, *Int. J. Pharm.* **2000**, 199, 95–110; b) T. Govender, S. Stolnik, M. C. Garnett, L. Illum, S. S. Davis, *J. Controlled Release* **1999**, 57, 171–185; c) J. Panyam, D. Williams, A. Dash, D. Leslie-Pelecky, V. Labhasetwar, *J. Pharm. Sci.* **2004**, 93, 1804–1814.
- [267] Y. Chen, V. J. Mohanraj, J. E. Parkin, *Lett. Pept. Sci.* **2003**, 10, 621–629.
- [268] a) L. A. Dailey, N. Jekel, L. Fink, T. Gessler, T. Schmehl, M. Wittmar, T. Kissel, W. Seeger, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2006**, 215, 100–108; b) R. Pandey, A. Sharma, A. Zahoor, S. Sharma, G. K. Khuller, B. Prasad, *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, 52, 981–986.
- [269] T. M. Allen, P. R. Cullis, *Science* **2004**, 303, 1818–1822.
- [270] a) S. Ornes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, 110, 13695; b) L. Ducry, *Antibody-Drug Conjugates*, Humana Press, **2013**; c) R. S. Zolot, S. Basu, R. P. Million, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2013**, 12, 259–260.
- [271] S. C. Alley, N. M. Okeley, P. D. Senter, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, 14, 529–537.
- [272] P. D. Senter, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, 13, 235–244.
- [273] a) S. C. Alley, D. R. Benjamin, S. C. Jeffrey, N. M. Okeley, D. L. Meyer, R. J. Sanderson, P. D. Senter, *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 759–765; b) R. J. Sanderson, M. A. Hering, S. F. James, M. M. C. Sun, S. O. Doronina, A. W. Siadak, P. D. Senter, A. F. Wahl, *Clin. Cancer Res.* **2005**, 11, 843–852; c) G. D. L. Phillips, G. Li, D. L. Dugger, L. M. Crocker, K. L. Parsons, E. Mai, W. A. Blättler, J. M. Lambert, R. V. J. Chari, R. J. Lutz, W. L. T. Wong, F. S. Jacobson, H. Koeppe, R. H. Schwall, S. R. Kenkare-Mitra, S. D. Spencer, M. X. Sliwowski, *Cancer Res.* **2008**, 68, 9280–9290.
- [274] B. Hughes, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, 9, 665–667.
- [275] L. Q. Pan, H. B. Wang, Z. M. Xie, Z. H. Li, X. J. Tang, Y. C. Xu, C. Zhang, H. Naranmandura, S. Q. Chen, *Adv. Mater.* **2013**, 25, 4718–4722.
- [276] a) G. Pan, K. O'Rourke, A. M. Chinnaiyan, R. Gentz, R. Ebner, J. Ni, V. M. Dixit, *Science* **1997**, 276, 111–113; b) J. P. Sheridan, S. A. Marsters, R. M. Pitti, A. Gurney, M. Skubatch, D. Baldwin, L. Ramakrishnan, C. L. Gray, K. Baker, W. I. Wood, *Science* **1997**, 277, 818–821; c) G. Pan, J. Ni, Y. F. Wei, G. L. Yu, R. Gentz, V. M. Dixit, *Science* **1997**, 277, 815–818.
- [277] a) A. D. Sanlioglu, E. Dirice, C. Aydin, N. Erin, S. Koksoy, S. Sanlioglu, *BMC Cancer* **2005**, 5, 54; b) L. Zhang, B. Fang, *Cancer Gene Ther.* **2005**, 12, 228–237.
- [278] S. O. Doronina, B. E. Toki, M. Y. Torgov, B. A. Mendelsohn, C. G. Cervený, D. F. Chace, R. L. DeBlanc, R. P. Gearing, T. D. Bovee, C. B. Siegall, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 778–784.
- [279] T. Nomura, N. Katunuma, *J. Med. Invest.* **2005**, 52, 1–9.
- [280] a) G. Gregoriadis, *Trends Biotechnol.* **1995**, 13, 527–537; b) A. Sharma, U. S. Sharma, *Int. J. Pharm.* **1997**, 154, 123–140; c) Y. Malam, M. Loizidou, A. M. Seifalian, *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, 30, 592–599.
- [281] a) A. D. Bangham, M. M. Standish, J. C. Watkins, *J. Mol. Biol.* **1965**, 13, 227–238; b) G. Gregoriadis, *N. Engl. J. Med.* **1976**, 295, 765–770; c) G. Gregoriadis, *N. Engl. J. Med.* **1976**, 295, 704–710.

- [282] a) S. B. Kulkarni, G. V. Betageri, M. Singh, *J. Microencapsulation* **1995**, *12*, 229–246; b) T. Nii, F. Ishii, *Int. J. Pharm.* **2005**, *298*, 198–205.
- [283] M. Yokoyama, A. Satoh, Y. Sakurai, T. Okano, Y. Matsumura, T. Kakizoe, K. Kataoka, *J. Controlled Release* **1998**, *55*, 219–229.
- [284] a) S. Clerc, Y. Barenholz, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1995**, *1240*, 257–265; b) D. Zucker, D. Marcus, Y. Barenholz, A. Goldblum, *J. Controlled Release* **2009**, *139*, 73–80.
- [285] a) L. D. Mayer, L. C. L. Tai, M. B. Bally, G. N. Mitilenes, R. S. Ginsberg, P. R. Cullis, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1990**, *1025*, 143–151; b) X. Li, D. J. Hirsh, D. Cabral-Lilly, A. Zirkel, S. M. Gruner, A. S. Janoff, W. R. Perkins, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1998**, *1415*, 23–40; c) A. Fritze, F. Hens, A. Kimpfler, R. Schubert, R. Peschka-Süss, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2006**, *1758*, 1633–1640.
- [286] R. Mo, Q. Sun, J. Xue, N. Li, W. Li, C. Zhang, Q. Ping, *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 3705–3705.
- [287] a) K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, A. R. Kulkarni, W. E. Rudzinski, *J. Controlled Release* **2001**, *70*, 1–20; b) J. Panyam, V. Labhasetwar, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, *64*, 61–71; c) X. X. Xia, Q. B. Xu, X. Hu, G. K. Qin, D. L. Kaplan, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3844–3850; d) Q. Yin, F. Y. Yap, L. C. Yin, L. Ma, Q. Zhou, L. W. Dobrucki, T. M. Fan, R. C. Gaba, J. J. Cheng, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 13620–13623.
- [288] R. A. Jain, *Biomaterials* **2000**, *21*, 2475–2490.
- [289] a) C. X. Song, V. Labhasetwar, H. Murphy, X. Qu, W. R. Humphrey, R. J. Shebuski, R. J. Levy, *J. Controlled Release* **1997**, *43*, 197–212; b) C. Fonseca, S. Simões, R. Gaspar, *J. Controlled Release* **2002**, *83*, 273–286; c) L. Mu, S. S. Feng, *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 1864–1872.
- [290] a) S. W. Choi, Y. Zhang, Y. Xia, *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 2943–2949; b) E. Cohen-Sela, M. Chorny, N. Koroukhov, H. D. Danenberg, G. Golomb, *J. Controlled Release* **2009**, *133*, 90–95.
- [291] T. M. Sun, J. Z. Du, Y. D. Yao, C. Q. Mao, S. Dou, S. Y. Huang, P. Z. Zhang, K. W. Leong, E. W. Song, J. Wang, *ACS Nano* **2011**, *5*, 1483–1494.
- [292] a) G. Ellison, T. Klinowska, R. F. R. Westwood, E. Docter, T. French, J. C. Fox, *Mol. Pathol.* **2002**, *55*, 294–299; b) J. Rae, C. Creighton, J. Meck, B. Haddad, M. Johnson, *Breast Cancer Res. Treat.* **2007**, *104*, 13–19.
- [293] a) J. Xu, J. C. Luft, X. Yi, S. Tian, G. Owens, J. Wang, A. Johnson, P. Berglund, J. Smith, M. E. Napier, J. M. DeSimone, *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 3366–3374; b) J. L. Perry, K. G. Reuter, M. P. Kai, K. P. Herlihy, S. W. Jones, J. C. Luft, M. Napier, J. E. Bear, J. M. DeSimone, *Nano Lett.* **2012**, *12*, 5304–5310.
- [294] a) J. Champion, A. Walker, S. Mitragotri, *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 1815–1821; b) J. A. Champion, Y. K. Katore, S. Mitragotri, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 11901–11904; c) S. Zhang, J. Li, G. Lykotrafitis, G. Bao, S. Suresh, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 419–424; d) J. Champion, S. Mitragotri, *Pharm. Res.* **2009**, *26*, 244–249; e) J. L. Perry, K. P. Herlihy, M. E. Napier, J. M. DeSimone, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 990–998.
- [295] L. Zhang, J. M. Chan, F. X. Gu, J. W. Rhee, A. Z. Wang, A. F. Radovic-Moreno, F. Alexis, R. Langer, O. C. Farokhzad, *ACS Nano* **2008**, *2*, 1696–1702.
- [296] a) A. K. Patri, I. J. Majoros, J. R. Baker, Jr., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 466–471; b) E. R. Gillies, J. M. J. Fréchet, *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 35–43; c) B. K. Nanjwade, H. M. Bechra, G. K. Derkar, F. V. Manvi, V. K. Nanjwade, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2009**, *38*, 185–196.
- [297] S. Svenson, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *71*, 445–462.
- [298] Y. Cheng, J. Wang, T. Rao, X. He, T. Xu, *Front. Biosci.* **2008**, *13*, 1447–1471.
- [299] D. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, *Polym. J.* **1985**, *17*, 117–132.
- [300] O. Taratula, O. B. Garbuzenko, P. Kirkpatrick, I. Pandya, R. Savla, V. P. Pozharov, T. Minko, *J. Controlled Release* **2009**, *140*, 284–293.
- [301] a) N. A. Peppas, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1997**, *2*, 531–537; b) M. Hamidi, A. Azadi, P. Rafiei, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 1638–1649; c) T. R. Hoare, D. S. Kohane, *Polymer* **2008**, *49*, 1993–2007.
- [302] J. K. Oh, D. I. Lee, J. M. Park, *Prog. Polym. Sci.* **2009**, *34*, 1261–1282.
- [303] M. R. Kumar, R. A. Muzzarelli, C. Muzzarelli, H. Sashiwa, A. Domb, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 6017–6084.
- [304] O. Smidsrød, G. Skjak-Brk, *Trends Biotechnol.* **1990**, *8*, 71–78.
- [305] C. Mueller, J.-Y. Zhou, *Methods Cell Sci.* **1994**, *16*, 183–188.
- [306] Y. Qiu, K. Park, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *53*, 321–339.
- [307] a) A. V. Kabanov, S. V. Vinogradov, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5524–5536; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5418–5429; b) J. K. Oh, R. Drumright, D. J. Siegwart, K. Matyjaszewski, *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33*, 448–477; c) J. K. Oh, D. J. Siegwart, H. Lee, G. Sherwood, L. Peteanu, J. O. Hollinger, K. Kataoka, K. Matyjaszewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5939–5945; d) S. V. Vinogradov, T. K. Bronich, A. V. Kabanov, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 135–147.
- [308] J. Z. Du, T. M. Sun, W. J. Song, J. Wu, J. Wang, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3703–3708; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3621–3626.
- [309] a) S. W. Choi, Y. Zhang, Y. Xia, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 8076–8080; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7904–7908; b) D. C. Hyun, N. S. Levinson, U. Jeong, Y. Xia, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3780–3795; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 3854–3871.
- [310] H. Vihola, A. Laukkanen, L. Valtola, H. Tenhu, J. Hirvonen, *Biomaterials* **2005**, *26*, 3055–3064.
- [311] G. D. Moon, S. W. Choi, X. Cai, W. Li, E. C. Cho, U. Jeong, L. V. Wang, Y. Xia, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4762–4765.
- [312] C. Kresge, M. Leonowicz, W. Roth, J. Vartuli, J. Beck, *Nature* **1992**, *359*, 710–712.
- [313] a) S. Giri, B. G. Trewyn, V. S. Lin, *Nanomedicine* **2007**, *2*, 99–111; b) I. I. Slowing, B. G. Trewyn, S. Giri, V. Y. Lin, *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 1225–1236; c) I. I. Slowing, J. L. Vivero-Escoto, C. W. Wu, V. S. Y. Lin, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 1278–1288; d) J. L. Vivero-Escoto, I. I. Slowing, B. G. Trewyn, V. S. Y. Lin, *Small* **2010**, *6*, 1952–1967.
- [314] a) R. P. Feazell, N. Nakayama-Ratchford, H. Dai, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8438–8439; b) Z. Liu, K. Chen, C. Davis, S. Sherlock, Q. Cao, X. Chen, H. Dai, *Cancer Res.* **2008**, *68*, 6652–6660.
- [315] a) N. W. S. Kam, H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6021–6026; b) A. Bianco, K. Kostarelos, M. Prato, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 674–679.
- [316] Y. Liu, D.-C. Wu, W.-D. Zhang, X. Jiang, C.-B. He, T. S. Chung, S. H. Goh, K. W. Leong, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4860–4863; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4782–4785.
- [317] N. W. S. Kam, Z. Liu, H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12492–12493.
- [318] Z. Liu, S. Tabakman, K. Welscher, H. Dai, *Nano Res.* **2009**, *2*, 85–120.
- [319] N. W. S. Kam, M. O’Connell, J. A. Wisdom, H. Dai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 11600–11605.
- [320] a) K. Welscher, Z. Liu, D. Daranciang, H. Dai, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 586–590; b) A. de La Zerda, C. Zavaleta, S. Keren, S. Vaitilingam, S. Bodapati, Z. Liu, J. Levi, B. R. Smith, T. J. Ma, O. Oralkan, Z. Cheng, X. Chen, H. Dai, B. T. Khuri-Yakub, S. S. Gambhir, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 57–62.
- [321] A. Rao, E. Richter, S. Bandow, B. Chase, P. Eklund, K. Williams, S. Fang, K. Subbaswamy, M. Menon, A. Thess, *Science* **1997**, *275*, 187–191.
- [322] a) J. Zheng, C. Zhang, R. M. Dickson, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *93*, 077402; b) C. A. J. Lin, T. Y. Yang, C. H. Lee, S. H. Huang,

- R. A. Sperling, M. Zanella, J. K. Li, J. L. Shen, H. H. Wang, H. I. Yeh, W. J. Parak, W. H. Chang, *ACS Nano* **2009**, *3*, 395–401.
- [323] a) H. Wang, T. B. Huff, D. A. Zweifel, W. He, P. S. Low, A. Wei, J. X. Cheng, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 15752–15756; b) L. Au, Q. Zhang, C. M. Cobley, M. Gidding, A. G. Schwartz, J. Y. Chen, Y. Xia, *ACS Nano* **2010**, *4*, 35–42; c) L. Tong, C. M. Cobley, J. Y. Chen, Y. Xia, J. X. Cheng, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3563–3566; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3485–3488; d) A. Srivatsan, S. V. Jenkins, M. Jeon, Z. J. Wu, C. Kim, J. Y. Chen, R. K. Pandey, *Theranostics* **2014**, *4*, 163–174.
- [324] J. Yang, J. Lee, J. Kang, S. J. Oh, H. J. Ko, J. H. Son, K. Lee, J. S. Suh, Y. M. Huh, S. Haam, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 4339–4342.
- [325] H. Cang, T. Sun, Z. Y. Li, J. Y. Chen, B. J. Wiley, Y. Xia, X. N. Li, *Opt. Lett.* **2005**, *30*, 3048–3050.
- [326] Y. Zhang, Y. Wang, L. Wang, Y. Wang, X. Cai, C. Zhang, L. V. Wang, Y. Xia, *Theranostics* **2013**, *3*, 532–543.
- [327] C. Kim, E. C. Cho, J. Y. Chen, K. H. Song, L. Au, C. Favazza, Q. Zhang, C. M. Cobley, F. Gao, Y. Xia, L. V. Wang, *ACS Nano* **2010**, *4*, 4559–4564.
- [328] M. Rycenga, K. K. Hou, C. M. Cobley, A. G. Schwartz, P. H. C. Camargo, Y. Xia, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 5903–5908.
- [329] J. Y. Chen, C. Glaus, R. Laforest, Q. Zhang, M. X. Yang, M. Gidding, M. J. Welch, Y. Xia, *Small* **2010**, *6*, 811–817.
- [330] a) M. Egeblad, Z. Werb, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 161–174; b) C. Gialeli, A. D. Theocharis, N. K. Karamanos, *FEBS J.* **2011**, *278*, 16–27.
- [331] a) J. Kim, D. J. Mooney, *Nano Today* **2011**, *6*, 466–477; b) A. V. Li, J. J. Moon, W. Abraham, H. Suh, J. Elkhader, M. A. Seidman, M. Yen, E.-J. Im, M. H. Foley, D. H. Barouch, D. J. Irvine, *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 204ra130.
- [332] T. A. Denison, Y. H. Bae, *J. Controlled Release* **2012**, *164*, 187–191.
- [333] S. D. Weitman, R. H. Lark, L. R. Coney, D. W. Fort, V. Frasca, V. R. Zurawski, B. A. Kamen, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 3396–3401.
- [334] a) P. Csermely, V. Agoston, S. Pongor, *Trends Pharmacol. Sci. Chem.* **2008**, *15*, 422–432; c) J. J. Lu, W. Pan, Y. J. Hu, Y. T. Wang, *PLoS One* **2012**, *7*, e40262.
- [335] a) C. M. Perou, T. Sorlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S. X. Zhu, P. E. Lonning, A. Borresen-Dale, P. O. Brown, D. Botstein, *Nature* **2000**, *406*, 747–752; b) A. Scorilas, A. Karameris, N. Arnogiannaki, A. Ardavanis, P. Bassilopoulos, T. Trangas, M. Talieri, *Br. J. Cancer* **2001**, *84*, 1488–1496; c) L. Nakopoulou, I. Tsimpa, P. Alexandrou, A. Louvrou, C. Ampela, S. Markaki, P. S. Davaris, *Breast Cancer Res. Treat.* **2003**, *77*, 145–155.
- [336] L. Y. T. Chou, K. Zagorovsky, W. C. W. Chan, *Nat. Nanotechnol.* **2014**, *9*, 148–155.
- [337] a) D. Huh, B. D. Matthews, A. Mammoto, M. Montoya-Zavala, H. Y. Hsin, D. E. Ingber, *Science* **2010**, *328*, 1662–1668; b) D. Huh, G. A. Hamilton, D. E. Ingber, *Trends Cell Biol.* **2011**, *12*, 745–754; c) D. Huh, Y. S. Torisawa, G. A. Hamilton, H. J. Kim, D. E. Ingber, *Lab Chip* **2012**, *21*, 2156–2164; d) J. H. Sung, M. L. Shuler, *Lab Chip* **2009**, *9*, 1385–1394; e) J. H. Sung, M. B. Esch, M. L. Shuler, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2010**, *6*, 1063–1081.