

Kohlenhydrat-basierte Nanocarrier mit spezifischem Zell-Targeting und minimalem Einfluss durch die Proteinkorona**

Biao Kang, Patricia Okwieka, Susanne Schöttler, Svenja Winzen, Jens Langhanki, Kristin Mohr, Till Opatz, Volker Mailänder, Katharina Landfester* und Frederik R. Wurm*

Abstract: Sobald Nanopartikel mit biologischen Flüssigkeiten wie Blut in Kontakt kommen, adsorbieren Proteine auf ihrer Oberfläche, welche die sogenannte Proteinkorona ausbilden. Die Wichtigkeit dieser Proteinhülle ist weitgehend anerkannt, jedoch untersuchen nur wenige Studien den Einfluss von Oberflächenfunktionalisierung der Nanocarrier auf die Proteinkorona. Vor allem die Variation der Proteinkorona von PEGylierten und zusätzlich mit Targeting-Molekülen versehenen Nanoträgern und der Einfluss auf das Targeting sind nicht bekannt. Hydroxyethylstärke-Nanocarrier (HES-NCs) wurden synthetisiert, anschließend PEGyliert und zusätzlich („on top“) mit Mannose funktionalisiert, um dendritische Zellen (DCs) spezifisch anzusteuern. Die Wechselwirkungen mit menschlichem Plasma wurden untersucht: Niedrige Gesamtproteinabsorption mit einem ähnlichen Proteinmuster und eine hohe spezifische Bindungsaffinität zu DCs zeigen eine leistungsfähige Kombination von „Stealth“- und Targeting-Verhalten.

Die Nanomedizin wird als eine Schlüsseltechnologie für das 21. Jahrhundert angesehen. Neben der Entwicklung einer Vielzahl von Nanotransportsystemen und spezifischem Targeting ist die Entwicklung von proteinabweisenden Oberflächen sehr wichtig. Sobald synthetische Nanocarrier mit biologischen Flüssigkeiten in Kontakt kommen, findet aufgrund der hohen Oberflächenenergie und hydrophoben Wechselwirkungen eine starke Adsorption von Plasmaproteinen statt.^[1] Es wird heute angenommen, dass das In-vivo-Schicksal jedes Nanoträgers durch diese Protein-Korona bestimmt

wird und nicht von den intrinsischen Eigenschaften des – meist polymeren – Nanoträgers.^[2] PEGylierung (PEG = Polyethylenglykol) ist der gängige Ansatz, um die unspezifischen Wechselwirkungen mit Plasmaproteinen zu reduzieren; der Effekt wird häufig als Stealth-Effekt bezeichnet.^[3] Allerdings ist der Stealth-Effekt allein nicht genug: Spezifische Targeting-Moleküle müssen zusätzlich angekoppelt werden, um die Nanoträger an den Zielort zu steuern.^[1a] Aber wie beeinflussen diese zusätzlichen Einheiten die Wechselwirkung mit Plasmaproteinen? Es könnte eine zusätzliche Korona erzeugt werden, welche die In-vivo-Effizienz durch Abschirmen und Deaktivieren des Targeting-Moleküls verändert.

Die Bildung der Proteinkorona ist für Einkomponenten-Nanopartikel, wie z. B. Polystyrol,^[2c,g,4] Zinkoxid,^[5] Siliciumdioxid,^[2g,5,6] Gold,^[2o,7] Silber^[2o] und Titandioxid,^[2n,5] ausführlich untersucht. Außerdem ist bekannt, dass Oberflächenmodifizierung von Nanopartikeln mit PEG^[8] und Zwitterionen^[9] die Proteinadsorption stark reduziert. Die Kombination von Stealth-Verhalten mit zusätzlicher Funktionalisierung („on top“) mit Targeting-Molekülen ist jedoch nicht untersucht worden. Die Protein-Interaktionen eines PEGylierten Nanoträgers vor und nach der Kopplung von zusätzlichen Targeting-Molekülen ist von entscheidender Bedeutung, um eine effiziente spezifische Zellaufnahme nach Blutkontakt zu ermöglichen. Wir vergleichen hier zum ersten Mal PEGylierte Nanocarrier mit solchen, die zusätzlich Mannose-Einheiten auf der PEG-Hülle tragen, in Bezug auf ihre Blutplasma-Interaktionen. Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC), dynamische Lichtstreuung (DLS) und Zellaufnahmestudien vor und nach Inkubation mit Humanplasma wurden durchgeführt, und der Einfluss auf das Targeting dendritischer Zellen wurde untersucht. Ferner konnte mittels Proteomik-Massenspektrometrie ein charakteristisches Muster von Plasmaproteinen auf allen Nanocarriern nachgewiesen werden, welche die spezifische Bindung von Mannose-Lektinrezeptoren nicht verhindern.

Wir arbeiten schon seit einiger Zeit an Hydroxyethylstärke-Nanokapseln (HES-NCs) als biologisch abbaubare Nanocarrier.^[10] Mit der Methode der inversen Miniemulsion können HES-NCs hergestellt, mit hydrophilen Substanzen beladen und ihre Durchmesser präzise eingestellt werden. Kürzlich haben wir über die präzise PEGylierung von HES-NCs über unterschiedliche Syntheserouten berichtet.^[11] Nun haben wir diese Strategie erweitert, sodass die Nanocarrier zusätzlich („on top“) mit Targeting-Molekülen funktionalisiert werden können. PEG-Diisocyanat (OCN-PEG₁₁₀-NCO, $M_n = 5000 \text{ g mol}^{-1}$) reagiert mit den Oberflächen-Hydroxygruppen des Polysaccharids und erlaubt die anschließende

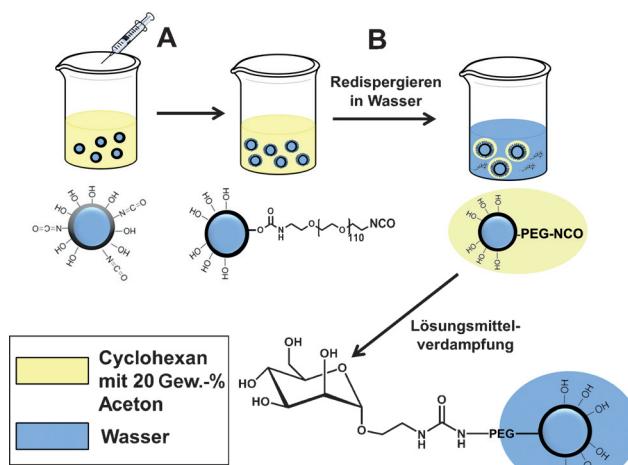
[*] B. Kang, P. Okwieka, S. Schöttler, S. Winzen, Dr. K. Mohr, Dr. V. Mailänder, Prof. Dr. K. Landfester, Dr. F. R. Wurm
Max-Planck-Institut für Polymerforschung
Ackermannweg 10, 55128 Mainz (Deutschland)
E-Mail: landfester@mpip-mainz.mpg.de
wurm@mpip-mainz.mpg.de

P. Okwieka, Dr. V. Mailänder
Abteilung für Hämatologie, Internistische Onkologie und Pneumologie, Universitätsmedizin Mainz
Langenbeckstraße 1, 55131 Mainz (Deutschland)
Dipl.-Chem. J. Langhanki, Prof. Dr. T. Opatz
Institut für Organische Chemie, Universität Mainz
Duesbergweg 10–14, 55128 Mainz (Deutschland)

[**] Wir danken dem BMBF (Cluster CI3) und der DFG (SFB1066) für finanzielle Unterstützung sowie Christine Rosenauer für DLS-Messungen und Katja Klein für die Synthese von Polystyrol-Nanopartikeln. F.R.W. dankt dem Max-Planck Graduate Center für Unterstützung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201502398> zu finden.

Kupplung mit Targeting-Molekülen. Nachdem eine der Isocyanatgruppen mit der Oberfläche reagiert hat, wird die Reaktivität des anderen Kettenendes aufgrund der sterischen Hinderung und des Mobilitätsverlusts verringert. Wenn überdies überschüssiges PEG-Diisocyanat verwendet wird, kann die Cyclenbildung weiter verringert werden, und die zweite Isocyanatgruppe bleibt zugänglich für weitere Reaktionen. Bei der Reaktion mit Methoxypolyethylenglykolisocyanat ($\text{MeO-PEG}_{110}\text{-NCO}$, $M_n = 5000 \text{ g mol}^{-1}$) werden nicht-funktionelle PEGylierte NCs hergestellt, die als Kontrollen für weitere Studien verwendet werden. Der PEGierungsgrad der NCs wird mittels NMR-Spektroskopie^[11] für sowohl mono- als auch difunktionelle PEGs mit ca. 5×10^5 PEG-Ketten an der Oberfläche quantifiziert (Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen). Dies ist ein erster Hinweis, dass das PEG-Diisocyanat selektiv an einem Kettenende, ohne die Bildung von Cyclen, reagiert. Für die Kupplung von Targeting-Molekülen wurden verschiedene Synthesewege untersucht. Für verschiedene Biomolekülen wie Folsäure,^[10,12] Glukose,^[13] Mannose,^[14] Galactose^[14a] oder Disacchariden^[15] ist bekannt, dass sie selektiv an Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden. Die Kupplung dieser Targeting-Moleküle an den Nanocarrier beinhaltet meist mehrere Reaktionsschritte, deren Quantifizierung oft schwierig ist. Hier verwenden wir ein robustes Verfahren für die Kupplung von Biomolekülen an die Oberfläche der Nanocarrier (Schema 1), das eine präzise Quantifizierung der gekoppelten Biomoleküle ermöglicht.



Schema 1. Allgemeine Vorschrift zur Funktionalisierung von HES-NCs mit Mannose mittels Isocyanatchemie. Edukte: A: Diisocyanat-PEG ($\text{OCN-PEG}_{110}\text{-NCO}$, $M_n = 5000 \text{ g mol}^{-1}$) in Aceton; B: d-Mannosamin oder 2-Aminoethyl- α -D-mannopyranosid in Wasser, Verdampfen von Cyclohexan und Dialyse.

Aufgrund der schnellen Reaktion von Isocyanaten mit Aminen^[16] können aminofunktionalisierte Mannose-Derivate mit den NCO-Gruppen während des Redispergierens ohne eine zusätzliche Schutzgruppe an die Nanocarrier gekuppelt werden (Schema 1). Die aminofunktionalisierten Kohlenhydrate reagieren schneller mit den NCs, noch bevor die Hydrolyse der Isocyanate erfolgt. Die Konzentration der ami-

nofunktionalisierten Mannose (vor der Zugabe der NCs) wird durch den Fluorescamin-Assay quantifiziert (Details siehe Hintergrundinformationen).^[17] Nach der Kupplungsreaktion werden die NCs durch Zentrifugation abgetrennt, und die verbleibende Mannose-Konzentration in Lösung wird durch das gleiche Verfahren bestimmt, um so die Kupplungseffizienz zu errechnen.

Zwei Mannose-Derivate wurden verwendet: d-Mannosamin und 2-Aminoethyl- α -D-mannopyranosid, mit den Amingruppen an der C-2- oder C-1-Position (die funktionalierten HES-NCs werden im Folgenden als HES-PEG5000-C2-Man und HES-PEG5000-C1-Man bezeichnet). Mit diesem einfachen und schnellen Protokoll können bis ca. 2×10^5 (Tabelle S1) Mannose-Einheiten an die NCs gekuppelt werden. Auch kupferfreie Klick-Chemie wurde untersucht, führte jedoch zu einer 200-mal niedrigeren Mannosedichte als die zuvor genannte Isocyanat-Route (siehe Hintergrundinformationen). Dieses allgemeine Protokoll sollte auch für andere Biomoleküle verwendbar sein, solange sie eine Amingruppe tragen.

Die Bindungsaffinität der Mannose-funktionalisierten HES-NCs zu unreifen dendritischen Zellen (iDCs; immature dendritic cells) wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS, Abbildung S1) untersucht. In einer kürzlich publizierten Studie konnten wir zeigen, dass nicht-modifizierte HES-NCs eine geringe unspezifische Zellaufnahme aufweisen.^[10] Neben der geringen Aufnahme der HES-NCs reduziert eine anschließende PEGylierung der NCs die Aufnahme in iDCs noch weiter (Abbildung S1). Auch die NCs, die mittels Klick-Chemie (d.h. HES-PEG5000-DBCO-Man) Mannose-modifiziert wurden, zeigen eine ähnlich niedrige Aufnahme in dendritische Zellen wie die HES-PEG5000. Dies lässt sich auf die geringe Dichte von Targeting-Einheiten pro Kapsel (0.0028 Mannoseeinheiten pro nm^2) zurückführen. Die Wechselwirkung zwischen dem Rezeptor und einzelnen Kohlenhydratmoleküll ist mit einer Bindungskonstante im Bereich von 10^3 – 10^4 L mol^{-1} relativ schwach. Sind jedoch mehr Mannose-Moleküle vorhanden, die mit dem Rezeptor in Wechselwirkung treten, steigt die Bindungskonstante auf 10^6 – 10^7 L mol^{-1} .^[18] Die durch NCO-Kupplung modifizierten NCs, d.h. HES-PEG5000-C2-Man, weisen eine 200-mal höhere Mannose-Dichte im Vergleich zu HES-PEG5000-DBCO-Man auf (ca. 0.55 Mannose-Einheiten pro nm^2). Interessanterweise ist die Bindungsaffinität zu iDC dennoch gering (Abbildung S1B). Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die freie Hydroxygruppe an der C-2-Position des Mannose-Moleküls für die Interaktion mit dem Akzeptorprotein essenziell ist und durch die Kupplung blockiert wird.^[19] Die NCs, die mit 2-Aminoethyl- α -D-mannopyranosid (mit der Amingruppe über die C-1-Position verknüpft) funktionaliert sind (HES-PEG5000-C1-Man), weisen eine starke Bindung mit iDCs im Vergleich zu den unmodifizierten und PEGylierten NCs auf (Abbildung S1C). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass, wenn Mannose über einen PEG-Linker an HES-NCs in einer ausreichenden Dichte angebracht ist, eine Multivalenzwirkung erzielt wird, was die zelluläre Aufnahme in iDCs ermöglicht.

Nach diesem erfolgreichen Targeting von unreifen DCs mit Mannose-funktionalisierten HES-NCs unter unphysiologischen

gischen Bedingungen wurde der Einfluss von Humanplasma auf die Protein-Wechselwirkung und die Targeting-Wirksamkeit untersucht. Mithilfe der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) wurden die Protein-Wechselwirkungen von Humanplasma mit den hergestellten HES-NCs bestimmt. Die HES-NCs wurden mit verdünntem Humanplasma titriert, um die Wärme der Proteinadsorption an der Oberfläche zu bestimmen. Die entsprechenden Messwerte wurden in Bezug auf die Verdünnungswärme korrigiert. Als Referenz wurden Standard-Polystyrol(PS)-Nanopartikel (Abbildung 1) vermessen, die bekanntermaßen eine hohe Proteinbindungsaffinität aufweisen.^[20]

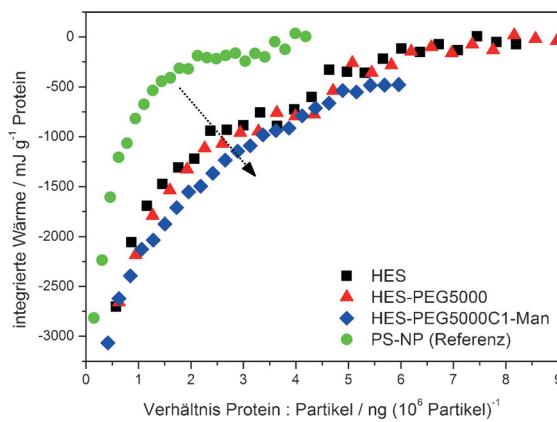


Abbildung 1. ITC-Bindungsisothermen für die Adsorption von Plasmaproteinen auf verschiedenen Nanocarriern: unmodifizierte HES-NCs (schwarze Quadrate ■), HES-PEG5000 NCs (rote Dreiecke ▲) und HES-PEG5000-C1-Man NC (blaue Rauten ◆) im Vergleich zu Polystyrol-Nanopartikeln (grüne Kreise ●) als Referenz.

Die Interaktion zwischen Plasmaproteinen und den Nanocarriern ist in allen Fällen exotherm, was beweist, dass alle untersuchten NCs eine gewisse Protein-Interaktion aufweisen. Es besteht jedoch ein erheblicher Unterschied zwischen den hydrophoben PS-Nanopartikeln und den HES-NCs: die Bindungsaffinität der Plasmaproteine, die durch die Anfangssteigung der Bindungsisotherme repräsentiert wird, ist im Falle aller HES-NCs stark verringert. Dies deckt sich mit früheren Ergebnissen aus unserer Gruppe und auch mit Literaturberichten einer niedrigeren Proteinaffinität von HES^[21] oder anderen Kohlenhydraten.^[22] Was jedoch auffällt ist, dass die drei verschiedenen HES-NCs eine sehr ähnliche Proteinadsorption aufweisen: ITC zeigt nur einen sehr geringen Unterschied in der Proteinaffinität bei PEGylierten oder zusätzlich Mannose-funktionalisierten HES-NCs. Dies ist ein wichtiger Befund, da die ITC einen Einblick in die Proteinkorona der NCs gibt und zeigt, dass die Mannose-funktionalisierung keine signifikant erhöhte Proteinadsorption verursacht. Weiterhin wurde eine dynamische Lichtstreuung (DLS) im unverdünnten Plasma durchgeführt, um die Aggregation der NCs zu untersuchen.^[23] Die Autokorrelationsfunktionen für die NC-Plasma-Mischungen können sehr gut mittels Force Fit beschrieben werden (Abbildung S2). Dies bedeutet, dass die Summe der Autokorrelationsfunktionen der beiden Einzelkomponenten konstant gehalten

wird und nur die Intensitäten von Plasma und NC als freie Fitparameter gewählt werden können.^[23] Die Ergebnisse belegen, dass keine Strukturen, die größer als die Nanocarrier oder die Plasmakomponenten selbst sind, in der Mischung detektiert werden. Man sollte jedoch erwähnen, dass die Änderungen, die durch eine Monoschicht adsorbierteter Proteine auf der NC-Oberfläche hervorgerufen würden, mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden können.^[24] Somit beweist die DLS, dass keine größeren Aggregate von NCs durch Wechselwirkung mit Proteinen gebildet werden. In Kombination mit den ITC-Ergebnissen ist das wahrscheinlichste Szenario also die Adsorption einiger (geringer) Proteinmengen auf der NC-Oberfläche, die dadurch teilweise bedeckt wird. Diese Annahme wird auch durch Proteinquantifizierung und SDS-PAGE (Abbildung S3) gestützt. Beide Methoden belegen die insgesamt geringe Proteinadsorption auf allen HES-NCs im Vergleich zu einem Referenz PS-NP.

Proteomics-Massenspektrometrie belegt überdies, dass die Proteinmuster, die auf allen HES-NCs identifiziert wurden, relativ ähnlich sind, was eine vielversprechende Voraussetzung für spezifisches Targeting in Plasma darstellt (Abbildung 2). Alle HES-NCs weisen eine vergleichbare Zusammensetzung der Proteinkorona auf. Lediglich die PEGylierten NCs zeigen eine geringe Differenz mit einer

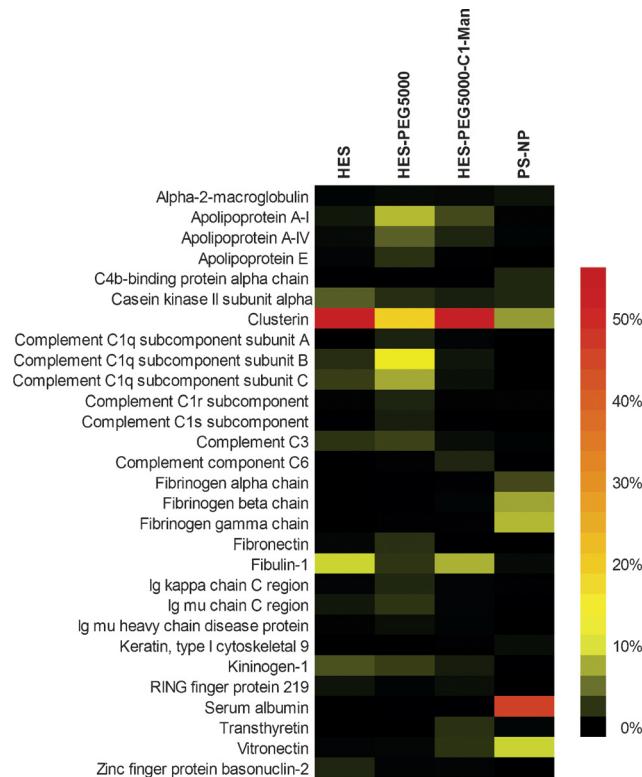


Abbildung 2. Wärmekarte der am häufigsten gemessenen Proteine in der Proteinkorona von HES-NC, HES-PEG5000 NC und HES-PEG5000-C1-Man NC sowie PS-NP als Referenz (bestimmt durch quantitative Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie). Dargestellt sind nur die Proteine, die mindestens 1% der Proteinkorona auf den Nanocarriern ausmachen. Die Werte wurden aus den Molmassen des jeweiligen Proteins berechnet.

insgesamt geringeren Proteinadsorption (Abbildungen 2 und S3). Wichtig ist, dass in allen Fällen die Proteinadsorption nicht vollständig unterdrückt werden kann. Um die Zugänglichkeit der Mannose-Einheiten zu prüfen, wurde die Bindung an c-Typ-Lektin analysiert. Der Test wurde vor und nach der Inkubation mit Humanplasma durchgeführt (Abbildung 3).

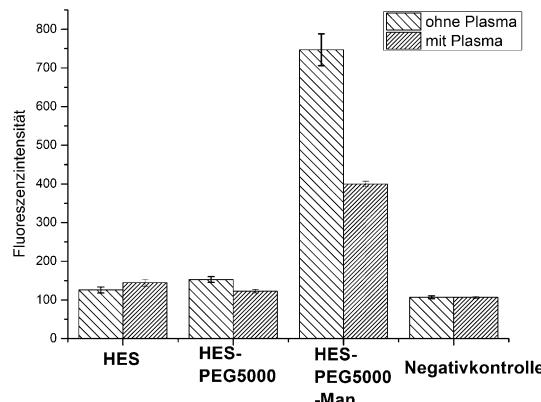


Abbildung 3. Bindung von unmodifizierten (HES), PEGylierten (HES-PEG5000) und Mannose-funktionalisierten HES-NCs (HES-PEG5000-C1-Man) mit c-Typ-Lektin vor oder nach Inkubation mit Humanplasma (die Negativkontrolle wurde ohne Zugabe von Nanocarrier gemessen).

Sowohl die unmodifizierten HES-NCs als auch die PEGylierten HES-NCs weisen keine spezifische Bindung an c-Typ-Lektin vor und nach Inkubation mit humanem Plasma auf (die Negativkontrolle ohne NC zeigt den gleichen Messwert). Die Mannose-funktionalisierten HES-NCs binden hingegen deutlich an das Enzym, jedoch beeinflusst die Proteinkorona die Bindung von c-Typ-Lektin: Mit adsorbierten Plasmaproteinen ist die Bindungsaaffinität verringert, aber es kann immer noch eine deutliche Wechselwirkung nachgewiesen werden (Abbildung 3). In Kombination mit den MS-Daten zeigt dies deutlich, dass die biologische Identität der Nanocarrier durch die Stealth-Eigenschaften der PEGylierung und durch „on top“-Mannose-Funktionalisierung kontrolliert werden kann und ein spezifisches Targeting von DCs ermöglicht. Aufgrund ihrer wichtigen Rolle im Immunsystem ist das Targeting von iDCs biologisch signifikant. Doch als phagozytische Zellen können sie auch unspezifisch NCs aufnehmen. Um die spezifische Bindung nach Adsorption von Plasmaproteinen zu überprüfen, wurde die Aufnahme von Mannose-funktionalisierten HES-NCs in reife DCs (mDCs; mature dendritic cells) untersucht. Reife DC haben eine viel geringere Fähigkeit, als phagozytische Zelle zu fungieren, und die Rezeptor-vermittelte Aufnahme kann deutlich nachgewiesen werden.

Abbildung 4 belegt eindeutig eine vergleichbare Aufnahme von HES-PEG5000-C1-Man in mDCs vor (Abbildung 4A) und nach (Abbildung 4B) Inkubation mit Humanplasma (Abbildung S5 zeigt entsprechende Mikroskopieaufnahmen). Diese Ergebnisse zeigen, dass PEGylierte Nanocarrier mit Targeting-Molekülen, wie Mannose, functionalisiert werden können, um spezifisch sowohl unreife als

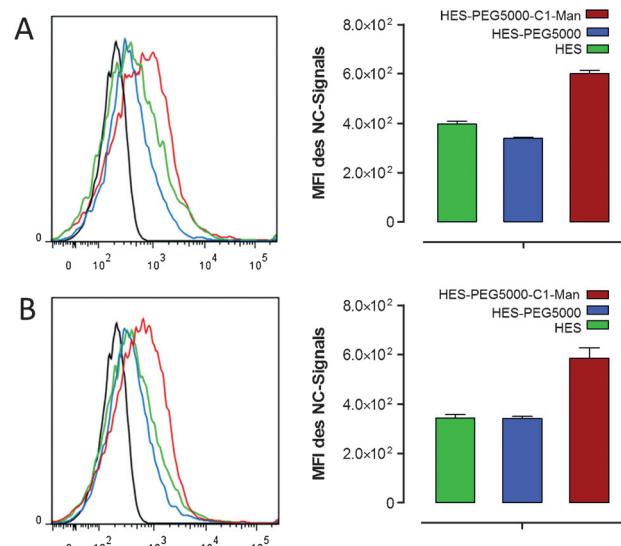


Abbildung 4. In-vitro-Bindung von HES-NCs mit reifen dendritischen Zellen vor (A) und nach (B) Inkubation mit Humanplasma. Die reifen dendritischen Zellen wurden mit $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ der HES, HES-PEG5000 und HES-PEG5000-C1-Man für 2 h bei 37°C inkubiert. Zellaufnahme wurde mit Durchflusszytometrie analysiert. Vorinkubation der NCs mit Plasma (B) hat einen geringen Einfluss auf die Zellaufnahme. Schwarze Linie im Histogramm (links): unbehandelte mDC; grüne Linie: HES; blaue Linie: HES-PEG5000; rote Linie: HES-PEG-C1-Man.

auch reife dendritische Zellen in Gegenwart von Plasmaproteinen anzusteuern. Die Interaktion von Plasmaproteinen mit Mannose-funktionalisierten HES-NCs verhindert nicht, dass spezifische Rezeptoren diese erkennen. Dieser Befund deckt sich mit anderen Arbeiten, die über eine geringe Proteinadsorption an Polysacchariden, insbesondere HES,^[25] Chitosan^[26] und Hyaluronsäure,^[27] berichten.

Zusammenfassend wurden Hydroxyethylstärke-Nanocarrier hergestellt und mit einem zweistufigen Protokoll sequentieller nukleophiler Additionen an Isocyanate PEGyliert und anschließend („on top“) mit aminofunktionalisierter Mannose modifiziert. Der geringe Einfluss von Mannose-Einheiten der PEGylierten NCs auf die Zusammensetzung der Proteinkorona nach Inkubation mit Humanplasma konnte mittels ITC, DLS, SDS-PAGE und Massenspektrometrie nachgewiesen werden. Weiterhin konnte durch Zellaufnahmestudien der NCs in dendritische Zellen und einem Bindungstest mit c-Typ-Lektin nachgewiesen werden, dass die Targeting-Moleküle auch nach der Inkubation mit Plasma für die biologischen Rezeptoren zugänglich sind. Wenn man bedenkt, dass schon einfache Kohlenhydrate wie das Disaccharid in Bleomycin^[15] selektiv Krebszellen ansteuern können, sollte die Kombination aus Stealth-Effekt mit Kohlehydrat-basiertem Targeting den Verlust des Stealth-Effekts nach Kupplung von anderen Targeting-Einheiten vermeiden.

Stichwörter: Kalorimetrie · Kohlenhydrate · Nanocarrier · Proteine · Wirkstofftransport

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 7436–7440
Angew. Chem. **2015**, *127*, 7544–7548

- [1] a) A. Salvati, A. S. Pitek, M. P. Monopoli, K. Prapainop, F. B. Bombelli, D. R. Hristov, P. M. Kelly, C. Aberg, E. Mahon, K. A. Dawson, *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8*, 137–143; b) B. P. Pablo del Pino, Q. Zhang, P. Maffre, G. U. Nienhaus, W. J. Parak, *Mater. Horiz.* **2014**, *1*, 301–313.
- [2] a) T. Cedervall, I. Lynch, S. Lindman, T. Berggard, E. Thulin, H. Nilsson, K. A. Dawson, S. Linse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 2050–2055; b) P. Aggarwal, J. B. Hall, C. B. McLeland, M. A. Dobrovolskaia, S. E. McNeil, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, *61*, 428–437; c) D. Walczyk, F. B. Bombelli, M. P. Monopoli, I. Lynch, K. A. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5761–5768; d) C. Röcker, M. Poetzl, F. Zhang, W. J. Parak, G. U. Nienhaus, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 577–580; e) Z. J. Deng, M. Liang, M. Monteiro, I. Toth, R. F. Minchin, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 39–44; f) C. D. Walkey, W. C. W. Chan, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2780–2799; g) M. P. Monopoli, D. Walczyk, A. Campbell, G. Elia, I. Lynch, F. B. Bombelli, K. A. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2525–2534; h) A. Albanese, C. D. Walkey, J. B. Olsen, H. Guo, A. Emili, W. C. W. Chan, *ACS Nano* **2014**, *8*, 5515–5526; i) M. S. K. Mohr, G. Baier, S. Schöttler, P. Okwieka, S. Tenzer, K. Landfester, V. Mailänder, M. Schmidt, R. G. Meyer, *J. Nanomed. Nanotechnol.* **2014**, *5*, 1000193–100203; j) S. Tenzer, D. Docter, J. Kuharev, A. Musyanovych, V. Fetz, R. Hecht, F. Schlenk, D. Fischer, K. Kiouptsi, C. Reinhardt, K. Landfester, H. Schild, M. Maskos, S. K. Knauer, R. H. Stauber, *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8*, 772–U1000; k) A. Cifuentes-Rius, H. de Puig, J. C. Y. Kah, S. Borros, K. Hamad-Schifferli, *ACSS Nano* **2013**, *7*, 10066–10074; l) R. Gaspar, *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8*, 79–80; m) C. C. Fleischer, C. K. Payne, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 2651–2659; n) R. Tedja, M. Lim, R. Amal, C. Marquis, *ACS Nano* **2012**, *6*, 4083–4093; o) C. D. Walkey, J. B. Olsen, F. Song, R. Liu, H. Guo, D. W. H. Olsen, Y. Cohen, A. Emili, W. C. W. Chan, *ACS Nano* **2014**, *8*, 2439–2455; p) G. Y. Tonga, K. Saha, V. M. Rotello, *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 359–370; q) M. P. Monopoli, C. Aberg, A. Salvati, K. A. Dawson, *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 779–786; r) I. Lynch, A. Salvati, K. A. Dawson, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 546–547.
- [3] a) Q. Dai, C. Walkey, W. C. W. Chan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 5093–5096; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 5193–5196; b) C. D. Walkey, J. B. Olsen, H. Guo, A. Emili, W. C. W. Chan, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2139–2147.
- [4] M. Lundqvist, J. Stigler, G. Elia, I. Lynch, T. Cedervall, K. A. Dawson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 14265–14270.
- [5] Z. J. Deng, G. Mortimer, T. Schiller, A. Musumeci, D. Martin, R. F. Minchin, *Nanotechnology* **2009**, *20*.
- [6] S. Tenzer, D. Docter, S. Rosfa, A. Włodarski, J. Kuharev, A. Rekik, S. K. Knauer, C. Bantz, T. Nawroth, C. Bier, J. Sirirattanapan, W. Mann, L. Treuel, R. Zellner, M. Maskos, H. Schild, R. H. Stauber, *ACS Nano* **2011**, *5*, 7155–7167.
- [7] a) E. Casals, T. Pfaller, A. Duschl, G. J. Oostingh, V. Puntes, *ACS Nano* **2010**, *4*, 3623–3632; b) L. Wang, J. Li, J. Pan, X. Jiang, Y. Ji, Y. Li, Y. Qu, Y. Zhao, X. Wu, C. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 17359–17368; c) A. K. Murthy, R. J. Stover, W. G. Hardin, R. Schramm, G. D. Nie, S. Gourisankar, T. M. Truskett, K. V. Sokolov, K. P. Johnston, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7799–7802.
- [8] A. S. Karakoti, S. Das, S. Thevuthasan, S. Seal, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1980–1994; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 2024–2040.
- [9] D. F. Moyano, K. Saha, G. Prakash, B. Yan, H. Kong, M. Yazdani, V. M. Rotello, *ACS Nano* **2014**, *8*, 6748–6755.
- [10] G. Baier, D. Baumann, J. M. Siebert, A. Musyanovych, V. Mailänder, K. Landfester, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 2704–2715.
- [11] B. Kang, P. Okwieka, S. Schottler, O. Seifert, R. E. Kontermann, K. Pfizenmaier, A. Musyanovych, R. Meyer, M. Diken, U. Sahin, V. Mailänder, F. R. Wurm, K. Landfester, *Biomaterials* **2015**, *49*, 125–134.
- [12] J. Sudimack, R. J. Lee, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2000**, *41*, 147–162.
- [13] K. El-Boubbou, D. C. Zhu, C. Vasileiou, B. Borhan, D. Prosperi, W. Li, X. Huang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4490–4499.
- [14] a) R. Kikkeri, B. Lepenies, A. Adibekian, P. Laurino, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2110–2112; b) H. Freichels, M. Wagner, P. Okwieka, R. G. Meyer, V. Mailänder, K. Landfester, A. Musyanovych, *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 4338–4348.
- [15] Z. Yu, R. M. Schmaltz, T. C. Bozeman, R. Paul, M. J. Rishel, K. S. Tsosie, S. M. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 2883–2886.
- [16] R. Herrington, K. Hock, *Flexible Polyurethane Foams*, 2nd ed., The Dow Chemical Company, **1998**.
- [17] P. Böhlen, S. Stein, W. Dairman, S. Udenfriend, *Arch. Biochem. Biophys.* **1973**, *155*, 213–220.
- [18] a) P.-H. Liang, S.-K. Wang, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11177–11184; b) E. A. Smith, W. D. Thomas, L. L. Kiessling, R. M. Corn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6140–6148.
- [19] N. Shibuya, I. J. Goldstein, E. J. M. Vandamme, W. J. Peumans, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 728–734.
- [20] G. Baier, C. Costa, A. Zeller, D. Baumann, C. Sayer, P. H. H. Araujo, V. Mailänder, A. Musyanovych, K. Landfester, *Macromol. Biosci.* **2011**, *11*, 628–638.
- [21] a) A. Besheer, J. Vogel, D. Glanz, J. Kressler, T. Groth, K. Maeder, *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 407–415; b) C. Lemarchand, R. Gref, P. Couvreur, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*, 327–341; c) M. Orlando, Dissertation, Universität Gießen, **2003**.
- [22] a) R. E. Marchant, S. Yuan, G. Szakalasgratzl, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1994**, *6*, 549–564; b) E. Osterberg, K. Bergstrom, K. Holmberg, T. P. Schuman, J. A. Riggs, N. L. Burns, J. M. Vandalstine, J. M. Harris, *J. Biomed. Mater. Res.* **1995**, *29*, 741–747.
- [23] K. Rausch, A. Reuter, K. Fischer, M. Schmidt, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2836–2839.
- [24] M. Hemmelmann, K. Mohr, K. Fischer, R. Zentel, M. Schmidt, *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 3769–3775.
- [25] M. Noga, D. Edinger, R. Klaeger, S. V. Wegner, J. P. Spatz, E. Wagner, G. Winter, A. Besheer, *Biomaterials* **2013**, *34*, 2530–2538.
- [26] X. Zhang, Q. Zhang, Q. Peng, J. Zhou, L. Liao, X. Sun, L. Zhang, T. Gong, *Biomaterials* **2014**, *35*, 6130–6141.
- [27] L. Liu, H. He, M. Zhang, S. Zhang, W. Zhang, J. Liu, *Biomaterials* **2014**, *35*, 8002–8014.

Eingegangen am 14. März 2015
Online veröffentlicht am 4. Mai 2015