

Die Steuerung des Stealth-Effekts von Nanoträgern durch das Verständnis der Proteinkorona

Susanne Schöttler, Katharina Landfester* und Volker Mailänder

Nanoträger · Oberflächenchemie · Proteinkorona ·
Stealth-Effekt · Wirkstoff-Transport

In den letzten zehn Jahren haben polymere Nanoträger immer mehr Interesse und Verwendung in medizinischen Anwendungen gefunden. Besonders beim Einsatz als Wirkstoff-Träger lassen sich mit Nanoträgern viele Hindernisse der medikamentösen Therapie überwinden. Ihre Anwendung wird jedoch durch die komplexe Zusammensetzung der Partikelabdeckung mit Blutproteinen („Proteinkorona“) erschwert. Diese Proteinkorona macht Vorhersagen über die zelluläre Interaktion, Biodistribution und Toxizität nahezu unmöglich. Vor allem die unspezifische Aufnahme der Nanoträger ist ein wesentliches Hindernis bei der klinischen Anwendung. Dieser Kurzaufsatz gibt einen Überblick über unseren Kenntnisstand auf diesem Gebiet; der Fokus liegt dabei auf Oberflächenfunktionalisierungen, die die unspezifische Aufnahme reduzieren („Stealth-Effekt“). Erörtert werden auch Möglichkeiten zur weiteren Verbesserung von Nanoträgern.

1. Einleitung

Die Verwendung nanoskaliger Materialien für therapeutische Zwecke ist eines der interessantesten Felder der Nanotechnologie. Künstliche Nanopartikel (NPs) sind ein vielversprechendes Hilfsmittel, das derzeit für Anwendungen beim Wirkstoff-Transport, der Diagnostik und der Bildgebung sowie in medizinischen Produkten wie Implantaten getestet wird. Ihre geringe Größe von normalerweise 10–100 nm^[1] ermöglicht das Durchdringen biologischer Barrieren und das Eindringen in Organe und Gewebe. Künstliche Nanopartikel können sogar durch endozytotische Mechanismen in Zellen gelangen.^[2] Sie haben das Potenzial für größenabhängige Interaktionen mit Zellen, Zellorganellen, Proteinen oder DNA. Auch wenn die Anwendungsmöglichkeiten von Nanopartikeln bereits umfangreich untersucht

wurden, bleibt die Vorhersage der NP-Zell-Interaktion und der NP-Biodistribution ein Forschungsthema.

Die Nanotechnologie ermöglicht es, Materialien entsprechend den Anwendungsanforderungen spezifisch zu gestalten. Bestimmte Eigenschaften der Nanopartikel können manipuliert

werden, um einzigartige physikalische, chemische und biologische Eigenschaften zu erlangen und um letztlich multifunktionale Nanopartikel-Plattformen zur Verfügung zu stellen. Nanopartikel können aus verschiedensten Materialien hergestellt werden, einschließlich anorganischer Materialien wie Gold, Eisenoxid oder Silicium, organischer Polymere wie Polystyrol (PS), Polylactid (PLA) oder Polylactid-co-Glycolid (PLGA) oder Biopolymere wie Proteine, Kohlenhydrate oder Lipide. Die meisten Anwendungen der Nanomedizin konzentrieren sich aktuell auf den gezielten Transport von Wirkstoffen innerhalb des Körpers.^[3] Die Verkapselung von Pharmazeutika in Nanopartikeln oder -kapseln könnte viele Probleme umgehen und wurde bereits zum Einsatz in der Krebstherapie vorgeschlagen.

Chemotherapeutika wie Doxorubicin und Paclitaxel waren unter den ersten Wirkstoffen, die durch Nanoträger mit dem Potenzial zu einer veränderten Wirkstoff-Biodistribution im Körper verabreicht wurden. Chemotherapeutische Arzneimittel können wegen ihrer Zytotoxizität ernstzunehmende Nebenwirkungen hervorrufen, die sich durch den Einsatz von Nanoträgern als zielgerichtetes Wirkstoff-Träger-System verringern lassen. Eine lokalisierte Behandlung durch zielgerichteten Wirkstoff-Transport könnte die therapeutische Effizienz verbessern. Darüber hinaus sind die verkapselten Pharmazeutika vor Degradation geschützt, und die Löslich-

[*] Dr. S. Schöttler, Prof. Dr. K. Landfester, Prof. Dr. V. Mailänder
Max-Planck-Institut für Polymerforschung
Ackermannweg 10, 55128 Mainz (Deutschland)
E-Mail: landfester@mpip-mainz.mpg.de
Dr. S. Schöttler, Prof. Dr. V. Mailänder
Hautklinik
Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität
Langenbeckstraße 1, 55131 Mainz (Deutschland)

keit von wasserunlöslichen Wirkstoffen kann verbessert werden.

Zusätzlich zu den klassischen niedermolekularen Substanzen könnten auch Biopharmazeutika, wie Proteine oder Nukleinsäuren, als innovative Arzneimittel für die Behandlung einer Vielzahl von Krankheiten eingesetzt werden. Sie sind äußerst spezifisch und potent, allerdings limitieren ihre hohe Molekülmasse und Instabilität ihre Anwendbarkeit. Die Integration von Biopharmazeutika in nanoskalige Träger könnte diese Einschränkungen überwinden und ihre pharmakokinetischen Eigenschaften auf makroskopischer Ebene maßgeblich verbessern.^[4] Auf mikroskopischer Ebene ist das Eindringen in die Zellmembran eine wesentliche Hürde für solche Biopharmazeutika. Dementsprechend ist die endozytotische Aufnahme von Nanoträgern in Zellen eine wichtige Eigenschaft, um diese Barriere zu umgehen. Um durch eine Einstülpung der Zellmembran aufgenommen zu werden, muss der Nanoträger zuerst an die Zelloberfläche binden – ein Prozess, der inhärent von den Oberflächeneigenschaften des Nanoträgers und insbesondere von der dabei angelagerten Proteinkorona bestimmt wird. Nach der Bindung schließt sich die Zellmembran um den Nanoträger.

Auf makroskopischer Ebene wird passives Tumor-Targeting durch den Effekt der verstärkten Permeabilität und Anreicherung (enhanced permeability and retention, EPR) erzielt, der bereits von mehreren Forschungsgruppen genutzt wurde.^[5] Der EPR-Effekt ergibt sich aus dem gestörten Gefäßsystem rings um das Krebsgewebe, das zur vermehrten Aufnahme von Nanopartikeln führt. Zudem kann die Anbindung von hochaffinen Liganden das Tumor-Targeting weiter verbessern. Ähnlich können auch andere Zellen, z. B. Zellen des Immunsystems, gezielt angesprochen werden, was für einen Immunzell-basierten Therapieansatz genutzt werden kann. Zur gezielten Steuerung werden üblicherweise Antikörper oder Liganden für einen spezifischen Zellrezeptor verwendet.

Einer der verwendeten Liganden ist Folsäure. Diese wurde an die Oberfläche von Nanopartikeln gebunden, um Krebszellen gezielt anzusprechen, die den Folsäure-Rezeptor überexprimieren.^[6] Ein weiterer Tumormarker, der verstärkt auf der Tumoroberfläche exprimiert wird und in experimentellen Anwendungen als Zielstruktur für die Therapie genutzt wird, ist EGFR-2 (HER2). Für anti-HER2- und Folsäure-beschichtete Nanopartikel, die für das Tumor-Targeting bestimmt waren, konnte eine verbesserte Aufnahme gezeigt werden.^[7] Anti-CD8-Antikörper sind für die gezielte Anbindung von PLGA-Nanopartikeln an CD8-Zellen eingesetzt worden.^[8] Auf die Auswirkungen adsorbierter Plasmaproteine auf dieses Targeting ist hingewiesen worden,^[9] allerdings scheint es, dass diese Probleme, wie andere Gruppen zeigen konnten, überwunden werden können.^[10]

Bislang sind nur sehr wenige Nanoträger-basierte Arzneimittel auf dem Markt verfügbar, darunter Paclitaxel enthaltende Albumin-Nanopartikel (Abraxane, Celgene)^[11] und Doxorubicin enthaltende Liposomen (Doxil, Janssen),^[12] die beide in der Krebstherapie Anwendung finden. Ungeachtet der großen Zahl neuartiger nanoskaliger Systeme gibt es nur wenige von der FDA zugelassene Nanoträgersysteme, was die Komplexität ihrer Anwendung sowie die Hürden bei der



Volker Mailänder hat Humanmedizin an der Universität Ulm und der Stanford University (USA) studiert. Er arbeitet als Arzt in der Hämatologie/Onkologie (Charité, Berlin). Nach dem Wechsel zum Institut für klinische Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Ulm arbeitete er an Nanopartikel-Zell-Interaktionen in der Transfusionsmedizin. Er ist seit 2008 Gruppenleiter am MPI für Polymerforschung, war Leiter der Herstellung und Sachkundige Person für Stammzellenprodukte und ist seit 2016 Professor für Immunologie und Polymerforschung in der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz. Zudem leitet er das Zentrum für Translationale Nanomedizin (CTN).



Katharina Landfester ist der Max-Planck-Gesellschaft 2008 als Direktorin des MPI für Polymerforschung in Mainz beigetreten. Sie hat Chemie an der TU Darmstadt und in Strasbourg studiert. 1995 erhielt sie ihren Dokortitel in physikalischer Chemie in Mainz für Arbeiten unter Anleitung von Prof. Werner W. Spiess. Nach einem Aufenthalt als Postdoktorandin bei Prof. Mohamed S. El-Aasser an der Lehigh University (USA) kehrte sie nach Deutschland zurück, um am MPI für Kolloid- und Grenzflächenforschung in Golm zu arbeiten. 2003 nahm sie einen Lehrstuhl (C4) für Makromolekulare Chemie in Ulm an.



Susanne Schöttler hat molekulare Biologie (B.Sc.) an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz und am Trinity College Dublin (Irland) studiert. Sie absolvierte ihr Masterstudium der Biomedizin in Mainz und ihre Promotion am MPI für Polymerforschung bei Prof. Katharina Landfester in Mainz. Nach der Doktorarbeit trat sie eine Postdoktorandenstelle bei Prof. Volker Mailänder an der Universitätsmedizin Mainz an. Seit 2016 arbeitet sie für Boehringer Ingelheim in Biberach.

Übertragung von Grundlagenforschung in pharmazeutische Arzneimittel illustriert.

Trotz all der möglichen Vorteile der Nanomedizin sind die Anwendungsmöglichkeiten von Nanoträgern nach wie vor begrenzt, weil unser Wissen über ihre Interaktion mit der biologischen Umgebung unzureichend ist. Eine gründliche Beurteilung der durch Nanoträger induzierten biologischen Reaktionen ist erforderlich. Eine wesentliche Herausforderung ist dabei die Bildung der Proteinkorona: Durch den Kontakt mit physiologischen Flüssigkeiten werden Nanomaterialien augenblicklich von Proteinen umhüllt (Abbildung 1).^[13–15] Diese schnell entstehende Proteinkorona verändert die physikochemischen Eigenschaften der Nanoträger, einschließlich hydrodynamische Größe, Oberflächenladung und Aggregationsverhalten. Die ursprüngliche chemische Identität der Oberfläche der unbedeckten Nanopartikel wird dadurch in eine biologische Identität umgewandelt. Dieses Phänomen ist zwar schon seit einiger Zeit bekannt, allerdings können solche komplexen Proteingemische erst seit kurzem durch die Methode der mit hochauflösender Massenspek-

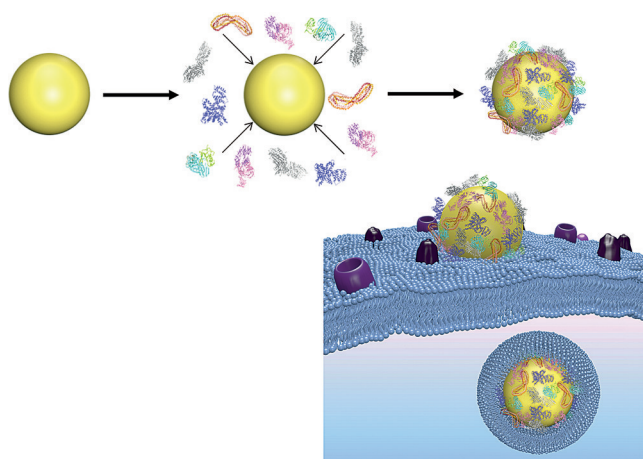


Abbildung 1. Die Bildung der Proteinkorona auf der Oberfläche des Nanoträgers kann die Interaktion mit der Zellmembran beeinflussen.

trometrie gekoppelten Flüssigchromatographie (LC-MS) entschlüsselt werden. Darüber hinaus sind die biologischen Auswirkungen der Wechselwirkung mit Zellmembranen sowie der Einfluss auf den Mechanismus der zellulären Aufnahme der adsorbierten Proteine jetzt genau bestimmt worden. Wir wissen nun, dass die Korona die biologische Identität der Nanopartikel definiert und die Zytotoxizität, Biodistribution sowie Endozytose in spezifische Zellen beeinflusst.^[16,17] Wenn Nanoträger in den Körper eingebracht werden, ist es die Proteinkorona, die von den Zellen eigentlich wahrgenommen wird^[13] – somit ist die Vorhersage von Nanoträger-Zell-Interaktionen nur unter Berücksichtigung der Proteinkorona möglich.

Studien zur Analyse der Proteinkorona haben zwei Schichten von adsorbierten Proteinen ermittelt: eine innere Schicht von irreversibel haftenden Proteinen, die als harte Korona bezeichnet wird, und eine äußere Schicht von locker gebundenen und sich ständig austauschenden Proteinen, welche die weiche Korona bilden.^[14,18] Die Zuordnung wird über die Affinität der Proteine für die Oberfläche der Nanoträger definiert. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass im Falle der harten Korona Proteine direkt mit der Oberfläche des Nanoträgers wechselwirken, während zur weichen Korona gehörende Proteine über schwache Protein-Protein-Wechselwirkungen mit bereits gebundenen Proteinen interagieren.^[16] Da die harte Korona längere Zeit an der Oberfläche gebunden bleibt und auch Prozesse wie Endozytose und Translokation in verschiedene physiologische Umgebungen übersteht, nimmt man an, dass die harte Korona eine größere Bedeutung für biologische Antworten hat als die weiche.^[16] Die Bildung der Proteinkorona wurde mit unterschiedlichen Nanopartikelmaterialien, z.B. aus Polystyrol,^[13,15,18,19] Silicium,^[15,19,20] Metallen^[21,22] oder Lipiden,^[23] beobachtet. Zwei allgemeine Konsequenzen der Proteinadsorption für Nanopartikel sind eine Zunahme der Größe und die Bildung einer negativen Oberflächenladung wegen des anionischen Charakters der meisten Blutproteine.^[23]

2. Analytische Methoden zur Charakterisierung

Angeichts der bedeutenden Auswirkungen der Proteinkorona auf Nanomaterialien für medizinische Anwendungen ist die Entwicklung analytischer Methoden für ihre Charakterisierung essenziell. Verschiedene Techniken wurden zur Analyse der unterschiedlichen Parameter der Proteinkorona verwendet.

Die Bindungsaffinitäten von einzelnen Proteinen oder Proteinmischungen können durch Fluoreszenzspektroskopie,^[24,25] isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)^[26] oder Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR)^[27] analysiert werden. Cedervall et al. waren die Ersten, die ITC und SPR für die Analyse der Proteinkorona nutzten.^[14] ITC verfolgt die Wärmeveränderung infolge der Adsorption von Proteinen an Nanomaterialien und kann Informationen über die Proteinbindungsaffinitäten und die Stöchiometrie liefern.

Durch differenzielle Zentrifugalsedimentation (DCS)^[28] und dynamische Lichtstreuung (DLS)^[13,29] kann die Dicke der Proteinkorona bestimmt werden. DLS nutzt die Lichtstreuung der Partikel in Lösung, um ein Größenverteilungsprofil zu erstellen. Veränderungen im hydrodynamischen Radius werden mithilfe dieser Methode detektiert, die Informationen über den Zuwachs der Partikelgröße und die Protein-induzierte Nanopartikelaggregation liefert. Bei der DCS werden die Partikelgrößenverteilungen mithilfe einer Drehscheibe mit definiertem Saccharosegradienten gemessen. Die primäre Information ist die Zeit, die die Partikel benötigen, um von der Mitte der Scheibe durch den Gradienten zu einem Detektor an der Außenseite zu gelangen.^[19] DLS und DCS sind zwei der wenigen Methoden, die in situ anwendbar sind.^[16]

Es stehen mehrere Verfahren zur Verfügung, um Konformationsänderungen der an der NP-Oberfläche haftenden Proteine zu verfolgen. Mittels Zirkulardichroismus (CD)^[25,30] können die Sekundärstrukturen der Proteine bestimmt werden, allerdings ist die Methode auf einzelne Proteine beschränkt und kann nicht auf komplexe Proteinmischungen angewendet werden. Weitere Verfahren zur Dokumentation von Strukturänderungen sind die Fourier-Transform-Infrarot-(FTIR)-Spektroskopie^[25,31] oder die Raman-Spektroskopie.^[32]

Um Daten zum Einfluss der Proteinkorona auf die Aufnahme, Aggregation, Biodistribution, Ausscheidung und Toxizität zu erhalten, ist es zuerst notwendig, die Proteine zu identifizieren. Zu diesem Zweck muss die harte Korona, nach Inkubation der NPs in Plasma oder Serum, aufgereinigt werden. Die Isolierung von NP-Protein-Komplexen aus dem umgebenden Medium ist eine zentrale Herausforderung der Proteinkorona-Forschung, da sie die Interaktion der Partikel und Proteine stören könnte.^[14] Zentrifugation ist die gebräuchlichste Methode der Proteinisolierung, da sie die Größenunterschiede und Dichte der Nanopartikel relativ zu freien Proteinen nutzt. Bei Nanopartikeln mit magnetischen Eigenschaften ist die Trennung vom Medium über einen starken Magneten möglich und wurde bereits für die Aufreinigung der Proteinkorona verwendet.^[33–35] Sobald die Nanopartikel-Protein-Komplexe isoliert und die anhaftenden Proteine von der NP-Oberfläche entfernt worden sind, wer-

den sie durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese oder Chromatographie aufgetrennt. Die Identifikation wird dann per Massenspektrometrie (MS) durchgeführt, die sowohl qualitative als auch quantitative Informationen liefert. Die Identifikationsrate der an den Nanopartikeln haftenden Proteine ist enorm angestiegen. Während in den ersten Studien durch 2D-Gelelektrophorese nur 10–20 Proteine detektiert werden konnten,^[34,36] können heutzutage bis zu 500 Proteine identifiziert werden.^[15]

3. Zusammensetzung der Proteinkorona

Die Kenntnis der Zusammensetzung der Proteinkorona ist eine Voraussetzung, um die physiologischen Reaktionen, die durch Nanoträger *in vivo* ausgelöst werden, zu verstehen. Für biomedizinische Anwendungen hergestellte Nanoträger werden häufig intravenös verabreicht und sind somit den Blutproteinen ausgesetzt. So wird die Zusammensetzung der Proteinkorona von über 3700 im Plasma vorhandenen Proteinen bestimmt, deren Konzentration von 5 pg mL^{-1} für Interleukin 6 bis 50 mg mL^{-1} für Albumin variiert.^[37] Proteine der harten Korona sind durch ihre längere Verweildauer und höhere Affinität leichter zu isolieren und wurden deshalb in den meisten Studien zur Proteinkorona untersucht.^[14,18,38] Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Zusammensetzung der Proteinkorona nicht bloß die Häufigkeit der Proteine im Blut wiedergibt, wenngleich häufig vorkommende Proteine eine viel höhere Wahrscheinlichkeit haben, als erstes mit der NP-Oberfläche zu wechselwirken (siehe Vroman-Effekt in Abschnitt 4).^[23,39] Darüber hinaus wurde gezeigt, dass es keine universelle Proteinkorona für alle Nanoträger gibt, sondern komplexe, variierende Zusammensetzungen.^[16] Unabhängig vom Ausgangsmaterial und den Oberflächenfunktionen werden häufig vorkommende Blutproteine wie Albumin, Immunglobulin G (IgG) und Fibrinogen mit einer weiten Bandbreite an NPs assoziiert.^[14,21,39] Albumin beispielsweise wurde als Hauptprotein auf Goldnanopartikeln identifiziert^[21] und wurde auf Silicium-NPs, Polystyrol-NPs^[15,39] oder auch Liposomen^[40] detektiert.

Diese häufig vorkommenden Proteine zeigen oft höhere Assoziations- und Dissoziationsraten als beispielsweise Apolipoproteine, die immer wieder als stark adsorbierende Proteine auf einer großen Mehrheit der untersuchten Nanopartikel identifiziert werden.^[16,41,42] Die hohe Affinität von Apolipoproteinen zu vielen NP-Typen könnte auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhen und könnte zusätzlich durch größenabhängige Wechselwirkungen angetrieben werden.^[42] Zusammen mit Phospholipiden bauen Apolipoproteine nanoskalige Lipoproteine zusammen, darunter Lipoprotein hoher Dichte (high density lipoprotein, HDL) oder Lipoprotein geringer Dichte (low density lipoprotein, LDL). Diese Transportvehikel tragen Phospholipide und Cholesterin durch den Blutkreislauf. Apolipoproteine, die HDL-Vesikel wie APOA1, A2, A4, C1, C3, D, E oder J bilden, wurden auf der Oberfläche verschiedener Nanopartikel aus unterschiedlichen Materialien gefunden.^[15,18,38,39,43] Zudem wurden Phospholipide in der Korona von Copolymer-NPs gefunden, was darauf schließen lässt, dass intakte HDL-Par-

tikel mit der Partikeloberfläche interagieren könnten.^[17,44] Eine zweite Gruppe von Proteinen, die häufig auf Nanopartikeln identifiziert wird, sind die Komplementfaktoren.^[39] Als Teil der angeborenen Immunität hilft das Komplementsystem, fremde Substanzen aus dem Körper zu entfernen. Durch einen Auslöser, normalerweise ein Pathogen, wird die Komplementkaskade, die über 30 Proteinen umfasst, aktiviert. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, die Oberfläche eines Pathogens für die Identifikation durch Phagozyten zu markieren. Das Komplement C3 ist ein häufig beobachtetes Beispiel in der Proteinkorona von Gold-NPs,^[45] Lipid-beschichteten NPs^[46] und Polymer-NPs.^[47] Zusätzlich zur qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der Proteinkorona sind die Orientierung und die Verfügbarkeit der Epitope von adsorbierten Proteinen erst neuerdings untersucht worden.^[48] Aufbauend auf diesen Ergebnissen lässt sich ein molekulares Bild der Proteinkorona erhalten.

4. Entwicklung der Proteinkorona

Schon 1962 hat Vroman die These des dynamischen Prozesses der Adsorption von Blutproteinen auf Oberflächen aufgestellt. Im Rahmen seiner Untersuchungen zur Proteinadhäsion auf ebenen Oberflächen zeigte er eine hohe Adsorption von Fibrinogen nach mittlerer Inkubationszeit und vermutete einen anschließenden Austausch von Fibrinogen durch andere Proteine.^[49] Dieses Phänomen der sequenziellen, kompetitiven Adsorption, bekannt als Vroman-Effekt, wurde auch auf andere Proteine und Oberflächen angewendet. Für Nanoträger wird angenommen, dass häufig vorkommende, hoch bewegliche Blutproteine wie Albumin, IgG und Fibrinogen zunächst an die Oberfläche adhären, später jedoch durch Proteine mit geringerer Häufigkeit, aber höherer Affinität verdrängt werden, beispielsweise durch Apolipoproteine oder Gerinnungsfaktoren.^[16,50] Dieses sequenzielle Bindungsmuster der Plasmaproteine wurde für einige polymere Modell-NPs^[38,50] und feste Lipid-NPs^[51] bestätigt. Darüber hinaus wurde von einem Anstieg der Zahl an eher großen Proteinen mit einem Molekulargewicht über 200 kDa während der Inkubation berichtet.^[23] Letztlich wird ein Zeitpunkt erreicht, an dem der stetige Austausch der Proteine die Zusammensetzung der Proteinkorona nicht weiter beeinflusst und ein Gleichgewicht entsteht.^[44] Eine schnelle Bildung der harten Korona wurde bereits nach einer Minute festgestellt,^[23] und es ist allgemein anerkannt, dass nach einer Stunde eine stabile Zusammensetzung erreicht ist.^[13]

Vor kurzem ergab eine umfangreiche Studie an Polystyrol- und Silicium-Nanopartikeln, dass Protein-Fingerabdrücke schon zum frühesten Einwirkungszeitpunkt von 0.5 min festgelegt waren und sich nach anhaltender Plasma-Einwirkung nicht signifikant veränderten.^[15] Interessanterweise wurde im Fall von Eisenoxid-Nanopartikeln,^[52] Öl-in-Wasser-Nanoemulsionen^[53] und Gold-Nanopartikeln^[54] keine kompetitive Proteinverdrängung festgestellt. Dies ist in Einklang mit Vromans Vorschlag, dass die Verdrängung innerhalb von Sekunden stattfindet. Eine Untersuchung der Proteinkorona während einer so kurzen Inkubationszeit ist schwer umzusetzen. Dementsprechend beträgt die kürzeste verwendete

Zeitspanne in den meisten Studien, die Adsorptionskinetiken analysieren, 0,5 bis 5 min.^[15,54] Andere Studien, vor allem jene, die den Vroman-Effekt bestätigen, verwenden stattdessen Plasmaverdünnungen, um frühe Phasen der Proteinadsorption zu simulieren.^[38,50,51]

Eine dynamische Veränderung der Zusammensetzung der Proteinkorona tritt nicht nur im Laufe der Zeit, sondern auch während der Wanderung eines Nanoträgers durch den Körper auf. Nanoträger, die durch die Lunge eindringen, werden von anderen Proteinen umhüllt als Nanoträger, die intravenös appliziert werden; die Zusammensetzung entwickelt sich entsprechend dem sich verändernden Umfeld. Dieses charakteristische Proteinmuster könnte möglicherweise dafür verwendet werden, den Transport der Nanopartikel durch den Körper oder sogar innerhalb der Zelle zu verfolgen. Lundqvist et al. analysierten die Zusammensetzung der Korona von Polystyrol-Nanopartikeln, die von Plasma in cytosolische Flüssigkeit transferiert wurden.^[55] Ihrem Bericht zufolge werden einige Proteine wie Apolipoprotein A1 (APOA1) durch cytosolische Proteine ersetzt, während andere Proteine des Plasma-Fingerabdrucks erhalten bleiben. Zudem befähigt uns die Proteinkorona zur Nachverfolgung der intrazellulären Transportwege, die von Nanopartikeln genutzt werden.^[35] Dies ist von erheblicher Bedeutung, denn diese Methodik ergänzt das Wissen über die intrazellulären Transportwege, indem ein unabhängiges Verfahren angewendet wird, um die Vielzahl der am intrazellulären Transport beteiligten Proteine zu analysieren. Intrazelluläre Kompartimente, deren Beteiligung am Transport von Nanoträgern durch die Zelle bislang nicht bekannt war, können nun bestimmt werden.^[35,56] Die Zeitabhängigkeit der Proteinadsorption ist von besonderer Bedeutung, da Interaktionen der Nanoträger mit dem Umfeld in biomedizinischen Anwendungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfinden. Das Anheften von Proteinen im Blutstrom kann eine Frage von Minuten sein, wohingegen die Interaktion mit Zellen weiter entfernter Organe nach Stunden oder sogar Tagen relevant sein kann.^[3]

5. Parameter, welche die Proteinkorona beeinflussen

Etliche Studien versuchten einen Zusammenhang zwischen den physikochemischen Eigenschaften der Nanopartikel, wie Materialgröße, Form, Ladung sowie der chemischen Funktionalität, und der Zusammensetzung der Korona herzustellen. Sogar die Rauheit der Oberfläche könnte hier eine Rolle spielen.^[57] So wurde wegen ihrer hohen Einstellbarkeit ein breites Spektrum an unterschiedlichen Nanopartikeln synthetisiert, was aber eine zuverlässige Vorhersage der Nanopartikel-Protein-Interaktionen derzeit noch schwieriger macht. So sind wir nicht in der Lage, eine universelle Schlussfolgerung in Bezug auf die Nanopartikelgröße zu ziehen. Im Fall einiger polymerer Nanopartikel resultierte die Variation der Partikelgröße in einem hauptsächlich quantitativen Einfluss auf die Proteinzusammensetzung.^[38,39] Andererseits wurde eine größenabhängige qualitative Beeinflussung des Proteinmusters für Gold-^[58] und Polystyrol-Nanopartikel^[18] festgestellt. In ihrer Studie zu Polystyrol-Nano-

partikeln haben Lundqvist und Kollegen sowohl der Nanopartikelgröße als auch den Oberflächeneigenschaften eine wichtige Rolle bei der Ausgestaltung der Proteinadsorption zugeordnet.^[18] Viele Wechselwirkungen tragen zur Proteinanheftung bei, wie Van-der-Waals-Wechselwirkungen, elektrostatische Wechselwirkungen, hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken.^[59] Auch wenn all diese Kräfte zwar treibend für die Proteinadsorption sein können und Faktoren wie elektrostatische Wechselwirkungen zwischen funktionalisierten Nanopartikeln und geladenen Seitenketten der Proteine sicherlich auch eine Rolle spielen, gilt, dass Adsorption hauptsächlich von hydrophoben Wechselwirkungen angetrieben wird (Abbildung 2).^[39,60]

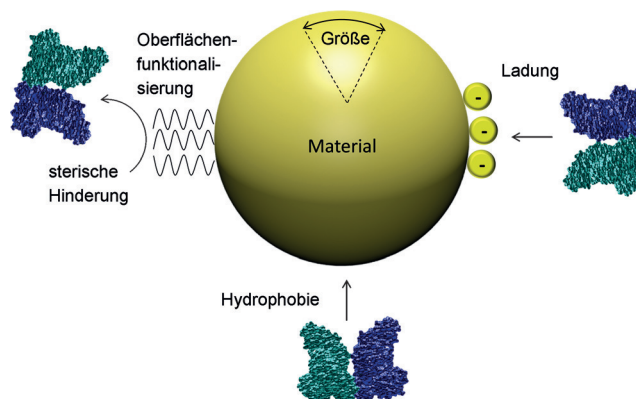


Abbildung 2. Die Merkmale eines Nanoträgers beeinflussen die Proteinadsorption.

Ein Zusammenhang zwischen der NP-Hydrophobie und der Proteinassoziation wurde anhand der besseren Adsorption von Proteinen auf hydrophoben als auf hydrophilen Oberflächen demonstriert.^[3,61] Des Weiteren wurde vorgeschlagen, dass eine negative Oberflächenladung der Nanopartikel mit einer verringerten Proteinadsorption korreliert, da die meisten Serumproteine ebenfalls negativ geladen sind.^[62] Allerdings sind anionische Nanopartikel trotz ihrer Oberflächenladung gleichermaßen von Proteinen bedeckt.^[63] Die Veränderungen der Oberflächenladung von Nanopartikeln beeinflussen wesentlich die Qualität der Korona-Zusammensetzung, sprich das Proteinmuster.^[14,64] Eine bevorzugte Bindung negativ geladener Proteine an positiv geladene Nanopartikel und andersherum wurde für einige Nanoträger beobachtet,^[21,65] scheint aber keine allgemeine Regel zu sein. Im Unterschied dazu erwiesen sich Proteinbindungsaffinitäten als unabhängig von der Nanopartikelladung und nicht durch den isoelektrischen Punkt der Proteine bestimmt.^[35,39] Auch wenn die Proteine der Korona nicht durch ihren isoelektrischen Punkt vorhergesagt werden können, bestimmt die Oberflächenladung der Nanopartikel maßgeblich die Zusammensetzung der Proteinkorona. Zwar kann auch das Partikelmaterial die Proteinadsorption beeinflussen, allerdings spielen Oberflächeneigenschaften wie Hydrophobie und Ladung eine wichtigere Rolle bei der Bestimmung der spezifischen Zusammensetzung der Proteinkorona.^[64]

Außer von den Oberflächenmerkmalen der Nanoträger ist die Zusammensetzung der Proteinkorona auch in hohem

Maße von der Proteinquelle abhängig. Wenn die Korona nach der Inkubation in Blutplasma ermittelt wird, werden oftmals Proteine des Gerinnungssystems identifiziert.^[18,39,66] Im Unterschied dazu ist Serum von Gerinnungsfaktoren befreit, insbesondere von Fibrinogen. Berichten zufolge gibt es Abweichungen im Proteinmuster der NP-Korona, die in fötalem Rinderserum (FBS) oder humanem Plasma gebildet wurde;^[67] die Relevanz der Proteinquelle für die Zusammensetzung der Proteinkorona ist kürzlich ausführlich im Hinblick auf die Nanopartikelaufnahme untersucht worden.^[68] Die Studie unterstreicht die Relevanz einer sorgfältigen Wahl der Proteinquelle, denn sie zeigt einen beachtlichen Unterschied in der Zellinteraktion zwischen Nanopartikeln, die in FBS, humanem Serum oder humanem Plasma inkubiert wurden. Außerdem weist die Studie darauf hin, dass verschiedene Gerinnungshemmer die Aufnahme beeinflussen. Während Polystyrol-NPs mit einer in FBS gebildeten Proteinkorona effektiv von HeLa-Zellen und der Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 aufgenommen werden, hemmen humanes Serum und humanes Citratplasma die Internalisierung. Interessanterweise wurden NPs, die mit humanem Heparinplasma inkubiert wurden, nur von RAW264.7 internalisiert, während keine Aufnahme bei HeLa-Zellen beobachtet wurde. In diesem Fall war das Heparin, das nicht in der üblichen Proteomanalyse detektiert wurde, in der Lage, als zusätzliche Komponente an die Proteinkorona zu adsorbieren. Entscheidend ist, dass die Zusammensetzung der Proteinkorona durch die Proteinquelle beeinflusst wird, nicht nur in Bezug auf Gerinnungshemmer oder Spezies. Selbst Plasma verschiedener Individuen ruft unterschiedliche Effekte hervor. Die Proteinadsorption wurde in humanen Plasmaproben verschiedener Patienten mit unterschiedlichen Krankheiten verglichen. Dabei fand sich eine ausgeprägte Variation der Zusammensetzung der Proteinkorona, die darauf schließen lässt, dass individuelle Proteinkoronen vorhanden sind.^[69] Außerdem sind Parameter wie Konzentration^[70] oder Temperatur^[71] der Proteinquelle wichtige Faktoren in der Proteininteraktion.

6. Stealth-Materialien und spezifische Proteine vermitteln den Stealth-Effekt

Wie alle fremden Substanzen werden Nanoträger im Blutkreislauf von Zellen des mononukleär-phagozytären Systems (MPS), auch bekannt als retikuloendotheliales System (RES), beseitigt. Dieser Teil des Immunsystems besteht aus Phagozyten wie Monozyten und Makrophagen, die hauptsächlich in Leber, Milz, Lunge und Lymphknoten lokalisiert sind. Die Phagozytose der Nanoträger wird durch opsonisierende Proteine, wie IgG und Komplementproteine, welche die Nanopartikel als Fremdkörper markieren, gefördert. Die schnelle Entfernung der zirkulierenden Nanoträger aus dem Blutkreislauf ist ein wesentliches Problem, da sie verhindert, dass die Nanoträger ihren Zielort innerhalb des Körpers erreichen. Daher wurden Nanoträger mit proteinabweisenden Oberflächen ausgestattet, um die Proteinanheftung zu verringern und die Zirkulationszeit der Träger im Körper zu verlängern. Die resultierenden Stealth-Nanoträger

sind ein vielversprechendes Hilfsmittel, um die Aktivierung des Immunsystems zu verhindern und einen erfolgreichen Arzneimitteltransport zu ermöglichen.

Aufgrund ihres höheren Opsonisierungsgrades haben hydrophobe Nanopartikel eine kürzere Zirkulations-Halbwertszeit. Deshalb wurden Nanopartikel mit hydrophilen Molekülen beschichtet, um sie vor der Opsonisierung und der Erkennung durch Zellen des MPS zu schützen.^[72] Kovalente Anknüpfung von Polyethylenglykol (PEG), auch bekannt als PEGylierung, ist der Standardansatz und wurde zur Erhöhung der Zirkulationszeit einer Vielzahl von Polypeptiden,^[73] polymeren Nanopartikeln^[74,75] und Liposomen^[76] verwendet. Trotz intensiver Forschung konnte der Mechanismus hinter der Proteinresistenz von PEGylierten Oberflächen noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Es wird angenommen, dass die proteinabweisenden Eigenschaften von PEGylierten Oberflächen durch sterische Abstoßung infolge adsorbierter Wassermoleküle verursacht werden. Die Eigenschaften von PEG-Derivaten, inklusive der Kettenlänge, der Konformation und der Oberflächendichte, spielen eine wichtige Rolle bei der Effektivität des Proteinwiderstands.^[77] Walkey et al. demonstrierten, dass die Modifikation mit PEG zu einer verringerten Gesamtprotein-Adsorption auf Gold-Nanopartikeln führt und dass diese mit ansteigender Dichte der PEGylierung kontinuierlich verringert wird.^[45] Die Proteinmenge konnte auch durch eine Erhöhung des Molekulargewichts des auf den Gold-Nanopartikeln fixierten PEG von 2 auf 20 kDa reduziert werden.^[54] Abhängig von der Fixierungsdichte bilden sich verschiedene PEG-Konformationen. Eine eher geringe Oberflächenabdeckung mit PEG bildet eine pilzartige Konfiguration, während dicht gepacktes PEG der Nanopartikeloberfläche eine bürstenartige Struktur verleiht. Hoher sterischer Schutz wurde überwiegend bei Bürstenkonformationen und Pilz/Bürsten-Intermediaten gezeigt.^[78]

Obwohl die Modifizierung von Nanoträgern mit PEG unspezifische Proteinadsorption vermindert^[74,79] und die Verweildauer im Blut erhöht,^[80] kann die Bildung der Proteinkorona nicht vollständig verhindert werden.^[43,45,74] Trotz der weitverbreiteten Verwendung von PEG für medizinische Anwendungen gibt es auch Nachteile. Zum Beispiel ist PEG nicht biologisch abbaubar und könnte sich im Körper anreichern. Zusätzlich wurden die Bildung von PEG-Antikörpern^[81] und schwerwiegende Hypersensitivitätsreaktionen^[82] beschrieben. Antikörpererkennung kann bei wiederholter systemischer Gabe zu einer verringerten Zirkulationszeit im Blut führen.^[83] Diese Faktoren bedingen die Suche nach PEG-Alternativen. Zwitterionische Moleküle, wie Polybetaine oder Polysaccharide, können durch Kupplung an Nanopartikel auch hydrophile Hüllen entwickeln und werden als Alternativen für PEG diskutiert.^[72] Ihre biologische Abbaubarkeit macht Polysaccharide besonders interessant für medizinische Anwendungen. Hydroxyethylstärke (HES) wurde zur Synthese von abbaubaren, polymeren Nanoträgern verwendet.^[84–86] Als Stärkederivat kann HES von Amylasen im Körper enzymatisch hydrolysiert werden. Darüber hinaus wurden für HES proteinabweisende Eigenschaften postuliert, und es wurde bereits die Verhinderung unspezifischer Aufnahme von HES-Nanokapseln (HES-NCs) durch HeLa-Zel-

len demonstriert.^[85,87] Die Zirkulationszeit von HES-Nanokapseln im Blut ist verlängert, was für die effiziente therapeutische Wirksamkeit von verkapselten Arzneimitteln notwendig ist.^[86]

Zusätzlich zur Hemmung der unspezifischen Zellaufnahme ist das direkte Targeting spezifischer Zellen wichtig für eine erfolgreiche Anwendung von Nanoträgern als Wirkstoff-Transporter. In einer aktuellen Studie wurden PEGylierte HES-NCs, ausgestattet mit verschiedenen zielgerichteten Molekülen zur Steigerung der Aufnahme in dendritischen Zellen, in Bezug auf ihre Proteinadsorption analysiert.^[10] Dabei wurden eine allgemein geringe Proteinadsorption mit einem ausgeprägten Proteinmuster und einem minimalen Einfluss der zielgerichteten Bestandteile auf die Zusammensetzung der Proteinkorona beobachtet. Dies ist eine vielversprechende Eigenschaft für ein spezifisches Targeting unter physiologischen Bedingungen. Das Targeting spezifischer Zellen ist nur möglich, wenn die Proteinadsorption die selektive Bindung der an die Nanoträger gekoppelten Targeting-Moleküle nicht beeinflusst. Salvati et al. veranschaulichten die Relevanz dieser Thematik.^[9] In ihrer Studie verloren PEGylierte Silicium-Nanopartikel, die mit Transferrin funktionalisiert worden waren, ihre Spezifität für den Transferrin-Rezeptor, der auf Krebszellen (A549-Zellen) exprimiert wird, durch Inkubation mit Serum. Demgegenüber beeinflusste die Proteinkorona der HES-Nanokapseln die Erkennung durch entsprechende Rezeptoren nicht. Die zelluläre Aufnahme der Nanokapseln durch dendritische Zellen bewies, dass die zielgerichteten Bestandteile nach der Inkubation mit humanem Plasma noch aktiv und zugänglich für biologische Rezeptoren sind.^[10]

Eine weitere innovative Polymerklasse, die als Alternative zu PEG in Betracht kommt, ist die der Polyphosphoester (PPEs).^[88] Ihr hoher Grad an Modularität und biologischer Abbaubarkeit macht sie für Nanoträgersysteme interessant. Die Funktionalisierung mit Poly(ethylenethylphosphat) (PEEP) verringert die Proteinadsorption auf PS-NPs und die Aufnahme durch RAW264.7-Makrophagen, vergleichbar zu PEG. Interessanterweise erwies sich der durch PEG und PEEP verursachte Stealth-Effekt als abhängig von der Proteinadsorption und einem spezifischen Protein, nämlich Clusterin (oder APOJ), das für diesen Mechanismus entscheidend zu sein scheint. Diese Erkenntnisse vermitteln uns eine neue Sicht auf den Mechanismus des Stealth-Effekts, bei dem spezifische, an die Nanoträger adsorbierte Proteine den Stealth-Effekt bewirken. Demzufolge muss die zugrunde liegende Oberflächenfunktionalisierung die gewünschten Proteine anziehen, anstatt selbst für den Effekt verantwortlich zu sein (Abbildung 3; weitere Proteine, die die zelluläre Aufnahme verhindern, siehe Abschnitt 7). Dies widerspricht der Ansicht, dass allein die Proteinmenge für den Stealth-Effekt verantwortlich ist.

7. Bedeutung der Proteinkorona für physiologische Antworten

Die Interaktion von Nanoträgern mit Zellen, einschließlich immunologischer Reaktionen und Internalisierungspro-

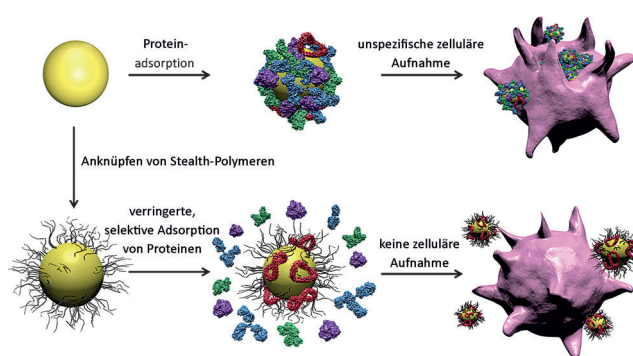


Abbildung 3. Neue Sichtweise auf den Stealth-Effekt. Oben: Unfunktionalisierte Nanoträger werden opsonisiert und durch Phagozyten erkannt. Unten: Die Anbindung von Stealth-Polymeren führt zu einer verringerten Proteinadsorption, allerdings adsorbieren spezifische Proteine wie Clusterin an die funktionalisierten Nanoträger und verhindern so die Aufnahme durch Immunzellen.

zesse, wird von adsorbierenden Proteinen bestimmt. Sogar der intrazelluläre Transport und die Lokalisierung sind von adsorbierten Proteinen abhängig.^[89] Diese Effekte können unvorteilhaft sein, wie in Abschnitt 6 für die unspezifische Phagozytose opsonisierter NPs beschrieben. Zwei weitere Aspekte der Proteinadsorption haben Interesse gefunden: 1) Die Adsorption von Proteinen kann Konformationsänderungen in der Proteinstruktur bewirken.^[90] Strukturveränderungen führen zu Funktionsverlust der Proteine,^[91] und die Freilegung kryptischer Epitope könnte eine unangemessene Immunreaktion auslösen.^[92] 2) Wie in Abschnitt 6 beschrieben, können Proteine, die an Nanopartikeln anhaften, die mit Antikörpern oder Liganden ausgestattet sind, letztere überdecken. Dadurch werden die Targeting-Fähigkeit der modifizierten Nanopartikel und damit die Erkennung durch den spezifischen Zellrezeptor beeinträchtigt.^[9,93]

Proteinadsorption kann allerdings auch von Vorteil sein: Eine generelle Verringerung der unspezifischen Zellaufnahme durch das Vorhandensein einer Proteinkorona wurde für mehrere Nanopartikel beschrieben;^[94] dieser Effekt resultiert zudem in einer verringerten Toxizität der Nanoträger.^[95] Eine zufallsbasierte Internalisierung wird vermutlich durch die verminderte Interaktion der Nanopartikel mit der Zellmembran infolge einer Abschirmung durch die adsorbierten Proteine verhindert. Proteine, die diesen Effekt bei phagozytischen Zellen auslösen, nennt man Dysopsonine. Albumin und Apolipoproteine wurden als Proteine mit einem dysopsonisierenden Charakter beschrieben, der die Bluthalbwertszeit von Nanoträgern verlängert.^[19,23,64] In der Tat wurde gezeigt, dass das Umhüllen von Polymer-NPs mit humanem Serumalbumin (HSA) die Blutzirkulation der Nanopartikel verbessert.^[96] Die Apolipoproteine A4 und C3 sind weitere Proteine, die die Nanopartikelaufnahme in humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) reduzieren, was die generelle Rolle der Lipoproteine als Dysopsonine untermauert.^[97] Interessanterweise wurde APOH (oder Beta-2-glycoprotein I) als ein Protein beschrieben, das die Internalisierung von Nanopartikeln in hMSCs fördert, was zu einer komplexeren Sicht auf die Wirkung der Apolipoproteine in der Proteinkorona führt.^[97,98]

Ursprünglich wurden Studien zu Stealth-Materialien von der Suche nach proteinabweisenden Oberflächenmodifikationen und dem Bedarf an verlängerten Blutzirkulationszeiten bestimmt – die Vorstellung von der Proteinkorona ändert sich nun allerdings. Da ihre Bildung unvermeidlich ist und sogar der Stealth-Effekt von der Proteinadsorption abhängt,^[88] beginnt man, über ihre Nutzung zum gezielten Wirkstoff-Transport nachzudenken. Im Unterschied zu den oben genannten, unspezifischen Interaktionen von Proteinen und Zellen könnte eine spezifische Aufnahme von Nanoträgern begünstigt werden, wenn rezeptorspezifische Proteine in der Proteinkorona vorhanden sind.^[95] Einige Blutproteine haben bekannte zelluläre Bindungsstellen, wie den Transferin-Rezeptor, der auf verschiedensten Zellen exprimiert wird.^[99] Endothelzellen exprimieren ein Albumin-bindendes Glykoprotein,^[100] und viele Rezeptoren für Apolipoprotein-Komplexe wurden bereits beschrieben.^[101] Der bekannteste Rezeptor für Lipoproteine ist der Scavenger-Rezeptor Klasse B Typ 1 (SR-B1), der nicht nur im Gehirn, der Leber und dem Darm exprimiert wird, sondern auch auf Endothelzellen und Makrophagen.^[23] Er ist für den bidirektionalen Lipidtransfer zwischen LDL, HDL und Zellen verantwortlich.^[102] Demnach könnten Nanopartikel, die mit Apolipoproteinen umhüllt sind, HDL imitieren und so mit Scavenger-Rezeptoren wechselwirken. Eine Prostatakarzinom-Zelllinie, die große Mengen an Scavenger-Rezeptoren exprimiert, wurde bereits durch Lipid-Nanopartikel mit einer stark Apolipoprotein-haltigen Proteinkorona adressiert.^[23] Die Umhüllung von Nanopartikeln mit einzelnen Proteinen wurde für das Targeting bestimmter Organe genutzt. Zum Beispiel fördern die Apolipoproteine APOE, APOA1 und APOB-100 den Transport in das zentrale Nervensystem.^[103] Es wird angenommen, dass an Nanopartikel angeheftetes APOE den Transport der Nanopartikel durch die Blut-Hirn-Schranke erleichtert, vermutlich durch die Interaktion mit Lipoprotein-Rezeptoren auf den Membranen der Endothelzellen der Hirnkapillaren.^[104] Mithilfe dieses Ansatzes könnten sich nicht nur bahnbrechende Neurotherapien entwickeln lassen; diese Ergebnisse sind auch im Kontext der Neurotoxizität von größter Bedeutung.^[42] Des Weiteren könnte man Apolipoproteine auch für das selektive Targeting von Hepatozyten der Leber verwenden.^[105] Außerdem wurde festgestellt, dass Fetuin an der Nanopartikel-Aufnahme in hepatische Makrophagen durch Scavenger-Rezeptoren beteiligt ist.^[106]

Bislang wurde die biologische Bedeutung nur im Fall von einigen wenigen Koronaproteinen definiert. Genau zu verstehen, welche Proteine das Schicksal eines Nanoträgers festlegen, ist entscheidend für den Erfolg der künstlichen, zielgerichtet aufgenommenen Nanoträger. Die Optimierung der Nanoträger-Eigenschaften, um die Proteinkorona für spezifische biomedizinische Anwendungen nutzbar zu machen, ist von großem Interesse.^[107]

Danksagung

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ihre Unterstützung durch Förderung des SFB1066.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 8806–8815
Angew. Chem. **2016**, 128, 8950–8959

- [1] M. E. Davis, Z. Chen, D. M. Shin, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2008**, 7, 771–782.
- [2] J. Dausend, A. Musyanovych, M. Dass, P. Walther, H. Schrenzenmeier, K. Landfester, V. Mailänder, *Macromol. Biosci.* **2008**, 8, 1135–1143; A. Musyanovych, J. Dausend, M. Dass, P. Walther, V. Mailänder, K. Landfester, *Acta Biomater.* **2011**, 7, 4160–4168.
- [3] M. Rahman, S. Laurent, N. Tawil, L. Yahia, M. Mahmoudi, *Protein-Nanoparticle-Interactions, The Bio-Nano Interface*, Springer Series in Biophysics, Vol. 15, Springer-Verlag Berlin, **2013**.
- [4] S. Mitragotri, P. A. Burke, R. Langer, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2014**, 13, 655–672.
- [5] J. M. Morachis, E. A. Mahmoud, A. Almutairi, *Pharmacol. Rev.* **2012**, 64, 505–519.
- [6] Z. Zhang, J. Jia, Y. Lai, Y. Ma, J. Weng, L. Sun, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 5528–5534.
- [7] L. E. van Vlerken, M. M. Amiji, *Expert Opin. Drug Delivery* **2006**, 3, 205–216.
- [8] A. Bicho, I. N. Peca, A. C. Roque, M. M. Cardoso, *Int. J. Pharm.* **2010**, 399, 80–86.
- [9] 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.
- [10] B. Kang, P. Okwieka, S. Schöttler, S. Winzen, J. Langhanki, K. Mohr, T. Opatz, V. Mailänder, K. Landfester, F. R. Wurm, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 7436–7440; *Angew. Chem.* **2015**, 127, 7544–7548.
- [11] D. D. Von Hoff, T. Ervin, F. P. Arena, E. G. Chiorean, J. Infante, M. Moore, T. Seay, S. A. Tjulandin, W. W. Ma, M. N. Saleh, M. Harris, M. Reni, S. Dowden, D. Laheru, N. Bahary, R. K. Ramanathan, J. Tabernero, M. Hidalgo, D. Goldstein, E. Van Cutsem, X. Wei, J. Iglesias, M. F. Renschler, *N. Engl. J. Med.* **2013**, 369, 1691–1703.
- [12] Y. Barenholz, *J. Controlled Release* **2012**, 160, 117–134.
- [13] D. Walczyk, F. B. Bombelli, M. P. Monopoli, I. Lynch, K. A. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 5761–5768.
- [14] 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.
- [15] 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, 772–781.
- [16] C. D. Walkey, W. C. Chan, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 2780–2799.
- [17] E. Hellstrand, I. Lynch, A. Andersson, T. Drakenberg, B. Dahlback, K. A. Dawson, S. Linse, T. Cedervall, *FEBS J.* **2009**, 276, 3372–3381.
- [18] M. Lundqvist, J. Stigler, G. Elia, I. Lynch, T. Cedervall, K. A. Dawson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 14265–14270.
- [19] 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.
- [20] N. P. Mortensen, G. B. Hurst, W. Wang, C. M. Foster, P. D. Nallathambi, S. T. Retterer, *Nanoscale* **2013**, 5, 6372–6380.
- [21] E. Casals, T. Pfaller, A. Duschl, G. J. Oostingh, V. Puentes, *ACS Nano* **2010**, 4, 3623–3632.
- [22] Z. J. Deng, G. Mortimer, T. Schiller, A. Musumeci, D. Martin, R. F. Minchin, *Nanotechnology* **2009**, 20, 455101.
- [23] A. L. Barrán-Berdón, D. Pozzi, G. Caracciolo, A. L. Capriotti, G. Caruso, C. Cavaliere, A. Riccioli, S. Palchetti, A. Laganà, *Langmuir* **2013**, 29, 6485–6494.

- [24] C. A. Royer, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1769–1784; C. Rocker, M. Potzl, F. Zhang, W. J. Parak, G. U. Nienhaus, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 577–580.
- [25] L. Shang, Y. Wang, J. Jiang, S. Dong, *Langmuir* **2007**, *23*, 2714–2721.
- [26] 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; S. Winzen, S. Schöttler, G. Baier, C. Rosenauer, V. Mailänder, K. Landfester, K. Mohr, *Nanoscale* **2015**, *7*, 2992–3001.
- [27] Y. Cheng, M. Wang, G. Borghs, H. Chen, *Langmuir* **2011**, *27*, 7884–7891; S. Linse, C. Cabaleiro-Lago, W.-F. Xue, I. Lynch, S. Lindman, E. Thulin, S. E. Radford, K. A. Dawson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 8691–8696.
- [28] A. S. Pitek, D. O'Connell, E. Mahon, M. P. Monopoli, F. B. Bombelli, K. A. Dawson, *PLoS One* **2012**, *7*, e40685.
- [29] I. Delfino, S. Cannistraro, *Biophys. Chem.* **2009**, *139*, 1–7; J. Bhattacharya, U. Choudhuri, O. Siwach, P. Sen, A. K. Dasgupta, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2006**, *2*, 191–199.
- [30] Z. J. Deng, M. Liang, M. Monteiro, I. Toth, R. F. Minchin, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 39–44; S. H. D. P. Lacerda, J. J. Park, C. Meuse, D. Pristinski, M. L. Becker, A. Karim, J. F. Douglas, *ACS Nano* **2010**, *4*, 365–379.
- [31] K. K. Chittur, *Biomaterials* **1998**, *19*, 357–369; T. Wang, J. Bai, X. Jiang, G. U. Nienhaus, *ACS Nano* **2012**, *6*, 1251–1259.
- [32] M. Shao, L. Lu, H. Wang, S. Luo, D. Ma, *Microchim. Acta* **2009**, *164*, 157–160; X. C. Shen, X. Y. Liou, L. P. Ye, H. Liang, Z. Y. Wang, *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *311*, 400–406; L.-J. Xu, C. Zong, X.-S. Zheng, P. Hu, J.-M. Feng, B. Ren, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 2238–2245.
- [33] M. Mahmoudi, M. A. Shokrgozar, S. Sardari, M. K. Moghadam, H. Vali, S. Laurent, P. Stroeve, *Nanoscale* **2011**, *3*, 1127–1138; M. Mahmoudi, S. Sant, B. Wang, S. Laurent, T. Sen, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2011**, *63*, 24–46.
- [34] K. Thode, M. Lück, W. Semmler, R. H. Müller, M. Kresse, *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 905–910.
- [35] U. Sakulku, M. Mahmoudi, L. Maurizi, J. Salaklang, H. Hofmann, *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 5020.
- [36] M. Lück, B. R. Paulke, W. Schröder, T. Blunk, R. H. Müller, *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *39*, 478–485.
- [37] B. Muthusamy, G. Hanumanth, S. Suresh, B. Rekha, D. Srinivas, L. Karthick, B. M. Vrushabendra, S. Sharma, G. Mishra, P. Chatterjee, K. S. Mangala, H. N. Shivashankar, K. N. Chandrika, N. Deshpande, M. Suresh, N. Kannabiran, V. Niranjan, A. Nalli, T. S. K. Prasad, K. S. Arun, R. Reddy, S. Chandran, T. Jadhav, D. Julie, M. Mahesh, S. L. John, K. Palvankar, D. Sudhir, P. Bala, N. S. Rashmi, G. Vishnupriya, K. Dhar, S. Reshma, R. Chaerkady, T. K. B. Gandhi, H. C. Harsha, S. S. Mohan, K. S. Deshpande, M. Sarker, A. Pandey, *Proteomics* **2005**, *5*, 3531–3536; N. L. Anderson, N. G. Anderson, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 845–867.
- [38] T. Cedervall, I. Lynch, M. Foy, T. Berggärd, S. C. Donnelly, G. Cagney, S. Linse, K. A. Dawson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5754–5756; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5856–5858.
- [39] S. Tenzer, D. Docter, S. Rosfa, A. Wlodarski, J. Kuharev, A. Reik, S. K. Knauer, C. Bantz, T. Nawroth, C. Bier, J. Siriratanapan, W. Mann, L. Treuel, R. Zellner, M. Maskos, H. Schild, R. H. Stauber, *ACS Nano* **2011**, *5*, 7155–7167.
- [40] J. E. Diederichs, *Electrophoresis* **1996**, *17*, 607–611.
- [41] M. P. Monopoli, C. Aberg, A. Salvati, K. A. Dawson, *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 779–786.
- [42] I. Lynch, K. A. Dawson, *Nano Today* **2008**, *3*, 40–47.
- [43] H. R. Kim, K. Andrieux, C. Delomenie, H. Chacun, M. Appel, D. Desmaele, F. Taran, D. Georgin, P. Couvreur, M. Taverna, *Electrophoresis* **2007**, *28*, 2252–2261.
- [44] D. Dell'Orco, M. Lundqvist, C. Oslakovic, T. Cedervall, S. Linse, *PLoS One* **2010**, *5*, e10949.
- [45] C. D. Walkey, J. B. Olsen, H. Guo, A. Emili, W. C. Chan, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2139–2147.
- [46] S. Nagayama, K. Ogawara, Y. Fukuoaka, K. Higaki, T. Kimura, *Int. J. Pharm.* **2007**, *342*, 215–221.
- [47] E. Allemann, P. Gravel, J. C. Leroux, L. Balant, R. Gurny, *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, *37*, 229–234.
- [48] P. M. Kelly, C. Aberg, E. Polo, A. O'Connell, J. Cookman, J. Fallon, Z. Krpetic, K. A. Dawson, *Nat. Nanotechnol.* **2015**, *10*, 472–479.
- [49] L. Vroman, *Nature* **1962**, *196*, 476–477; L. Vroman, A. L. Adams, G. C. Fischer, P. C. Muñoz, *Blood* **1980**, *55*, 156–159.
- [50] T. Blunk, M. Lück, A. Calvör, D. F. Hochstrasser, J. C. Sanchez, B. W. Müller, R. H. Müller, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1996**, *42*, 262–268.
- [51] T. M. Göppert, R. H. Müller, *Int. J. Pharm.* **2005**, *302*, 172–186.
- [52] M. Jansch, P. Stumpf, C. Graf, E. Rühl, R. H. Müller, *Int. J. Pharm.* **2012**, *428*, 125–133.
- [53] S. Harnisch, R. H. Müller, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *49*, 41–46.
- [54] M. A. Dobrovolskaia, B. W. Neun, S. Man, X. Ye, M. Hansen, A. K. Patri, R. M. Crist, S. E. McNeil, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2014**, *10*, 1453–1463.
- [55] M. Lundqvist, J. Stigler, T. Cedervall, T. Berggärd, M. B. Flanagan, I. Lynch, G. Elia, K. Dawson, *ACS Nano* **2011**, *5*, 7503–7509.
- [56] L. Nuhn, S. Tomcin, K. Miyata, V. Mailänder, K. Landfester, K. Kataoka, R. Zentel, *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 4111–4121; S. Tomcin, G. Baier, K. Landfester, V. Mailänder, *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 5471–5489.
- [57] M. Mahmoudi, V. Serpooshan, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 18275–18283; A. Schrade, V. Mailänder, S. Ritz, K. Landfester, U. Ziener, *Macromol. Biosci.* **2012**, *12*, 1459–1471.
- [58] M. Schäffler, M. Semmler-Behnke, H. Sarioglu, S. Takenaka, A. Wenk, C. Schleh, S. M. Hauck, B. D. Johnston, W. G. Kreyling, *Nanotechnology* **2013**, *24*, 265103.
- [59] A. A. Saie, M. Ray, M. Mahmoudi, V. M. Rotello, *Cancer Treat. Res.* **2015**, *166*, 245–273; S.-T. Yang, Y. Liu, Y.-W. Wang, A. Cao, *Small* **2013**, *9*, 1635–1653.
- [60] M. S. Ehrenberg, A. E. Friedman, J. N. Finkelstein, G. Oberdorster, J. L. McGrath, *Biomaterials* **2009**, *30*, 603–610.
- [61] A. Gessner, R. Waicz, A. Lieske, B. Paulke, K. Mader, R. H. Müller, *Int. J. Pharm.* **2000**, *196*, 245–249.
- [62] J. Wolfram, Y. Yang, J. Shen, A. Moten, C. Chen, H. Shen, M. Ferrari, Y. Zhao, *Colloids Surf. B* **2014**, *124*, 17–24; F. Alexis, E. Pridgen, L. K. Molnar, O. C. Farokhzad, *Mol. Pharmaceutics* **2008**, *5*, 505–515.
- [63] M. Mahmoudi, I. Lynch, M. R. Ejtehadi, M. P. Monopoli, F. B. Bombelli, S. Laurent, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 5610–5637; C. C. Fleischer, C. K. Payne, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 8901–8907.
- [64] P. Aggarwal, J. B. Hall, C. B. McLeland, M. A. Dobrovolskaia, S. E. McNeil, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, *61*, 428–437.
- [65] A. Gessner, A. Lieske, B.-R. Paulke, R. H. Müller, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2003**, *65A*, 319–326.
- [66] M. Gasser, B. Rothen-Rutishauser, H. Krug, P. Gehr, M. Nelle, B. Yan, P. Wick, *J. Nanobiotechnol.* **2010**, *8*, 31.
- [67] S. Laurent, C. Burtea, C. Thirifays, F. Rezaee, M. Mahmoudi, *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *392*, 431–445.
- [68] S. Schöttler, K. Klein, K. Landfester, V. Mailänder, *Nanoscale* **2016**, *8*, 5526–5536.
- [69] M. J. Hajipour, S. Laurent, A. Aghaie, F. Rezaee, M. Mahmoudi, *Biomater. Sci.* **2014**, *2*, 1210–1221.
- [70] M. Ghavami, S. Saffar, B. A. Emamy, A. Peirovi, M. A. Shokrgozar, V. Serpooshan, M. Mahmoudi, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 1119–1126.
- [71] M. Mahmoudi, A. M. Abdelmonem, S. Behzadi, J. H. Clement, S. Dutz, M. R. Ejtehadi, R. Hartmann, K. Kantner, U. Linne, P. Maffre, S. Metzler, M. K. Moghadam, C. Pfeiffer, M. Rezaei, P.

- Ruiz-Lozano, V. Serpooshan, M. A. Shokrgozar, G. U. Nienhaus, W. J. Parak, *ACS Nano* **2013**, 7, 6555–6562.
- [72] Z. Amoozgar, Y. Yeo, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2012**, 4, 219–233.
- [73] A. Abuchowski, J. R. McCoy, N. C. Palczuk, T. van Es, F. F. Davis, *J. Biol. Chem.* **1977**, 252, 3582–3586; K. R. Reddy, T. L. Wright, P. J. Pockros, M. Shiffman, G. Everson, R. Reindollar, M. W. Fried, P. P. Purdum, D. Jensen, C. Smith, W. M. Lee, T. D. Boyer, A. Lin, S. Pedder, J. DePamphilis, *Hepatology* **2001**, 33, 433–438.
- [74] R. Gref, M. Lück, P. Quellec, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnisch, T. Blunk, R. H. Müller, *Colloids Surf. B* **2000**, 18, 301–313.
- [75] S. Essa, J. M. Rabanel, P. Hildgen, *Int. J. Pharm.* **2011**, 411, 178–187; P. Ebrahimnejad, R. Dinarvand, M. R. Jafari, S. A. Tabasi, F. Atyabi, *Int. J. Pharm.* **2011**, 406, 122–127.
- [76] A. L. Klibanov, K. Maruyama, V. P. Torchilin, L. Huang, *FEBS Lett.* **1990**, 268, 235–237; T. M. Allen, C. B. Hansen, D. E. L. de Menezes, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1995**, 16, 267–284.
- [77] S. I. Jeon, J. H. Lee, J. D. Andrade, P. G. De Gennes, *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, 142, 149–158.
- [78] A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, J. P. Benoit, *Biomaterials* **2006**, 27, 4356–4373.
- [79] K. Bergström, K. Holmberg, A. Safranji, A. S. Hoffman, M. J. Edgell, A. Kozlowski, B. A. Hovanes, J. M. Harris, *J. Biomed. Mater. Res.* **1992**, 26, 779–790.
- [80] T. Niidome, M. Yamagata, Y. Okamoto, Y. Akiyama, H. Takahashi, T. Kawano, Y. Katayama, Y. Niidome, *J. Controlled Release* **2006**, 114, 343–347.
- [81] T. Ishida, M. Ichihara, X. Wang, K. Yamamoto, J. Kimura, E. Majima, H. Kiwada, *J. Controlled Release* **2006**, 112, 15–25; T. Ishida, H. Kiwada, *Biol. Pharm. Bull.* **2013**, 36, 889–891.
- [82] S. Shah, T. Prematta, N. F. Adkinson, F. T. Ishmael, *J. Clin. Pharmacol.* **2013**, 53, 352–355.
- [83] N. Bertrand, J. C. Leroux, *J. Controlled Release* **2012**, 161, 152–163.
- [84] M. Fichter, G. Baier, M. Dedters, L. Pretsch, A. Pietrzak-Nguyen, K. Landfester, S. Gehring, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2013**, 9, 1223–1234; H. Freichels, M. Wagner, P. Okwieka, R. G. Meyer, V. Mailänder, K. Landfester, A. Musyanovych, *J. Mater. Chem. B* **2013**, 1, 4338–4348.
- [85] G. Baier, D. Baumann, J. M. Siebert, A. Musyanovych, V. Mailänder, K. Landfester, *Biomacromolecules* **2012**, 13, 2704–2715.
- [86] B. Kang, P. Okwieka, S. Schöttler, 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.
- [87] A. Besheer, J. Vogel, D. Glanz, J. Kressler, T. Groth, K. Mäder, *Mol. Pharmaceutics* **2009**, 6, 407–415.
- [88] S. Schöttler, G. Becker, S. Winzen, T. Steinbach, K. Mohr, K. Landfester, V. Mailänder, F. R. Wurm, *Nat. Nanotechnol.* **2016**, 11, 372–377.
- [89] D. Hofmann, S. Tenzer, M. B. Bannwarth, C. Messerschmidt, S.-F. Glaser, H. Schild, K. Landfester, V. Mailänder, *ACS Nano* **2014**, 8, 10077–10088; F. Bertoli, G. L. Davies, M. P. Monopoli, M. Moloney, Y. K. Gun'ko, A. Salvati, K. A. Dawson, *Small* **2014**, 10, 3307–3315.
- [90] N. Brandes, P. B. Welzel, C. Werner, L. W. Kroh, *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, 299, 56–69; L. Treuel, G. Nienhaus, *Biophys. Rev.* **2012**, 4, 137–147.
- [91] A. A. Vertegel, R. W. Siegel, J. S. Dordick, *Langmuir* **2004**, 20, 6800–6807.
- [92] I. Lynch, K. A. Dawson, S. Linse, *Sci. STKE* **2006**, pe14; A. E. Nel, L. Madler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V. Hoek, P. Somaundaran, F. Klaessig, V. Castranova, M. Thompson, *Nat. Mater.* **2009**, 8, 543–557.
- [93] V. Mirshafiee, M. Mahmoudi, K. Lou, J. Cheng, M. L. Kraft, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 2557–2559.
- [94] G. Wang, M. R. Papasani, P. Cheguru, P. J. Hrdlicka, R. A. Hill, *Nanomedicine* **2012**, 8, 822–832; P. C. Patel, D. A. Giljohann, W. L. Daniel, D. Zheng, A. E. Prigodich, C. A. Mirkin, *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21, 2250–2256; X. Jiang, S. Weise, M. Hafner, C. Rocker, F. Zhang, W. J. Parak, G. U. Nienhaus, *J. R. Soc. Interface* **2010**, 7, S5–S13; A. Lesniak, F. Fenaroli, M. P. Monopoli, C. Aberg, K. A. Dawson, A. Salvati, *ACS Nano* **2012**, 6, 5845–5857; A. Lesniak, A. Salvati, M. J. Santos-Martinez, M. W. Radomski, K. A. Dawson, C. Aberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 1438–1444; O. Lunov, T. Syrovets, C. Loos, J. Beil, M. Delacher, K. Tron, G. U. Nienhaus, A. Musyanovych, V. Mailänder, K. Landfester, T. Simmet, *ACS Nano* **2011**, 5, 1657–1669.
- [95] E. Brun, C. Sicard-Roselli, *Cancer Nanotechnol.* **2014**, 5, 7.
- [96] Q. Peng, S. Zhang, Q. Yang, T. Zhang, X. Q. Wei, L. Jiang, C. L. Zhang, Q. M. Chen, Z. R. Zhang, Y. F. Lin, *Biomaterials* **2013**, 34, 8521–8530.
- [97] S. Ritz, S. Schöttler, N. Kotman, G. Baier, A. Musyanovych, J. Kuharev, K. Landfester, H. Schild, O. Jahn, S. Tenzer, V. Mailänder, *Biomacromolecules* **2015**, 16, 1311–1321.
- [98] I. Brüstle, T. Simmet, G. U. Nienhaus, K. Landfester, V. Mailänder, *Beilstein J. Nanotechnol.* **2015**, 6, 383–395.
- [99] P. Ponka, C. N. Lok, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1999**, 31, 1111–1137.
- [100] J. E. Schnitzer, *Am. J. Physiol.* **1992**, 262, H246–H254.
- [101] H. R. Kim, S. Gil, K. Andrieux, V. Nicolas, M. Appel, H. Chacun, D. Desmaele, F. Taran, D. Georgin, P. Couvreur, *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, 64, 356–364.
- [102] V. I. Zannis, A. Chroni, M. Krieger, *J. Mol. Med.* **2006**, 84, 276–294.
- [103] H. R. Kim, K. Andrieux, S. Gil, M. Taverna, H. Chacun, D. Desmaele, F. Taran, D. Georgin, P. Couvreur, *Biomacromolecules* **2007**, 8, 793–799; J. Kreuter, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, 64, 213–222; J. Kreuter, T. Hekmatara, S. Dreis, T. Vogel, S. Gelperina, K. Langer, *J. Controlled Release* **2007**, 118, 54–58.
- [104] K. Michaelis, M. M. Hoffmann, S. Dreis, E. Herbert, R. N. Alyautdin, M. Michaelis, J. Kreuter, K. Langer, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, 317, 1246–1253; A. Zensi, D. Begley, C. Pontikis, C. Legros, L. Mihoreanu, S. Wagner, C. Büchel, H. von Briesen, J. Kreuter, *J. Controlled Release* **2009**, 137, 78–86.
- [105] C. L. Bisgaier, M. V. Siebenkas, K. J. Williams, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 862–866; P. C. Rensen, M. C. van Dijk, E. C. Havenaar, M. K. Bijsterbosch, J. K. Kruijt, T. J. van Berkel, *Nat. Med.* **1995**, 1, 221–225.
- [106] S. Nagayama, K. i. Ogawara, K. Minato, Y. Fukuoka, Y. Takakura, M. Hashida, K. Higaki, T. Kimura, *Int. J. Pharm.* **2007**, 329, 192–198.
- [107] A. Cifuentes-Rius, H. de Puig, J. C. Y. Kah, S. Borros, K. Hamad-Schifferli, *ACS Nano* **2013**, 7, 10066–10074; J. C. Kah, J. Chen, A. Zubieta, K. Hamad-Schifferli, *ACS Nano* **2012**, 6, 6730–6740; C. D. Walkey, J. B. Olsen, F. Y. Song, R. Liu, H. B. Guo, D. W. H. Olsen, Y. Cohen, A. Emili, W. C. W. Chan, *ACS Nano* **2014**, 8, 2439–2455.

Eingegangen am 3. März 2016,
veränderte Fassung am 21. April 2016
Online veröffentlicht am 15. Juni 2016