

Polyvinylalkohol als biokompatibles Polymer zur Passivierung von Goldnanostäbchen**

Calum Kinnear, David Burnand, Martin J. D. Clift, Andreas F. M. Kilbinger, Barbara Rothen-Rutishauser und Alke Petri-Fink*

Abstract: Die Oberflächenfunktionalisierung von Goldnanostäbchen mit Polymeren ist aufgrund der daraus resultierenden kolloidalen Stabilität und der Bioverträglichkeit der Nanopartikel von großer Bedeutung. Die normalerweise vorhandene giftige Doppelschicht aus dem kationischen Tensid Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), das an die Oberfläche der Nanostäbchen adsorbiert ist, erschwert diesen Prozess jedoch erheblich. Nachstehend erläutern wir eine Strategie zur biokompatiblen Funktionalisierung der Nanostäbchen mit hydrophoben Polymervorläufern, hier Polyvinylacetat, die anschließend in ihr hydrophiles Gegenstück, Polyvinylalkohol, überführt werden. Dieses Polymer wurde aufgrund seiner hohen Bioverträglichkeit, den veränderbaren hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften und dem hohen Funktionalisierungsgrad gewählt. Die Verträglichkeit der oberflächenfunktionalisierten Goldnanostäbchen wurde an primären Makrophagen, die aus Monozyten differenziert wurden, getestet; die Vorteile der veränderlichen hydrophoben Eigenschaften wurden durch die langfristig stabile Einkapselung eines hydrophoben Beispielmedikaments gezeigt.

Goldnanostäbchen (gold nanorods; GNRs) sind aufgrund ihrer faszinierenden optischen und elektrischen Eigenschaften, die oft allein durch ihre Größe oder ihren Formfaktor bestimmt werden, für viele Anwendungen interessant.^[1] In den letzten zehn Jahren wurde die Synthese optimiert, was zu monodispersen GNRs kontrollierter Größe und spezifischen Ausbeuten von fast 100% führte.^[2] Wie mit den meisten Nanopartikeln müssen diese Stäbchen vor Gebrauch zuerst funktionalisiert werden, z. B. mit Zielliganden, anorganischen Hüllen oder stabilisierenden Polymeren. Bei GNRs ist dies eine komplexere Angelegenheit als bei den sphärischen Goldnanopartikeln, vor allem wegen des in der Synthese verwendeten zelltoxischen Tensids und den zwei unterschiedlichen Krümmungen des Stäbchens an den Enden und

den Seiten.^[3] Es ist wichtig zu erwähnen, dass das Tensid als teilweise vernetzte Doppelschicht auf den GNRs vorhanden ist, was die Funktionalisierung weiter verkompliziert, da die Destabilisierung der Doppelschicht negative Auswirkung auf die kolloidale Stabilität hat.

Trotz der großen Zahl an Publikationen über GNRs (7000 von 2002 bis 2012, ISI Web of Knowledge), wird in den meisten Fällen nur Polyethylenglykol (PEG) zur Entgiftung der GNR-Suspension verwendet. Es gibt jedoch einige wenige Studien, in denen entweder ein CTAB-ähnliches Monomer innerhalb der Doppelschicht polymerisiert wurde,^[4] oder CTAB selbst mit verträglichen Polyelektrolyten oder amphiphilen Polymeren beschichtet wurde, z. B. mit Polyvinylpyrrolidon.^[5] Ein Grund für die häufige Verwendung von PEG zur Funktionalisierung von GNRs könnte seine amphiphile Natur sein, was ein leichteres „Durchkommen“ durch die CTAB-Doppelschicht ermöglicht und somit die Funktionalisierung der Goldoberfläche mit einer terminalen Thiolgruppe erlaubt. Wir konnten jedoch zeigen, dass die oft einfache Funktionalisierung mit Thiol-PEG durch simples Mischen vor allem bei niedrigen PEG-Konzentrationen nicht ausreicht, da ein Ligandenaustausch zuerst an den Enden, im Folgenden dann auf der ganzen Oberfläche der GNRs stattfindet.^[6]

Es ist äußerst wichtig, alternative Polymere zur Passivierung der Oberfläche von GNRs zu verwenden. Es existieren allerdings einige Einschränkungen, vor allem, wenn PEG verwendet wird. Es konnte gezeigt werden, dass die PEG-Beschichtung von Liposomen die Durchlässigkeit für das enthaltene Medikament,^[7] sowie die Anregung von Immunantworten durch Komplementaktivierung induziert.^[8] Weiterhin wurden anti-PEG-Antikörper in einer Gruppe gesunder Menschen gefunden. Die Exposition ist dabei wahrscheinlich auf die vermehrte Verwendung von PEG in pharmazeutischen Produkten, Nahrungsmitteln und Kosmetika zurückzuführen.^[9] Die erwähnten Antikörper verursachten in den beschriebenen Studien außerdem eine Verringerung der Zirkulationszeit von PEG-beschichteten Substanzen in vivo und erhöhten die Beseitigung aus dem Blut nach wiederholter Verabreichung.^[10] Außerdem ist bekannt, dass PEG den Nanopartikeln eine gewisse „Tarnung“ verleiht, was eine gezielte Anwendung auf ein spezielles biologisches Ziel, z. B. das Immunsystem, erschwert.^[11] Auch gibt es einen dauerhaften Diskurs über die Bedeutung von „tumor targeting“, also der gezielten Identifizierung und Bindung von und an Tumorzellen, durch vaskuläre Durchlässigkeit mithilfe von Nanopartikeln, als auch über die möglichen Nebenwirkungen durch die verlängerte Exposition mit toxischen Bestandteilen im Blut.^[12] Zusätzlich zu den oben erwähnten Einschränkungen

[*] C. Kinnear, D. Burnand, Dr. M. J. D. Clift, Prof. A. F. M. Kilbinger, Prof. B. Rothen-Rutishauser, Prof. A. Petri-Fink
Adolphe Merkle Institut, Universität Freiburg
1723 Marly (Schweiz)
E-Mail: alke.fink@unifr.ch

C. Kinnear, D. Burnand, Prof. A. F. M. Kilbinger, Prof. A. Petri-Fink
Department Chemie, Universität Freiburg
1700 Freiburg (Schweiz)

[**] Diese Arbeit wurde durch den Schweizerischen Nationalfonds (PP00P2_123373), das Adolphe Merkle Institut und FRImat unterstützt. Wir danken Carola Endes für die Übersetzung des Manuskripts.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201404100> zu finden.

kungen besitzt PEG einen geringen Funktionalitätsgrad: Oft ist nur die Endgruppe reaktiv, was weitere Syntheseschritte nötig macht, um eine höhere Anzahl an funktionalen Gruppen, wie z.B. Fluorophore oder Peptide, an die Oberfläche zu binden.

Die Möglichkeit, alternative Polymere zu testen und zu verwenden, wird jedoch stark durch die Komplexität der GNR-Funktionalisierung erschwert. Um die begrenzte Anzahl von biokompatiblen Polymeren zu erweitern, wurde für diese Studie Polyvinylalkohol gewählt. Dieses Polymer zeigt eine hohe Bioverträglichkeit, „Tareigenschaften“ abhängig vom Molekulargewicht und starke hydrophile Funktionen bei veränderlichen hydrophoben Eigenschaften.^[13] Die Kombination dieser Eigenschaften mit der FDA-Zulassung von PVA in Nahrungsmitteln, pharmazeutischen Produkten und Implantaten, wie z.B. Stents, zeigt, dass PVA ein attraktiver Kandidat für die GNR-Funktionalisierung ist.

Inspiriert durch die Arbeiten von Zubarev et al.^[14] und Alkilany et al.,^[4] die ein kleines Thiol-funktionalisiertes CTAB-Analogon benutzt haben, um das Tensid von der Oberfläche der GNRs zu entfernen, haben wir die Hypothese aufgestellt, dass ein Ligandenaustausch vollständig ist, wenn der auf der Oberfläche adsorbierte Ligand und der hinzugefügte Ligand bezüglich ihrer Hydrophobie kompatibel sind. Um dies zu veranschaulichen, wurde eine standardmäßige Methode zur PEG-Beschichtung von CTAB-ummantelten GNRs in einer einstufigen Synthese in Wasser durchgeführt, bei der anstelle von PEG stark hydrophiles PVA verwendet wurde.^[6] Der Austausch war minimal, was durch ein positives Zeta-Potential von 10.4 mV zusammen mit geringer Stabilität bei hohen Salzkonzentrationen bestätigt wurde. Im Folgenden beschreiben wir den Gebrauch von Thiol-endfunktionalisiertem Polyvinylalkohol (PVAc), um die Funktionalisierung von GNRs in Dimethylformamid (DMF) zu vereinfachen, bevor das Polymer hydrolysiert und die GNRs in ein wässriges Medium überführt werden.

Der experimentelle Ablauf, um GNRs zu funktionalisieren und zu entgiften, ist in Abbildung 1 dargestellt und besteht aus folgenden Schritten: 1) GNRs werden tropfenweise unter Röhren zu einer PVAc-Lösung in DMF hinzugegeben; das PVAc wurde durch RAFT-Polymerisation von Vinylacetat und Aminolyse des RAFT-Reagens für die terminale Thiolgruppe synthetisiert. 2) Die teilweise funktionalisierten GNRs werden in eine zweite PVAc-Lösung in Methanol/Ethanol überführt, um die Menge an adsorbiertem Polymer zu erhöhen. 3) Letztendlich führt die Hydrolyse der Suspension in basischem Methanol zur Umwandlung des Polymers zu PVA, was im Ausfällen der GNRs aus der Suspension aufgrund der begrenzten Löslichkeit von PVA in Methanol resultiert. Nach mehreren Waschschritten des Niederschlags mit Methanol können die GNRs vollständig durch die Zugabe von Wasser, durch Hydratation des PVA, resuspendiert werden.

GNRs wurden in hoher Ausbeute nach einer zuvor veröffentlichten Methode mit kationischem CTAB synthetisiert.

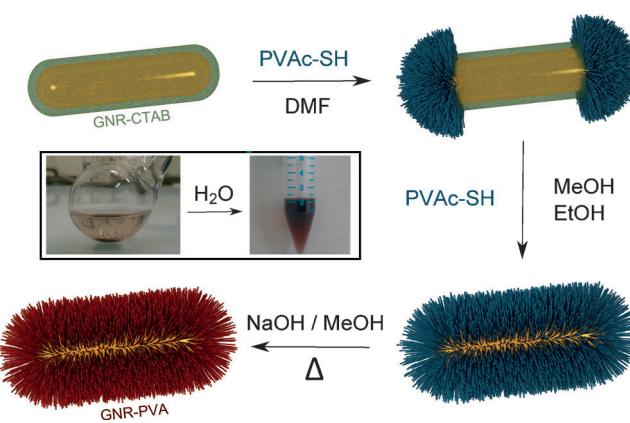
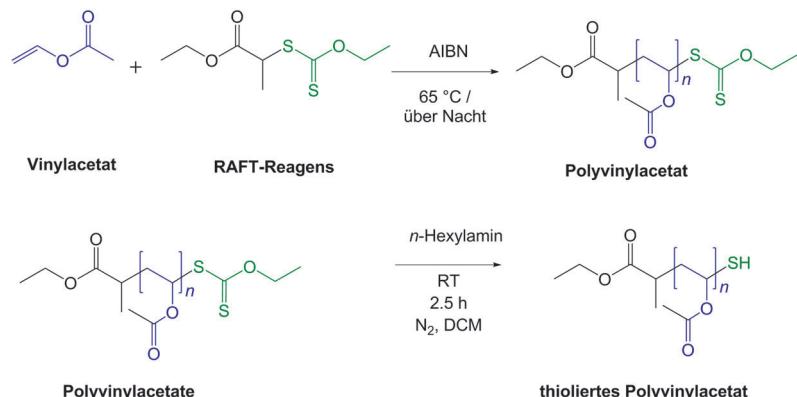


Abbildung 1. Funktionalisierung von GNRs mit PVA. Eine zweistufige Reaktion (PVAc-SH in DMF und PVAc-SH in Methanol/Ethanol) wurde durchgeführt, bevor die Hydrolyse zur Bildung einer PVA-Schicht führt. Dadurch werden die GNRs unlöslich und präzipitieren, was durch die Zugabe von Wasser umkehrbar ist (kleines Bild). Die Kopplung von hydrophoben Polymeren in DMF an den Enden von GNRs wurde zuvor gezeigt.^[16]

siert.^[6] Die Abmessungen der Stäbchen betragen nach Analyse von Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)-Bildern 57×12 nm, wobei das Verhältnis von Stäbchen zu kugelförmigen Nanopartikeln 96 % betrug. Ein bereits bestehendes Protokoll zur RAFT-gesteuerten Polymerisation von Vinylacetat wurde angepasst, und nach einer Reaktionszeit von 23 h konnte die gewünschte Endfunktionalisierung von Polyvinylacetat erreicht werden (Schema 1).^[15] Gelpermea-



Schema 1. Synthese des Thiol-endfunktionalisierten PVAc durch RAFT-Polymerisation.

tionschromatographie in Tetrahydrofuran zeigte im Durchschnitt ein Molekulargewicht von 15 kDa mit einem Polydispersitätsindex von 1.3 (siehe Hintergrundinformationen, SI). Die Thiol-funktionalisierte Form wurde durch eine Aminolyse der Xanthatgruppe unter inerter Atmosphäre (*n*-Hexylamin) erzeugt. Die vollständige (100 %) Umwandlung wurde durch ¹H-NMR-Spektroskopie bestätigt, da das Methylenignal der RAFT-Gruppe bei 4.7 ppm verschwindet.

Die erfolgreiche Bindung von PVA an die GNR-Oberfläche und das fast vollständige Entfernen von CTAB wurde mittels Zeta-Potentialmessungen, depolarisierter dynami-

scher Lichtstreuung (DDLS), Beobachtung der kolloidalen Stabilität und Untersuchung der Zelltoxizität und Immunantwort primärer Makrophagen, die hochsensitiv auf CTAB-Rückstände reagieren,^[6] bestätigt. Nach Dispersion in Wasser betrug das Zeta-Potential -19.1 mV, was eine signifikante Ladungsumkehr im Vergleich zur Ausgangsladung von $+35.5$ mV vor der Funktionalisierung (SI) darstellt. Die Dicke der PVA-Schicht wurde durch eine kombinierte Analyse aus DDLS und TEM bestimmt. Bei DDLS wurde mit Hilfe eines Goniometers die depolarisierte Autokorrelationsfunktion für mehrere Winkel durch die Verwendung von orthogonal zueinander stehenden Polarisationsfiltern aufgenommen (SI). Die daraus hervorgehenden Zerfallszeiten wurden gegen den Wellenvektor aufgetragen, um jeweils aus der Steigung und dem Schnittpunkt einer linearen Regressionskurve nach der Methode der geringsten Fehlerquadrate die Koeffizienten für Translations- (D_t) und Rotationsdiffusion ($6D_r$) zu erhalten (Abbildung 2). Durch die offensicht-

ist dicker als die bekannte Schichtdicke einer CTAB-Doppeletschicht, die 3.4 nm beträgt, was auf die Anwesenheit einer Polymerschicht hindeutet.^[18]

Die Hydrophobie der GNRs nach dem ersten Funktionalisierungsschritt mit PVAc in DMF wurde qualitativ bestimmt; durch die erfolgreiche Beschichtung sollten die GNRs wasserunlöslich werden. Wie erwartet aggregierten die GNRs in niedrigen Konzentrationen von Wasser in DMF (10% v/v) (Abbildung S8, SI). Bemerkenswert ist, dass die kolloidale Stabilität verloren geht, wenn CTAB-GNRs in wässriger Dispersion direkt zu einer ethanolischen PVAc-Lösung hinzugegeben werden. Zusätzlich dazu aggregieren die PVA-GNRs ohne die zweite Funktionalisierung in Ethanol stärker (Abbildung S10, SI). Berücksichtigt man die Löslichkeit von GNR-PVAc in Ethanol zusammen mit den bisher betrachteten Ergebnissen und die daraus resultierende Wasserlöslichkeit nach der Hydrolyse, kann man folgern, dass die GNRs mit PVA funktionalisiert und der größte Teil des CTAB entfernt werden konnte.

Das Ziel der Oberflächenfunktionalisierung von GNRs ist deren Entgiftung, um eine Anwendung zu Therapiezwecken, in der Diagnose oder eine Kombination von Therapie und Diagnose zu ermöglichen.^[19] Deshalb wurde die Verträglichkeit der PVA-GNRs in Zellversuchen mit drei verschiedenen Konzentrationen über 24 h in humanen, aus Blut isolierten und zu Makrophagen differenzierten Monozyten (MDMs) getestet. PEG-GNRs wurden als Negativkontrolle verwendet, da die Biokompatibilität, also keine Zelltoxizität oder pro-inflammatorische Reaktionen in vitro, in einer früheren Studie gezeigt wurde.^[6] Die Ergebnisse der Zellkulturversuche sind in Abbildung 3 gezeigt. Die Zellvitalität, gemessen mittels Trypanblaufärbung, nahm im Vergleich zur Negativkontrolle geringfügig, jedoch signifikant, für die beiden höchsten Konzentrationen (0.02 und 0.04 mg mL $^{-1}$) beider GNRs ab. Diese Resultate wurden qualitativ durch Aufnahmen im Konfokalmikroskop bestätigt, und es wurde keine Veränderung der Zellmorphologie der Makrophagen für beide GNR-Proben bis hin zur höchsten Konzentration beobachtet. Weiterhin konnte in keiner Probe ein Anstieg der Ausschüttung des Tumornekrosefaktor α (TNF- α) im Vergleich zur Positivkontrolle detektiert werden.

Die Hydrophobie des PVA kann durch die Unterbrechung der Hydrolysereaktion angepasst werden.^[20] Diese Eigenschaft wurde von uns genutzt, um beispielhaft einen hydrophoben Farbstoff einzuschließen, der chemisch induziert freigesetzt werden kann, um die potentielle Anwendung einer Verabreichung von hydrophoben Medikamenten zu testen. Die Hydrolysereaktion wurde in der Anwesenheit des hydrophoben Fluorophors Nile Red durchgeführt, und nach Waschen des Niederschlags mit Methanol wurde Wasser hinzugefügt, um das Nile Red in die verbleibenden hydrophoben Taschen der Polymerschicht einzubauen. Ungebundener Farbstoff wurde durch mehrmalige Zentrifugation entfernt. Danach wurden die GNRs mit der gleichen Menge an Chloroform versetzt und homogenisiert. Selbst nach vier Wochen war kein Farbstoff in der organischen Phase detektierbar; durch die Zugabe von Mercaptoethanol, das bekanntermaßen eine monomolekulare Schicht auf der Oberfläche von Goldnanopartikeln bildet und so das Polymer

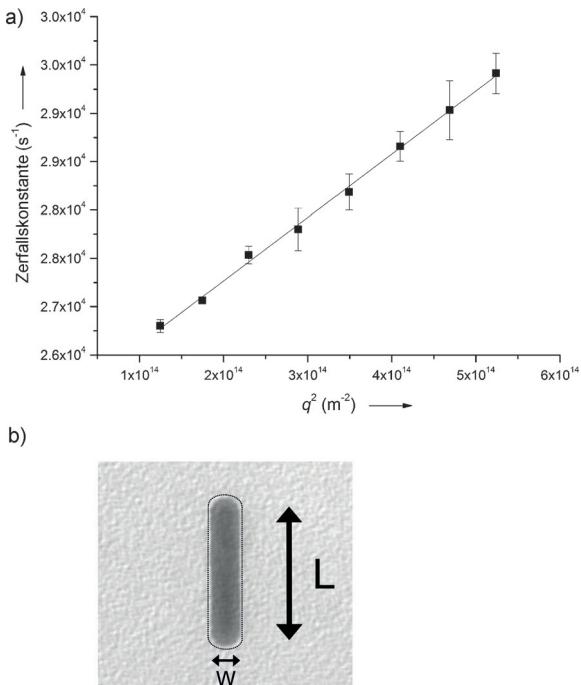


Abbildung 2. a) Zerfallskonstante aufgetragen gegen q^2 aus den DDLS-Daten von PVA-beschichteten GNRs in Wasser in einer Konzentration von 67 µg mL $^{-1}$ bei 21 °C. Aus der linearen Regression (durchgezogene Linie) ergibt sich der Gradient, gleich D_t , und der Schnittpunkt, gleich $6D_r$, die zur Berechnung der hydrodynamischen Länge und Dicke, basierend auf einem sphärozyklindrischen Modell (b), benutzt wurden.

liche Stäbchenform, gezeigt durch TEM, wurde ein hydrodynamisches Modell für Sphärozyylinder gewählt. Dieses Modell wurde zuvor erfolgreich zur genauen Repräsentation von anisotropen Nanopartikeln angewendet.^[17] Mittels dieses Modells war die Einschätzung der Länge und des Durchmesser der GNRs möglich (SI). Die durch TEM gemessene Größe wurde von der durch DDLS bestimmten Länge und dem Durchmesser der GNRs subtrahiert, um die ungefähre Dicke der PVA-Schicht zu erhalten: Die Abmessungen betrugen ca. 13 nm an den Enden und 18 nm an den Seiten. Dies

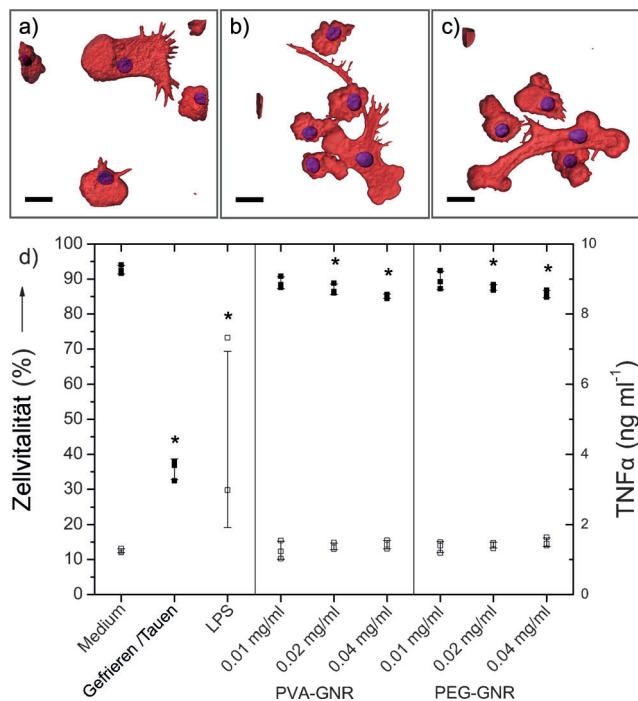


Abbildung 3. Konfokalmikroskopie-Aufnahmen von menschlichen Makrophagen differenziert aus Blutmonozyten (MDMs) nach der Exposition mit a) Medium, b) PVA-beschichteten GNRs, c) PEG-beschichteten GNRs. F-Aktin ist rot dargestellt, Zellkerne sind blau, der Maßstab beträgt 25 μ m. d) (■) MDM-Viabilität bestimmt durch Trypanblaufärbung und (□) TNF- α -Ausschüttung als pro-inflammatorischer Marker, gemessen mit ELISA nach 24 h Suspensionsexposition mit PVA- oder PEG-beschichteten GNRs. Als Positivkontrollen wurden 30 min lang schockgefrorene Zellen bei -80° C bzw. 0.1 mg mL⁻¹ Lipopolysaccharid (LPS) verwendet. Die Daten wurden mit einer two-way ANOVA mit Tukey post-hoc Test auf Signifikanz im Vergleich zur Negativkontrolle untersucht: *p < 0.05.

verdrängt, konnte jedoch sofort eine signifikante Freigabe beobachtet werden (Abbildung 4).^[21] Die Quantifizierung des freigesetzten Farbstoffs durch Fluoreszenzspektroskopie zeigte, dass mindestens 3000 Moleküle pro Polymerhülle eingeschlossen wurden (SI). Interessanterweise wurde die Fluoreszenz vollständig unterdrückt, wenn der Farbstoff an GNRs in wässriger Dispersion gebunden wurde; das Emissionsmaximum bei 520 nm entsteht durch verstärkte Raleigh-Streuung nahe der Plasmonresonanzenergie (Abbildung 4b). In einem weiteren Kontrollexperiment wurden die GNRs in fötalem Kälberserum inkubiert, um zu beobachten, ob ein biologisches Milieu das PVA verdrängen oder das Nile Red entfernen kann. Eine geringe Menge an Farbstoff wurde in die organische Phase abgegeben, die Quantifizierung wurde jedoch durch den Stabilisierungseffekt der Proteine, die zur Bildung einer Emulsion führten, erschwert. Nichtsdestotrotz zeigen die hier erbrachten Resultate den Vorteil der Verwendung von teilweise hydrolysiertem PVA – dieser Vorteil liegt in der Verabreichung schlecht wasserlöslicher Medikamente, was eine bedeutende Herausforderung für die meisten Medikamente der Klasse II und IV (Biopharmazeutisches Klassifizierungssystem) darstellt.^[22]

Zusammenfassend ermöglicht die hier gezeigte Methode die Funktionalisierung CTAB-beschichteter GNRs mit einem

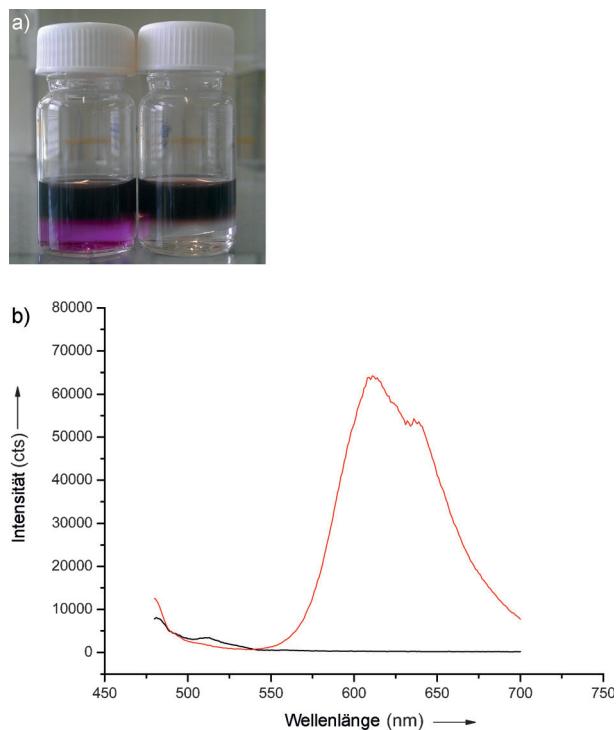


Abbildung 4. a) Freisetzung eines eingekapselten, hydrophoben Farbstoffs in die organische Phase (Chloroform) aus einer amphiphilen Polymerhülle um die GNRs in Wasser. Mercaptoethanol wurde als Auslöser verwendet. b) Emissionsspektren von PVA-beschichteten GNRs mit eingekapseltem Farbstoff, Nile Red, vor (schwarze Kurve) und nach der Zugabe von Mercaptoethanol (rote Kurve). Die Quantifizierung durch Fluoreszenzspektroskopie zeigt mindestens 3000 Farbmoleküle pro GNR.

stark hydrophilen Polymer, indem zuerst ein hydrophobes Analogon in einem gewöhnlichen Lösungsmittel gekoppelt wird. Die darauffolgende Hydrolyse bildet eine sehr hydrophile PVA-Schicht, die sowohl in ihrer Hydrophobie als auch im Funktionalisierungsgrad anpassbar ist. Durch den Einchluss eines hydrophoben Moleküls als Beispiel für ein Medikament, wurde der Vorteil der hydrophoben Taschen auf der Oberfläche der GNRs gezeigt. Theoretisch überwiegt die Anwesenheit einer Hydroxygruppe in jedem Monomer des PVA bei weitem die einzelne Endgruppe von PEG bezogen auf den Funktionalisierungsgrad. Weiterhin ist bekannt, dass die „Tareigenschaften“ von PVA abhängig vom Molekulargewicht sind. Dies bedeutet, dass verglichen mit PEG lange In-vivo-Zirkulationszeiten erreicht werden können, und dass die Zirkulationsdauer angepasst werden kann. Alle oben erwähnten Punkte stellen die komplementäre Eigenschaft von PVA im Vergleich zu PEG bezüglich der Oberflächenfunktionalisierung von Nanopartikeln heraus. Die Vorgehensweise zur Synthese von PVA-GNRs könnte theoretisch auf ähnliche hydrophob-hydrophile Analoga übertragen werden und würde die begrenzte Anzahl an Polymeren, die im Moment erfolgreich zur Entgiftung und Funktionalisierung von GNRs Anwendung finden, erweitern.

Eingegangen am 8. April 2014
Online veröffentlicht am 23. Juli 2014

Stichwörter: Gold · Kolloide · Nanopartikel · Polymere · Zytotoxizität

- [1] a) L. Vigderman, B. P. Khanal, E. R. Zubarev, *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 4811–4841; b) C. J. Murphy, T. K. Sau, A. M. Gole, C. J. Orendorff, J. Gao, L. Gou, S. E. Hunyadi, T. Li, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 13857–13870.
- [2] B. Nikoobakht, M. A. El-Sayed, *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 1957–1962.
- [3] X. Xia, M. Yang, Y. Wang, Y. Zheng, Q. Li, J. Chen, Y. Xia, *ACS Nano* **2012**, *6*, 512–522.
- [4] A. M. Alkilany, P. K. Nagaria, M. D. Wyatt, C. J. Murphy, *Langmuir* **2010**, *26*, 9328–9333.
- [5] H.-C. Huang, S. Barua, D. B. Kay, K. Rege, *ACS Nano* **2009**, *3*, 2941–2952.
- [6] C. Kinnear, H. Dietsch, M. J. D. Clift, C. Endes, B. Rothen-Rutishauser, A. Petri-Fink, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 1988–1992; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1934–1938.
- [7] O. Tirosh, Y. Barenholz, J. Katzhendler, A. Priev, *Biophys. J.* **1998**, *74*, 1371–1379.
- [8] a) J. Szebeni, L. Baranyi, S. Savay, J. Milosevits, R. Bunger, P. Laverman, J. M. Metselaar, G. Storm, A. Chanan-Khan, L. Liebes, F. M. Muggia, R. Cohen, Y. Barenholz, C. R. Alving, *J. Liposome Res.* **2002**, *12*, 165–172; b) J. Szebeni, *Toxicology* **2005**, *216*, 106–121; c) I. Hamad, A. Hunter, J. Szebeni, S. Moghimi, *Mol. Immunol.* **2008**, *46*, 225–232.
- [9] a) A. W. Richter, E. Akerblom, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **1984**, *74*, 36–39; b) F. M. Veronese, *PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications*, Birkhäuser, Basel, **2009**.
- [10] X. Wang, T. Ishida, H. Kiwada, *J. Controlled Release* **2007**, *119*, 236–244.
- [11] a) X. Huang, X. Peng, Y. Wang, Y. Wang, D. M. Shin, M. A. El-Sayed, S. Nie, *ACS Nano* **2010**, *4*, 5887–5896; b) B. Wang, X. Zhuang, Z.-B. Deng, H. Jiang, J. Mu, Q. Wang, X. Xiang, H. Guo, L. Zhang, G. Dryden, et al., *Mol. Ther.* **2013**; c) C. Kelly, C. Jefferies, S.-A. Cryan, *J. Drug Delivery* **2011**, 72724.
- [12] a) D. M. McDonald, P. Baluk, *Cancer Res.* **2002**, *62*, 5381–5385; b) N. Bertrand, J.-C. Leroux, *J. Controlled Release* **2012**, *161*, 152–163.
- [13] a) H. Takeuchi, H. Kojima, H. Yamamoto, Y. Kawashima, *J. Controlled Release* **2001**, *75*, 83–91; b) S. Salmaso, P. Caliceti, *J. Drug Delivery* **2013**, 1–19; c) B. M. Budhlall, K. Landfester, E. D. Sudol, V. L. Dimonie, A. Klein, M. S. El-Aasser, *Macromolecules* **2003**, *36*, 9477–9484; d) O. Nag, V. Awasthi, *Pharmaceutics* **2013**, *5*, 542–569.
- [14] L. Vigderman, P. Manna, E. R. Zubarev, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 660–665; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 636–641.
- [15] H. T. Ho, M. E. Levere, S. Pascual, V. Montembault, J.-C. Soutif, L. Fontaine, *J. Polym. Sci. Part A* **2012**, *50*, 1657–1661.
- [16] Z. Nie, D. Fava, E. Kumacheva, S. Zou, G. C. Walker, M. Rubinstein, *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 609–614.
- [17] a) I. Martchenko, H. Dietsch, C. Moitzi, P. Schurtenberger, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 14838–14845; b) A. M. Shetty, G. M. H. Wilkins, J. Nanda, M. J. Solomon, *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 7129–7133.
- [18] S. Gómez-Graña, F. Hubert, F. Testard, A. Guerrero-Martínez, I. Grillo, L. M. Liz-Marzán, O. Spalla, *Langmuir* **2012**, *28*, 1453–1459.
- [19] A. M. Alkilany, P. K. Nagaria, C. R. Hexel, T. J. Shaw, C. J. Murphy, M. D. Wyatt, *Small* **2009**, *5*, 701–708.
- [20] N. A. Peppas, E. W. Merrill, *J. Biomed. Mater. Res.* **1977**, *11*, 423–434.
- [21] L. M. Demers, C. A. Mirkin, R. C. Mucic, R. A. Reynolds, R. L. Letsinger, R. Elghanian, G. Viswanadham, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5535–5541.
- [22] G. L. Amidon, H. Lennernäs, V. P. Shah, J. R. Crison, *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 413–420.