

SÍNTESE DE SISTEMAS NANOSCÓPICOS PARA VEICULAR UM INIBIDOR DA APOPTOSE

Sérgio V. P. Barreira

Professor Auxiliar

CIAGEB, Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal

Investigador

Centro de Engenharia Biológica

Universidade do Minho, Braga, Portugal

barreira@ufp.edu.pt

RESUMO

Conceberam-se sistemas para veicular um inibidor da apoptose utilizando partículas coloidais com um micrómetro de diâmetro, produzidas através de montagem camada-a-camada com base em interações electrostáticas. Foram investigadas duas alternativas: a utilização de partículas revestidas com o inibidor e cápsulas para funcionar como contentores. Os resultados de testes *in vitro* revelaram que as partículas funcionalizadas têm capacidade de inibir a apoptose indicando que esta estratégia poderá ser promissora. A utilização de cápsulas, por seu lado, ainda não foi testada. O seu processo de produção ainda está sendo otimizado.

PALAVRAS-CHAVE

Portadores de Fármacos, Apoptose, Micropartículas, Microcápsulas

ABSTRACT

Two innovative vehicles to deliver an apoptosis inhibitor are presented. Both utilize colloidal particles approximately one micrometer in diameter produced by electrostatic layer-by-layer assembly. One consists on particles coated with layers of a polyelectrolyte derivatized with the inhibitor, the other on capsules filled with the inhibitor. Preliminary *in vitro* tests revealed that the coated microparticles are capable of inhibiting the apoptosis process, indicating that this strategy could be promising. The capsules were not yet tested since their production process is still being optimized.

KEYWORDS

Drug delivery systems, Apoptosis, Microparticles, Microcapsules

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem havido um interesse crescente no desenvolvimento de sistemas químicos supramoleculares com aplicações biológicas e médicas em parte motivado pelo desejo de miniaturização e, por outro lado, porque já é aceite que muito do avanço nestas áreas está dependente do desenvolvimento de novos biossensores (Service; Pirrung; MacBeath) e sistemas “inteligentes” para libertação controlada de fármacos (Oh et al.) e terapia génica (Yang et al.). A tecnologia da montagem camada-a-camada com base em interacções electrostáticas (*layer-by-layer assembly*; LBLA) proposta por Decher veio revolucionar o processo de produção destes sistemas. Esta tecnologia permite a obtenção de filmes multicamadas em superfícies, com controlo da espessura ao nível nanométrico, pela simples repetição da imersão alternada de um substrato carregado em soluções de polímeros com carga oposta. O processo é extremamente simples e baseia-se no facto da adsorção de uma molécula possuindo múltiplas cargas do mesmo sinal permitir a inversão da carga da superfície, o que passou a ser designado por sobrecompensação de carga (Ladam et al.). Este fenómeno é responsável pela repulsão de moléculas com a mesma carga, o que confere auto-regulação ao processo, e possibilita a adsorção de uma camada de moléculas de carga contrária num segundo passo e assim sucessivamente. A espessura e morfologia das camadas individuais depositadas desta forma pode ser controlada variando a densidade de carga das moléculas (Shiratori e Rubner), a força iónica da solução de deposição (Dubas e Schlenoff) e a temperatura de deposição (Tan et al.). Quando o processo é levado a cabo sobre substratos esféricos solúveis é possível produzir cápsulas mediante a dissolução do substrato (Voegel; Han et al.). Esta aplicação foi pela primeira vez apresentada por Möhwald e colaboradores que propuseram a possível utilização destes novos sistemas coloidais como microcontentores para macromoléculas e microreactores (Sukhorukov et al.).

Neste trabalho a tecnologia de LBLA foi utilizada para produzir um sistema nanoscópico para armazenamento e administração de um péptido que desempenha um papel importante na inibição da apoptose associada à deposição de agregados tóxicos de transtertina, uma das causas de amilóidose (Sousa et al.). Para que este péptido possa ser transportado na corrente sanguínea e chegar intacto às células alvo, terá que ser protegido da acção de proteases. Esta condicionante levou à idealização dos veículos representados esquematicamente na Figura 1. O primeiro consiste em partículas coloidais revestidas (funcionalizadas) com sucessivas camadas de inibidor (figura 1; 5) o segundo de cápsulas cheias com o inibidor (figura 1; 7).

Os inibidores de apoptose estão a ser estudados para aplicação no tratamento de diversas patologias como enfartes, doenças hepáticas, sepsis e no caso de doenças neurodegenerativas agudas como a doença de Parkinson e Alzheimer (Charriaut), existindo actualmente grande interesse em descobrir vias para a sua administração.

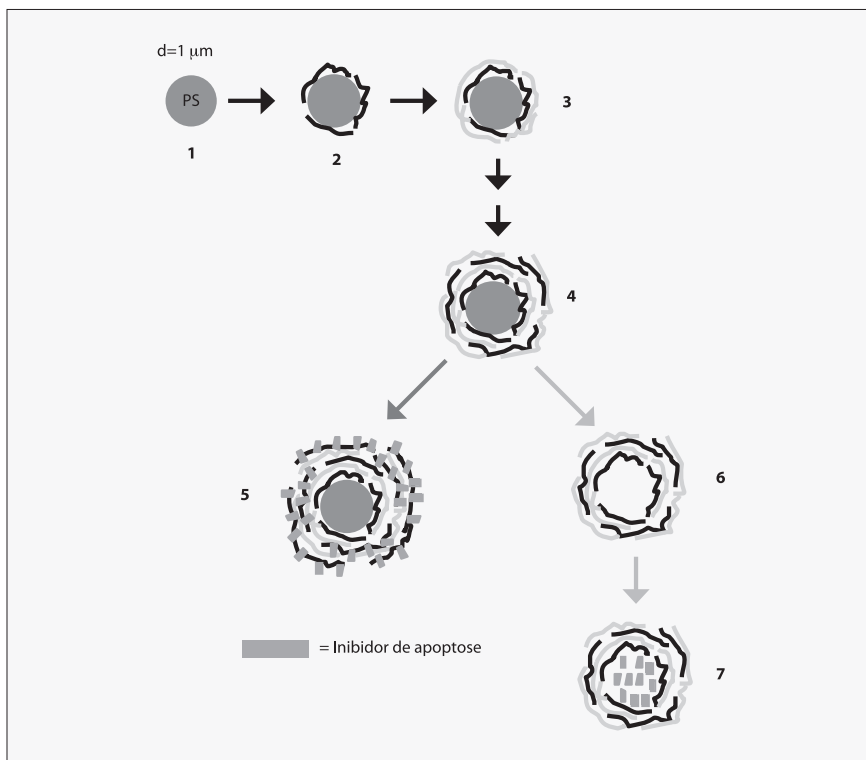


FIGURA 1 – Representação esquemática do processo de produção dos sistemas propostos para administração do inibidor de apoptose. Um suporte esférico carregado é usado no processo de LBLA (1-4). As partículas funcionalizadas (5) obtêm-se depositando camadas de polieletrólito derivatizado com o inibidor de apoptose. Para obter cápsulas remove-se o suporte por dissolução com um solvente apropriado (6). Estas cápsulas podem posteriormente ser cheias de péptido e funcionar como contentores para o mesmo (7).

2. SECÇÃO EXPERIMENTAL

2.1. REAGENTES

Partículas de poliestireno *non-crosslinked* PS-R-1290 ($1,32\pm 0,04\ \mu\text{m}$) (microparticles GmbH); inibidor da apoptose (IBMC) ácido bórico (SigmaUltra), hidróxido de sódio (97%, Aldrich), ácido clorídrico 37% (Aldrich), hidrogenofosfato de sódio (SigmaUltra), diidrogenofosfato de sódio (99,0%, Sigma), poli-(4-estireno sulfonato de sódio) (pSS; MM~70000; Aldrich), poli-(hidrocloreto de alilamina) (pAH; MM~70000; Aldrich), polietilenoimina 50% (w/v) em água (pEI; Sigma), poli-L-glutamato de sódio (pGlu; MM~41400; Sigma), hidrobrometo de poli-L-lisina (pLis; MM~30200; Sigma), Tetrametilrodamina-5-isotiocianato (TRICT; absorção a 544 nm, emissão a 570 nm; Sigma), hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarboimida (EDC; SigmaUltra), éster N-hidroxissulfocinimido (NHSS; Fluka), cloreto de sódio (p.a., Panreac), 2-mercaptoetanol (Sigma), fluoresceína (ácido livre) (Fluka), tetraidrofurano (99%, Aldrich).

2.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA PREPARAÇÃO DE UMA SUSPENSÃO COM ~10% VOLUME DE PARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS COM PÉPTIDO.

Centrifugou-se a 4000 rpm (centrífuga Eppendorf 5804 R) e durante quatro minutos cerca de 300 µl de suspensão de micropartículas de poliestireno (Microparticles GmbH) e removeu-se o sobrenadante. Adicionou-se solução de pEI ~1 mg/ml em água e dispersaram-se as partículas. Deixaram-se as partículas em contacto com a solução de pEI durante cerca de 20 minutos. Centrifugou-se e removeu-se o sobrenadante e lavaram-se as micropartículas com tampão borato 0.1 M, pH ~7,8. Após adsorção da camada de pEI as partículas podem ser submetidas ao processo de LBLA. Para adsorção da camada de pSS adicionou-se a solução de pSS (~1 mg/ml, tampão borato) às partículas; dispersaram-se estas e deixou-se o pSS adsorver durante 20 minutos;

Após este tempo o excesso de pSS foi removido através de centrifugação, seguida de duas a três lavagens com tampão borato.

As camadas de pLis e pGlu foram depositadas da mesma forma, a partir de soluções ~1 mg/ml em tampão borato. Para produzir partículas bioactivas depositaram-se camadas mais externas de um polielectrólito derivatizado com o péptido inibidor (Figura 1, 5). Neste trabalho optou-se por derivatizar o ácido poli-glutâmico. A deposição destas camadas foi feita de forma idêntica às de pGlu.

2.3. PROCEDIMENTO PARA DERIVATIZAR O PGLU COM O INIBIDOR

A uma solução de pGlu ~1 mg/ml em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 adicionou-se EDC e NHSS de forma que a sua concentração na mistura reaccional final fosse aproximadamente 2 mM e 5 mM respectivamente, e deixou-se reagir durante 15 minutos. Passado este tempo adicionou-se 2-mercaptoetanol à mistura anterior até obter uma concentração de aproximadamente 20 mM. Finalmente adicionou-se o péptido por forma a que a concentração final na mistura reaccional fosse ~0,5 mM e deixou-se reagir pelo menos duas horas. No final procedeu-se à separação do pGlu-péptido da mistura reaccional através de cromatografia de gel, utilizando uma coluna Sephadex PD-10 (Amersham Biosciences). O pGlu-péptido é eluído ao passo que as moléculas com massa molecular inferior a 1000 Da (como é o caso do péptido inibidor livre), ficam retidas.

O sucesso desta síntese foi avaliado através de espectrofotometria UV-Vis (resultados não apresentados). O péptido apresenta uma banda a 270 nm inexistente no pGlu, de modo que o aparecimento desta banda no espectro do produto sinaliza a presença de péptido. Esta banda é atribuída ao grupo fenol dos resíduos tirosina do péptido. Com base na intensidade desta banda, e por comparação com a intensidade da mesma banda para a solução de péptido de concentração conhecida, foi possível obter uma estimativa da concentração de péptido na solução final de ~0,47 mM resultante da síntese, ou seja, cerca de 19 moléculas de péptido por molécula de pGlu.

2.4. TESTES DE DETECÇÃO DA CASPASE 3

A bioactividade dos veículos propostos foi avaliada através de testes de detecção da caspase 3 em células em que a apoptose é induzida por exposição a agregados tóxicos de

transteritina (TTR) utilizando células de neuroblastoma humano (linha celular SH-SY5Y). A activação das caspase 3 foi medida utilizando o CaspACE colorimetric 96-well plate assay system (Promega, Madison, WI, EUA), seguindo as instruções do fabricante (Promega).

2.5. MEDIÇÕES DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA CONFOCAL

De forma a seguir o processo de LBLA e caracterizar as partículas obtidas, estas foram visualizadas num microscópio confocal de fluorescência (Leica DMIRE2). Para tal foram depositadas camadas de pLis derivatizada com rodamina (pLis-Rod).

2.6. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA PREPARAÇÃO DE CÁPSULAS

As cápsulas são obtidas a partir de partículas dissolvendo o substrato de poliestireno através da adição de tetraidrofurano ~1,25ml a cerca de 200 μ l de suspensão contendo as partículas revestidas. Deixaram-se sedimentar as cápsulas após o que se substituiu o tetraidrofurano por tetraidrofurano fresco. Após nova sedimentação/decantação as cápsulas foram lavadas com tampão, e mais uma vez com tetraidrofurano. Por fim, as cápsulas foram novamente sedimentadas e decantadas e redispersas no volume de tampão final.

2.7. EXPERIÊNCIAS DE ENCAPSULAMENTO DE FLUORESCÉINA

As cápsulas foram expostas a soluções de fluoresceína 1×10^{-4} M em NaCl 0,05 M durante várias horas. Seguidamente foram separadas por centrifugação e lavadas com tampão, pelo menos duas vezes. As medições de microscopia confocal destas cápsulas foram realizadas em média uma hora após a primeira lavagem.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. EXPERIÊNCIAS COM AS PARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS

3.1.1. PREPARAÇÃO DAS PARTÍCULAS

As imagens de microscopia confocal das partículas de poliestireno revestidas, via LBLA, com pGlu e pLis são mostradas na Figura 2. Estas imagens confirmam o sucesso da experiência de LBLA. O tamanho das partículas, estimado com base no perfil de fluorescência, após a deposição do filme é ~1,32 μ m.

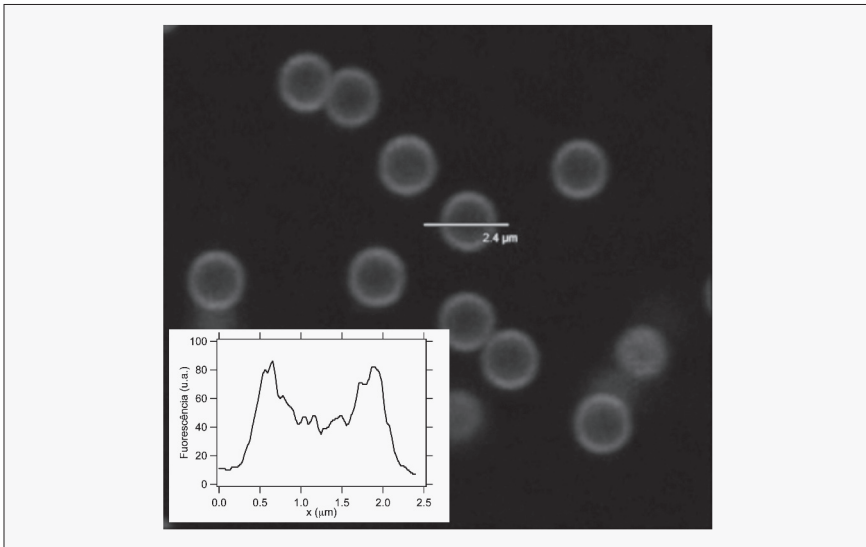


FIGURA 2 – Imagem da solução de partículas PS/pSS/(pLys/pGlu)₂/pLys-Rod/pGlu/pLys-Rod.

Na Figura 3, são apresentadas imagens de partículas revestidas com diferente número de camadas de pSS/pAH. O tamanho das partículas (estimado com base nos perfis de fluorescência) não cresce regularmente com o número de camadas (Tabela 1) mas tal pode dever-se, por exemplo, ao facto das medições não terem sido feitas no mesmo plano.

Número de camadas de pSS/pAH	Diâmetro da partícula (μm)
4	1,43
6	1,35
8	1,44

TABELA 1 - Tamanhos partículas de pSS/pAH estimado com base nos perfis de fluorescência.

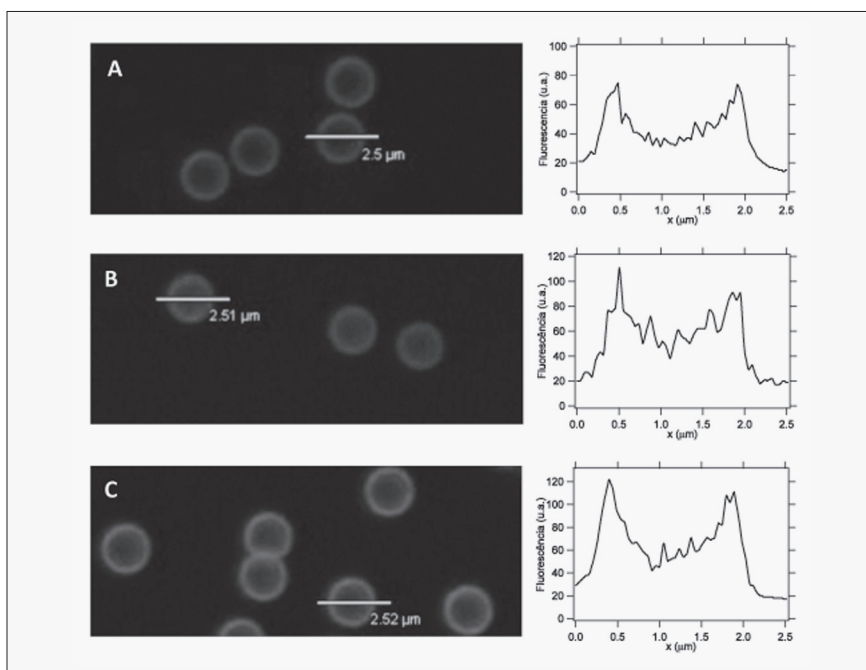


FIGURA 3 – Imagens de microscopia confocal de partículas de poliestireno revestidas com camadas de pSS e pAH: A – PS/pEI/pSS/pAH/pSS/pAH-Rod; B – PS/pEI/pSS/pAH/pSS/pAH/pSS/pAH-Rod; C – PS/pEI/pSS/pAH/pSS/pAH/pSS/pAH/pSS/pAH-Rod.

3.1.2. TESTES BIOLÓGICOS COM PARTÍCULAS COLOIDAIS FUNCIONALIZADAS

Na Figura 4, são apresentados os resultados de testes efectuados com as partículas PS/pSS/(pLis/pGlu)₃/pLis/pGlu-péptido/pLis/pGlu-péptido. As partículas foram colocadas no meio de cultura com células em que foi induzida a apoptose. Como é possível observar, na presença de partículas funcionalizadas com o péptido, o nível de caspase 3 no fluido intracelular é diminuído o que indica que a apoptose foi inibida em comparação com as células não tratadas.

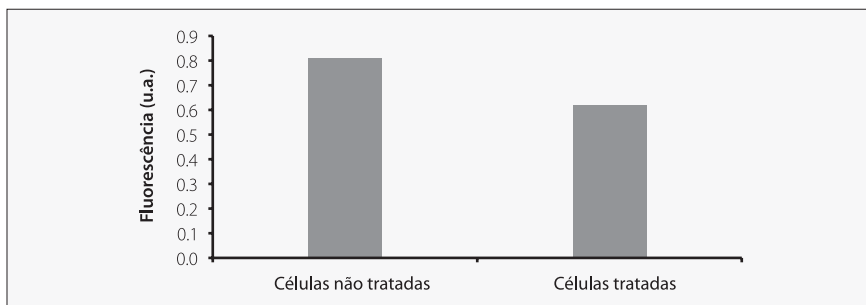


FIGURA 4 – Resultados dos testes de detecção da caspase 3 com células incubadas com partículas. As células não tratadas foram incubadas com agregados de TTR tóxicos numa concentração de 2 mM. As células tratadas foram incubadas com agregados de TTR tóxicos e co-incubadas com as partículas funcionalizadas com péptido (40 μl da solução descrita na secção experimental);

Embora se trate de testes preliminares estes resultados são promissores quanto à possibilidade de utilizar as partículas funcionalizadas como veículos de administração do inibidor de apoptose. Estas partículas têm a vantagem de serem fáceis de produzir e do péptido, por ficar à superfície, ficar mais acessível para interagir com as células alvo. E como desvantagens o facto do péptido perder mobilidade e ficar mais exposto à acção de proteases. Foi por estes motivos que se idealizou uma segunda via de administração.

3.2. EXPERIÊNCIAS COM CÁPSULAS

Como já foi referido, a segunda estratégia que foi idealizada como possível sistema de administração foi a utilização de cápsulas contendo o inibidor. Esta estratégia tem a vantagem de fornecer protecção ao péptido contra agentes externos, proteases por exemplo, e a provável desvantagem de tornar mais difícil a sua acção já que ele terá que se difundir através das paredes da cápsula. Nesta estratégia o controlo rigoroso das propriedades de transporte (permeabilidade) das paredes das cápsulas passa a ser um factor primordial.

Na Figura 5, são apresentadas imagens de microscopia confocal de fluorescência das cápsulas obtidas partindo de partículas revestidas com filmes do tipo pSS/pAH para diferentes números de camadas.

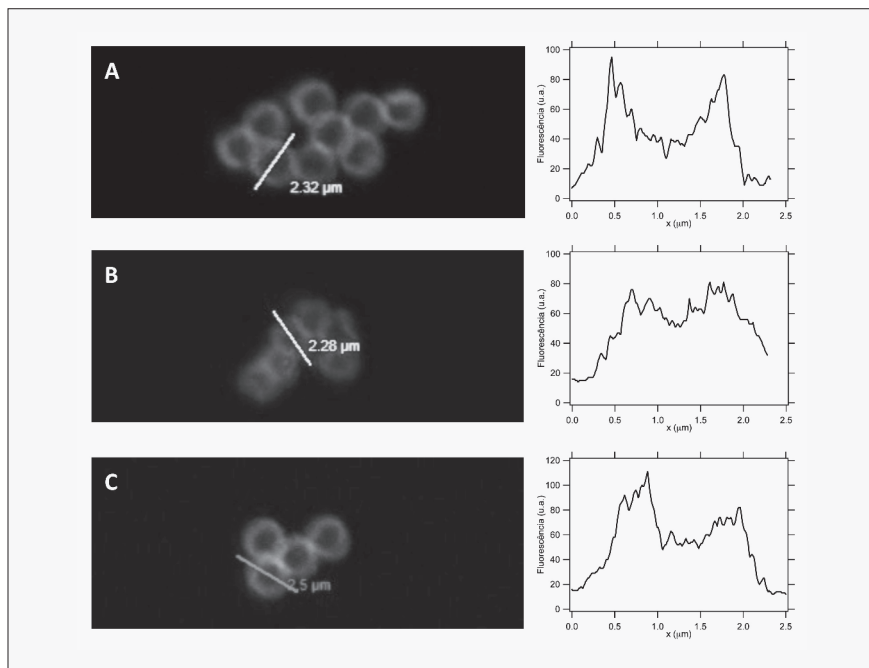


FIGURA 5 – Imagem de microscopia confocal de cápsulas obtidas por remoção do substrato de poliestireno das partículas de PS/pEI/pSS/pAH/pSS/pAH-Rod; PS/pEI/pSS/pAH/pSS/pAH/pSS/pAH-Rod; PS/pEI/pSS/pAH/pSS/pAH/pSS/pAH/pSS/pAH/pSS/pAH-Rod.

Observa-se, em todos os casos, que a dissolução do centro de poliestireno é acompanhada por uma ligeira contracção algo que já foi relatado por outros investigadores (Möhwald et al.). No caso das partículas revestidas com filme de pGlu/pLis a variação chega a ser de $\sim 0,375 \mu\text{m}$. A variação para as partículas revestidas com filmes de pSS/pAH é apresentada na Tabela 2.

Número de camadas de pSS/pAH	Diâmetro da partícula (μm)	Diâmetro da cápsula resultante (μm)
4	1,43	1,21
6	1,35	0,95
8	1,44	1,09

Tabela 2 - Variação de tamanho durante a produção de cápsulas de pSS/pAH. O tamanho é estimado com base nos perfis de fluorescência.

3.2.1. EXPERIÊNCIAS DE ENCAPSULAMENTO

Obtidas as cápsulas é necessário enchê-las de péptido. Nos últimos anos têm sido propostas diversas estratégias para introduzir moléculas em cápsulas produzidas via LBLA, normalmente variando a permeabilidade das paredes de uma forma controlada. A forma mais simples e mais óbvia para controlar a permeabilidade é alterar a composição das paredes (polieletrólitos) ou variar o número de camadas; Outra forma de manipular a permeabilidade consiste em alterar a densidade das paredes variando a força iónica (Tong et al.), o pH (Basset et al.) ou o solvente (Kim et al.).

Neste trabalho, as tentativas de encapsulamento foram levadas a cabo alterando a permeabilidade das paredes de cápsulas variando a composição das paredes, o número de camadas e manipulando a força iónica do meio.

O teste que foi realizado com cápsulas de pGlu/pLis produzidas a partir de PS/pEI/pSS/(pLis/pGlu)₂/pLis-Rod/pGlu em que as cápsulas foram expostas a uma solução muito diluída de fluoresceína durante algumas horas parece indicar algum sucesso no encapsulamento. Também foram efectuadas experiências de encapsulamento com cápsulas obtidas a partir de partículas cobertas com filmes de pSS/pAH com diferente número de camadas. Neste caso as cápsulas foram deixadas em contacto com uma solução 1×10^{-4} M de fluoresceína em 0,05 M NaCl durante 24 horas, após o que, as cápsulas foram lavadas e deixadas em água. Em nenhum dos casos ocorreu incorporação de fluoresceína que, aparentemente aderiu às paredes das cápsulas. Não se pode excluir também a possibilidade da etapa de remoção do substrato de poliestireno, resultando em cápsulas ocas, não ter sido bem sucedida. Aquilo que se estaria então a observar ao microscópio confocal seria fluoresceína que teria ficado retida à superfície do que resta da micropartícula de poliestireno.

4. CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO

Foram produzidos dois tipos de partículas coloidais com base na técnica de LBLA para serem utilizadas na administração de um péptido inibidor da apoptose: partículas funcionalizadas e cápsulas.

Os testes biológicos realizados com partículas funcionalizadas, embora preliminares, deram uma boa indicação no sentido deste vir a ser um bom veículo de administração. Estas partículas têm a vantagem de serem fáceis de produzir e do péptido, por permanecer à superfície, ficar mais acessível para interagir com as células alvo, embora o facto do péptido perder mobilidade e ficar mais exposto à acção de proteases constitua uma desvantagem. Por estas razões idealizou-se uma segunda via de administração que consiste na utilização de cápsulas cheias. Para a concretizar é necessário produzir cápsulas permeáveis de forma que seja possível, numa primeira fase, enchê-las e que depois o péptido, possa difundir-se e ser libertado quando necessário. Até ao momento foram realizados estudos preliminares de permeabilidade das cápsulas relativamente à fluoresceína, em função da natureza dos polieletrólitos da parede, do número de camadas da parede e da força iónica. Estes estudos parecem indicar que as cápsulas de pGlu/pLis são mais permeáveis que as de pSS/pAH. Surpreendentemente não se notaram diferenças de permeabilidade nas cápsulas de pSS/pAH com diferente número de camadas. Em todo o caso, as tentativas de incorporação já realizadas não podem ser consideradas bem sucedidas, de forma que os próximos passos devem passar por concretizar o encapsulamento (talvez utilizando partículas de maior tamanho e de melanina-formaldeído, por serem consideradas mais fáceis de utilizar na produção de cápsulas relativamente às quais já existem bastantes estudos publicados sobre como manipular a sua permeabilidade (Javier et al.) e da realização de testes biológicos com estas cápsulas. Existe também a necessidade de medidas adicionais para caracterizar o processo de produção de partículas e cápsulas. As conclusões do estudo aqui apresentado basearam-se essencialmente em microscopia de fluorescência confocal. Futuramente poderão vir a ser efectuadas medidas de mobilidade electroforética para seguir o processo de LBLA e de microscopia electrónica para caracterizar morfológicamente as partículas e as cápsulas.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece à Professora Maria João Saraiva (IBMC, Unidade de Amilóide) pela oferta do péptido e à Doutora Isabel Cardoso (IBMC, Unidade de Amilóide) pela realização dos testes de detecção da caspase 3.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Basset, Christian, et al. "Design of Double Stimuli-Responsive Polyelectrolyte Microcontainers for Protein Soft Encapsulation." *Biomacromolecules* 11.3 (2010): 806-14.
- Charriaut, C. "Apoptosis: a Target for Neuroprotection." *Therapie* 59.2 (2004): 185-90.
- Decher, Gero. "Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites." *Science* 277.5230 (1997): 1232-37.
- Dubas, Stephan, e Joseph. B. Schlenoff. "Mechanism of Polyelectrolyte Multilayer Growth: Charge Overcompensation and Distribution." *Macromolecules* 34.3 (2001): 3736-40.
- Han, Yongsheng, et al. "Biocompatible Protein Nanocontainers for Controlled Drugs Release." *ACS Nano* 4.5 (2010): 2838-44.

Kim, Byoung-S., et al. "Effect of Organic Solvent on the Permeability and Stiffness of Polyelectrolyte Multilayer Microcapsules." *Macromolecules* 38.12 (2005): 5214-22.

Javier, Alumdena M., et al. "Uptake of Colloidal Polyelectrolyte-Coated Particles and Polyelectrolyte Multilayer Capsules by Living Cells." *Advanced Materials* 20.22 (2008): 4281-87.

Ladam, G., et al. "In Situ Determination of The Structural Properties of Initially Deposited Polyelectrolyte Multilayers." *Langmuir* 16.3 (2000): 1249-55.

Macbeath, Gavin. "Protein Microarrays and Proteomics." *Nature Genet* 32.Suppl 2 (2002): 526-32.

Möhwald, Helmuth, Edwin Donath e Gleb Sukhorukov. "Smart Capsules." *Multilayer Thin Films*. Ed. Gero Decher e J. B. Schlenoff. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2003. 362-92.

Oh, Yu-Kyoung, Peter D. Senter, e Soo-Chang Song. "Intelligent Drug Delivery Systems." *Bioconjugate Chem* 20.10 (2009): 1813-15.

Promega Technical Bulletin. *CaspACE™ Assay System, Colorimetric*. Madison, WI: Promega. Internet. 14 Mar. 2010. <<http://www.promega.com/tbs/tb270/tb270.pdf>>.

Pirrung, Michael. C. "How to Make a DNA Chip." *Angew Chem, Int Ed Engl* 41.8 (2002): 1276-89.

Service, Robert F. "Microchip Arrays Put DNA on the Spot." *Science* 282.5388 (1998): 396-99.

Shiratori, S. S., e M. Rubner. "Ph-Dependent Thickness Behavior of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes." *Macromolecules* 33.11 (2000): 4213-19.

Sousa, Mónica M., et al. "Deposition of Transthyretin in Early Stages of Familial Amyloidotic Polyneuropathy, Evidence for Toxicity of Nonfibrillar Aggregates." *American Journal of Pathology* 159.6 (2001): 1993-2000.

Sukhorukov, Gleb B. et al. "Stepwise Polyelectrolyte Assembly on Particle Surfaces: a Novel Approach to Colloid Design." *Polym. Adv. Technol* 9 (1998): 759-67.

Tan, Hazel. L., et al. "Temperature Dependence of Polyelectrolyte Multilayer Assembly." *Langmuir* 19.22 (2003): 9311-14.

Tong, Weijun, et al. "Charge-Controlled Permeability of Polyelectrolyte Microcapsules." *J. Phys. Chem B* 109.27 (2005): 13159-61.

Voegel, Jean-C. "Multilayered Polyelectrolyte Films: from Active Molecular Delivery to Vaccine Therapy." *ACS Nano* 3.11 (2009): 3343-46.

Yang, Yongxin, et al. "Galactosylated poly(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)phosphazene/DNA complex nanoparticles: In Vitro and In Vivo Evaluation For Gene Delivery." *Biomacromolecules* 11.4 (2010): 927-33.