



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Bioassay-guided development and in vitro
characterization of lectin-drug conjugates for the
targeted intravesical therapy of bladder cancer“

Verfasserin

Britta Eggenreich

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)

Wien, im Oktober 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreuer: a.o. Univ.- Prof. Mag. Dr. Michael Wirth

Für meine Eltern

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor, Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth und Mag. Lukas Neutsch für die umfangreiche Betreuung, die liebevolle Aufnahme in die Arbeitsgruppe und für die vielen Antworten auf meine vielen Fragen.

Weiters danke ich der gesamten Arbeitsgruppe für das ausgezeichnete Arbeitsklima, ihre Freundschaft und ganz besonders für ihre doch manchmal wirklich dringend benötigte moralische Unterstützung.

Ein herzliches Dankeschön an Clara-Maria, Dorothea und Julia für ihr besonderes Talent mich in allen noch so frustrierenden Situationen zum Lachen zu bringen.

Danke auch allen Freunden und Studienkollegen für die Begleitung, Motivation und Ablenkungen während meines gesamten Studiums.

Ein ganz großes DANKE meiner Familie - besonders meinen Eltern - dafür, dass sie mich immer unterstützt haben, immer für mich da waren und sein werden und dafür, dass ich weiß, dass sie stolz auf mich sind.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Problemstellung und Zielsetzung | 9 |
| 2. Grundlagen..... | 11 |
| 2.1. Die Harnblase (lat. Vesica urinaria) | 11 |
| 2.1.1. Wandaufbau | 11 |
| 2.1.2. Das Urothel | 12 |
| 2.2. Harnblasentumor | 14 |
| 2.2.1. Einteilung nach Tumorgrad und Entstehung | 15 |
| 2.2.2. Symptome und Diagnose..... | 16 |
| 2.2.3. Therapie des nicht muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms..... | 16 |
| 2.2.4. Therapie des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms | 17 |
| 2.3. Drug Targeting | 18 |
| 2.4. Glykokalyx..... | 19 |
| 2.5. Lektine | 20 |
| 2.6. Plasmaproteine..... | 20 |
| 3. Ergebnisse und Diskussion..... | 21 |
| 3.1. Zusammenfassung | 28 |
| Anhang A..... | 31 |
| Anhang B..... | 53 |
| 1. fHSA/WGA-Konjugate | 53 |
| 1.1. Einleitung | 53 |
| 1.2. Materialien und Methoden | 53 |
| 1.2.1. Chemikalien..... | 53 |

| | |
|---|-----------|
| 1.2.2. Zellkultur..... | 54 |
| 1.2.3. Herstellung der fHSA/WGA-Konjugate | 55 |
| 1.2.4. Zellbindungsstudien | 55 |
| 1.2.5. Aufreinigung des Konjugates..... | 56 |
| 1.3. Ergebnisse und Diskussion..... | 56 |
| 1.3.1. Untersuchungen zur Zellbindung..... | 56 |
| 1.3.2. Aufreinigung des Konjugates..... | 58 |
| 2. Herstellung von fBSA/PNA-Konjugaten | 61 |
| 2.1. Einleitung..... | 61 |
| 2.2. Chemikalien und Methoden | 61 |
| 2.2.1. Chemikalien | 61 |
| 2.2.2. Zellkultur..... | 62 |
| 2.2.3. Herstellung von fBSA/PNA-Konjugaten | 62 |
| 2.2.4. Zellbindungsstudien | 63 |
| 2.3. Ergebnisse und Diskussion..... | 63 |
| 2.3.1. Untersuchung der Zellbindung | 63 |
| 3. Eichgerade fBSA | 65 |
| 5. Literaturverzeichnis..... | 67 |
| Zusammenfassung..... | 71 |
| Summary..... | 73 |
| 6. Curriculum vitae..... | 75 |

1. Problemstellung und Zielsetzung

Die Harnblase stellt aufgrund der relativ einfachen Zugangsmöglichkeit über die Harnröhre ein Organ dar, das die Anwendung lokaler Therapiekonzepte begünstigt. Diese Tatsache nutzt man beispielsweise bei der intravesikalen Behandlung des Harnblasenkarzinoms. Allerdings kommt es trotz dieser guten lokalen Therapiemöglichkeit häufig zum Auftreten von Rezidiven (ca. 40%), die im schlechtesten Fall zu einem muskelinvasiven Karzinom mit weitaus geringeren Überlebenschancen fortschreiten können [1, 2, 3].

Eine effektivere adjuvante Behandlung des Harnblasenkarzinoms wird durch verschiedene Faktoren erschwert, unter anderem durch eine limitierte Penetration der Arzneistoffmoleküle in die Blasenwand sowie deren geringe Selektivität für Tumorzellen. Durch die Entwicklung neuer Targeting-Konzepte mit erhöhter Verweildauer und einem selektiveren Angriff am Tumorgewebe ließe sich die Behandlungseffizienz weiter steigern, wodurch Dosis sowie Nebenwirkungen reduziert und Kosten minimiert werden könnten.

Aus diesem Grund setzt sich die vorliegende Arbeit mit dem Problem auseinander, Arzneistoffe zielgerichtet und mit höherer Effizienz in entartete Harnblasenzellen einzuschleusen. Als Targetproteine für eine selektive Bioadhäsion wurden Lektine verwendet, die in Zellstudien eine präferentielle Bindung an maligne entartete Urothelzellen zeigten [4]. Nach Kopplung von Arzneistoffen sollten die daraus resultierenden Prodrug-Konjugate eine vielversprechende Möglichkeit zur Verbesserung der adjuvanten Therapie des Harnblasenkarzinoms bieten.

2. Grundlagen

2.1. Die Harnblase (lat. Vesica urinaria)

Die Harnblase, Bestandteil der ableitenden Harnwege, ist ein Hohlorgan, das im Subperitonealraum des kleinen Beckens hinter der Schambeinfuge liegt. Sie dient als Reservoir für den von den Nieren produzierten Urin und speichert ihn bis zu seiner Entleerung (Miktion). Harndrang kann schon bei einem Füllungszustand ab 150ml einsetzen, obwohl das maximale Fassungsvermögen zwischen 500ml und 2000ml beträgt [5, 6].

2.1.1. Wandaufbau

Von innen nach außen gesehen wird die Blasenwand gebildet durch eine

- Schleimhaut, auch Urothel,
- Bindegewebsschicht,
- Muskelwand, die, außer beim Harnblasendreieck, dreischichtig ist und in ihrer Gesamtheit *Musculus detrusor vesicae* genannt wird.

Die Hinterwand der Blase wird von einer Bindegewebsschicht und dem Peritoneum überzogen [5, 6].

Ist die Harnblase leer, so ist die Schleimhaut in Falten gelegt, glättet sich aber mit zunehmendem Füllungszustand. Eine Ausnahme stellt das Blasendreieck dar; hier ist die Schleimhaut fest mit der Muskelschicht verwachsen und somit immer glatt [6].

2.1.2. Das Urothel

Das Urothel bedeckt die innere Oberfläche von Nierenbecken, Harnleiter, Harnröhre und Harnblase.

Es besteht aus:

- Superfizialzellen („umbrella cells“), die in direktem Kontakt mit dem Lumen der ableitenden Harnwege stehen,
- intermediären Zellschichten,
- der basalen Zellschicht, die der Basalmembran aufsitzt [7].

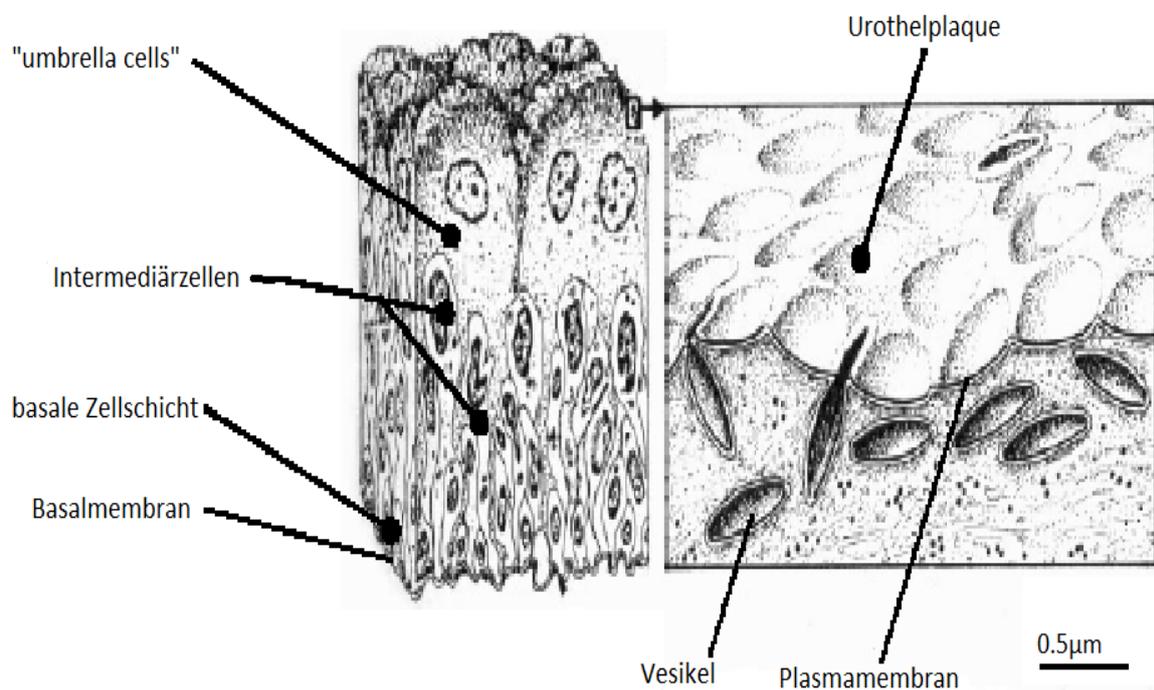


Abb.1: Aufbau des Urothels (mod. n. Krstiæ) [nach 8].

Die gänzliche Erneuerung des Urothels durch Zellabschilferung ist im Vergleich zu anderen Epithelien langsam und benötigt 3 bis 6 Monate. Diese Beständigkeit wird benötigt, um ein hochwirksames Diffusionshindernis aufzubauen und das Blut vor toxischen Substanzen zu schützen. Zusammen mit einem speziellen Feinbau führt die langsame Turnover-Rate dazu, dass unter allen Biomembranen im menschlichen Körper das flexible Urothel die effektivste und am schwersten zu penetrierende Barriere darstellt [9, 10]. Bezüglich des Feinbaus wird diese essentielle Aufgabe zum größten Teil durch sogenannte urotheliale Plaques, die sich primär in der Membran von „umbrella cells“ ausbilden, gemeistert. Sie belegen ungefähr 90% der luminalen urothelialen Oberfläche und bestehen aus integralen Membranproteinen, sogenannten Uroplakinen [10]. Diese Plaques sind nicht nur auf der luminalen Zelloberfläche zu finden, sondern ebenso in spindelförmigen Vesikeln im Zytoplasma der Zellen. Man nimmt an, dass sich diese Vesikel reversibel zwischen Zytoplasma und Zelloberfläche hin- und herbewegen, um die luminalen Zelloberfläche während Entleerung und Füllung der Harnblase an den Grad der Dehnung anzupassen [10]. Um eine gut funktionierende Barriere aufrechtzuerhalten, sind zusätzlich Tight Junctions, Lipide und Proteine der apikalen Membran sowie deren Glykokalyx von Bedeutung [9]. Die frühere Annahme, dass das Urothel eine gänzlich inerte Barriere zwischen Blutkreislauf und Urin darstellt, konnte mittlerweile widerlegt werden. Es wurde gezeigt, dass die Zellen des Urothels neben einer sekretorischen Aktivität, mit der sie die Zusammensetzung des Urins beeinflussen können, auch eine Vielzahl von Ionenkanälen, Rezeptoren und Liganden exprimieren, die sie zum Informationsaustausch mit umliegenden Zellen befähigen [10].

2.2. Harnblasentumor

Hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit des Auftretens liegen Krebsneuerkrankungen mit Lokalisation an der Harnblase bei Männern an vierter und bei Frauen an siebenter Stelle. Das bedeutet, dass durchschnittlich einer von 23 Männern und eine von 62 Frauen im Laufe des Lebens an Harnblasenkrebs erkranken werden. Allerdings liegt das durchschnittliche Erkrankungsalter für Männer bei 72 Jahren und für Frauen bei 74 Jahren und ist somit, verglichen mit dem durchschnittlichen Erkrankungsalter bei anderen Krebsarten, als hoch anzusehen [11].

Die Ätiologie vieler Harnblasentumore ist unklar, dennoch können einige Umweltfaktoren als wesentliche Ursache genannt werden. Meist sollte man aber nicht von einer einzigen Noxe als Grund der Krebsentstehung ausgehen [1].

Chronische Exposition gegen kanzerogene Substanzen, z.B. Rauchen, gehört zu den wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung eines Harnblasenkarzinoms. Gefährdete Berufsgruppen sind vor allem Beschäftigte in der Farbstoff-, Gummi-, Plastik- und Mineralölindustrie, da man hier verstärkt aromatischen Aminen und Azofarbstoffen ausgesetzt ist. Zusätzlich werden auch Alkylantien wie Cyclophosphamid und Süßstoffe wie Cyclamat und Saccharin mit der Entstehung des Harnblasenkrebses in Verbindung gebracht [12]. Allgemein betrachtet tritt aber die frühere Charakterisierung als klassische Berufskrankheit aufgrund besserer Expositionsprophylaxe zunehmend in den Hintergrund.

Die Pathogenese auf molekularer Ebene lässt auf zwei Hauptpfade der Krebsentwicklung schließen. Bei genetisch stabilen und gut differenzierten Tumoren spielt vermutlich eine Alternation des Chromosoms 9 und eine Mutationen des Fibroblasten Growth Factor Receptor 3 eine Rolle. Bei genetisch instabilen und niederdifferenzierten Tumoren ist eine Mutation des Gen p53 von Bedeutung. Grundsätzlich kann man davon ausgehen, dass nicht invasive Tumore ihren Ursprung in einer Hyperplasie des Endothels haben

und invasive Tumore eher über die Ausbildung flacher Läsionen und Cis (Carcinoma in situ) entstehen [1, 13].

2.2.1. Einteilung nach Tumorgrad und Entstehung

Grundsätzlich sollte man zwischen primären, also von der Harnblase selbst ausgehenden, und sekundären Blasentumoren, die hauptsächlich von den weiblichen Genitalien, der Prostata oder dem Dickdarm aus die Blase infiltrieren, unterscheiden. Von therapeutischer Relevanz ist eine Differenzierung zwischen nicht-muskelinvasiv wachsenden (etwa 80%) und muskelinvasiv wachsenden Tumoren [1].

Um das Stadium des Tumors besser beschreiben zu können, greift man primär auf die TNM-Klassifikationen zurück, wobei die lokale und organüberschreitende Ausdehnung des Tumors mit T, die Beteiligung der Lymphknoten mit N und das Vorhandensein von Fernmetastasen mit M beschrieben wird [1]. Ta (papilläres Karzinom), Tis (carcinoma in situ) und T1 (subepitheliales Bindegewebe wird infiltriert) werden als nicht-muskelinvasive Karzinome zusammengefasst.

T2 (Muskel wird infiltriert), T3 (perivesikales Fettgewebe wird infiltriert)

und T4 (Prostata oder Uterus

oder Vagina oder Becken-

oder Bauchwand wird

infiltriert) werden als

muskelinvasive Tumore

zusammengefasst [1].

TNM Klassifikation

- | | |
|--------|--------|
| 1. Tis | 5. T2b |
| 2. Ta | 6. T3 |
| 3. T1 | 7. T4b |
| 4. T2a | 8. T4a |

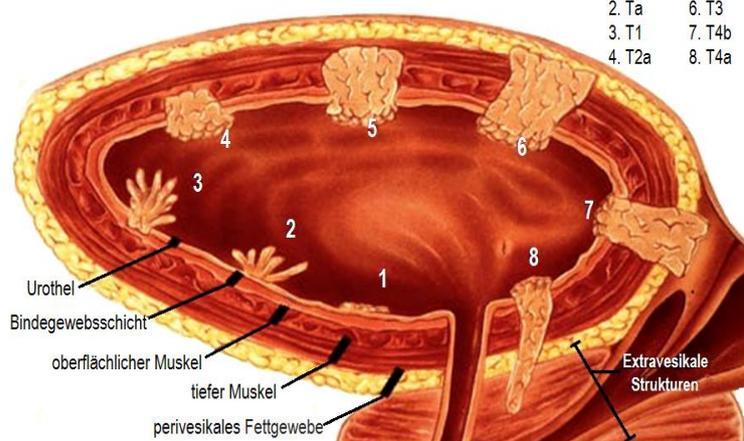


Abb. 2: Stadien des Harnblasentumors nach der TNM-Klassifikation [nach 14].

2.2.2. Symptome und Diagnose

Zu einem der wichtigsten Frühsymptome eines Harnblasentumors zählt die häufig schmerzlose Makrohämaturie. Weiters sind verstärkter Harndrang, häufiges Wasserlassen in kleinen Mengen und erschwerte, gewollte Entleerung ein Hinweis auf Blasen Tumore und insbesondere auf Cis. Flankenschmerz, Anämie, Beinschwellung u.a. treten meist erst als Spätsymptome auf [1, 13].

Die Diagnostik beinhaltet eine Anamnese, wobei auch auf die Berufsanamnese Wert gelegt werden sollte, Urinanalyse und eine Zystoskopie. Hier sollte erwähnt werden, dass mit der konventionellen Weißlichtzystoskopie etwa 10-20% der Karzinome nicht wahrgenommen werden. Alternativen stellen die Photodynamische Diagnostik (PDD), bei der man sich photosensitive Substanzen, die verstärkt in malignen Zellen akkumulieren, zu Nutze macht, und das Narrow Band Imaging (NBI), dar [13]. Im Rahmen des NBI bestrahlt man die Gewebeoberfläche der Harnblase mit Licht im blauen und grünen Spektralbereich. Jenes wird stark von Hämoglobin absorbiert und kann somit Strukturen, die stark durch Blutgefäße versorgt werden, insbesondere Tumore, sichtbar machen, da sie braun oder grün erscheinen. Neben der Zystoskopie wird auch noch eine alternative Bildgebung, z.B. durch Sonographie, Computertomographie, Kernspintomographie u.a., empfohlen [13].

2.2.3. Therapie des nicht muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms

Die Standardtherapie des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkrebses ist die chirurgische transurethrale Resektion. Trotz dieser Behandlung erleiden 70% der Patienten ein Rezidiv, wobei 25% früher oder später eine Progression zu einem muskelinvasiven Tumor aufweisen [2]. Deshalb ist eine adjuvante intravesikale Therapie, vor allem in

Form einer Frühinstillation mit Chemotherapeutika (Mitomycin C, Epirubicin u.a.) und/oder mit Immuntherapeutika (Bacillus Calmette-Guérin (BCG) u.a.) essentiell [3].

Die Harnblase ist über die Harnröhre gut zu erreichen; man kann sie daher auf lokalem Weg therapieren und belastet den Körper so kaum systemisch, da weniger als 5% der Dosis den Blutkreislauf erreichen [2]. Allerdings stellt auch genau diese Tatsache ein Problem dar. Eine intravesikale Chemotherapie kann aufgrund der schlechten Penetration in die Blasenwand oft keinen ausreichenden Therapieerfolg garantieren [15]. Es ist also von Bedeutung, die intravesikale Therapie zu verbessern. Zu den Möglichkeiten zählen beispielsweise eine Verminderung des Restharnvolumens und der Harnproduktion, Änderung des Urin pH-Wert (Mitomycin C penetriert besser, wenn der Harn alkalisch ist) und Verlängerung der Instillationszeit (>2h) [2]. Die Penetration kann auch durch Elektromotive Drug Application (EMDA) oder Thermotherapie gesteigert werden. Die EMDA bewirkt eine bessere Arzneistoffaufnahme in die Blasenwand durch das Anlegen einer elektrischen Spannung und bei der Thermotherapie wird die Aufnahme mit Hilfe lokaler Erwärmung verbessert [13].

Einen anderen innovativen therapeutischen Zugang stellen photosensitive Arzneimittel dar. Bei der sogenannten photodynamischen Therapie werden Prodrugs verabreicht, die selektiv in malignen Zellen akkumulieren. Durch Bestrahlung mit einer intravesikal platzierten Lichtquelle werden diese zytotoxisch aktiv. Hier sind allerdings noch Weiterentwicklungen und größere klinische Studien abzuwarten, bevor die Therapie in ihrem Nutzen definitiv bewertet werden kann [3].

2.2.4. Therapie des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms

Da ohne Therapie mehr als 85% der Patienten mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom innerhalb von 5 Jahren sterben, ist die radikale Zystektomie Goldstandard der

momentanen Behandlungsmethoden für Tumore, die auf die Harnblase begrenzt sind. Patienten mit hohem Alter, schwerwiegenden Komorbiditäten oder fehlender Bereitschaft zu einer radikalen Blasenentfernung können mit alternativen Methoden behandelt werden. Zu jenen gehören beispielsweise transurethrale Resektion, Blasenteilresektion, Chemotherapie, Radiotherapie oder Radiochemotherapie. Systemische Chemotherapie kommt auf jeden Fall beim metastasierenden Harnblasentumor zum Einsatz. Hier kann allerdings nur ein Überlebensvorteil von ungefähr 4 Monaten, Hand in Hand mit schweren Nebenwirkungen, erreicht werden [1].

2.3. Drug Targeting

Unter Drug Targeting versteht man den Versuch, den Arzneistoff so selektiv wie möglich an seine Zielzelle zu bringen und somit das Risiko für Nebenwirkungen zu vermindern. Man kann zwischen vier prinzipiellen Strategien des Targeting unterscheiden [16]:

Passives Targeting, bei dem man sich physiologische Besonderheiten des Zielgewebes zu Nutze macht, wie zum Beispiel eine erhöhte Durchlässigkeit der Gefäßwand in schnell proliferierenden Tumoren [16].

Physikalisches Targeting, das auf der Tatsache beruht, dass neoplastische Gewebe zum Teil einen geringeren pH-Wert und eine erhöhte Temperatur aufweisen. Eine andere Möglichkeit des physikalischen Targeting ist es, Wirkstoffe, wie Zytostatika, reversibel an magnetisierbare Partikel zu binden und durch das Anlegen eines äußeren Magnetfeldes im Tumorgewebe zu konzentrieren [16].

Targeting unter Verwendung zellulärer Trägerstoffe. Hier können Bakterien aber auch eukaryotische Zellen oder Zellhüllen als Träger fungieren [16].

Aktives Targeting. Alle Zelltypen weisen leicht unterschiedliche Eigenschaften auf, wie z.B. ein anderes Glykosylierungsmuster ihrer Zelloberfläche, verschiedene Rezeptoren oder Adhäsionsproteine u.a., und können somit von anderen Zelltypen unterschieden werden. Mit Hilfe von geeigneten Vektoren wird versucht, den Wirkstoff selektiv in Zellen mit einem bestimmten Oberflächencharakteristikum zu konzentrieren (Bsp. Überexpression des Rezeptors Her2 in Brustkrebsgewebe). Die Vektoren sollten eine ausreichende Stabilität, gute Kopplungseffizienz mit dem Wirkstoff und eine gute immunologische Verträglichkeit aufweisen. Solche Vektoren können beispielsweise Antikörper und deren Fragmente, Saccharide, Lipoproteine und Lektine darstellen [16].

2.4. Glykokalyx

Viele Membranproteine und -lipide einer Zelle sind kovalent mit Oligosacchariden besetzt. Die Gesamtheit dieser Glykokomponenten, kombiniert mit jenen Glykoproteinen und Proteoglykanen, die nur adsorptiv und nicht kovalent an die Membran gebunden sind, wird Glykokalyx genannt [16, 17]. Durch unterschiedliche Zuckerreste wird der Zelle auf diese Weise ein unverwechselbares Oberflächenprofil verliehen. Dieses Profil kann von spezifischen Oberflächenproteinen, so genannten Selektinen, anderer Zellen erkannt werden. Es kommt zu einer spezifischen Zell-Zell-Erkennung [17]. Somit können sich gleichartig differenzierte Zellen anhand der gleichartigen Glykokalyx erkennen, was eine wichtige Voraussetzung für die Entstehung von Gewebsverbänden darstellt [18].

2.5. Lektine

Lektine sind Proteine nicht immunogenen Ursprungs, die sich mit sehr hoher Spezifität reversibel an Mono- und Oligosaccharide zu binden vermögen. Sie sind in beinahe allen Organismen, von Viren bis hin zu Tieren, vorhanden und haben einen großen Stellenwert bei der Untersuchung von Veränderungen der Glykokalyx (und somit der Zelloberfläche) während verschiedener physiologischer und pathologischer Prozesse, wie Zelldifferenzierung oder Krebsentstehung [19].

Peanut agglutinin (PNA), isoliert aus *Arachis hypogaea* (Erdnuss), hat ein Molekulargewicht von 110kDa und besteht aus vier identen Untereinheiten. PNA bindet vorzugsweise an die häufig vorkommenden Galaktosyl (b-1,3) N-Acetylgalaktosaminreste [21].

Wheat germ agglutinin (WGA), isoliert aus *Triticum vulgare* (Weizen), ist ein dimeres Protein (MW 36kDa) aus zwei identen Untereinheiten, die wiederum in 4 Subdomänen unterteilt werden können [19]. WGA weist, je Subdomäne, eine Bindungstasche für Kohlenhydrate auf und bindet selektiv an N-Acetylglucosamin und N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure) [19, 20, 22].

2.6. Plasmaproteine

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurden das humane wie auch das bovine Serumalbumin verwendet, wobei das Albuminmolekül als Ersatz für einen Arzneistoff im entsprechenden Größenbereich oder als Spacer/Linker zur Kopplung mehrerer Arzneistoffmoleküle an ein Targeting-Protein anzusehen ist.

3. Ergebnisse und Diskussion

Mit dieser Arbeit konnte maßgeblich zur Publikation

Lectin-Prodrug Conjugates Trigger Urothelial Cytoinvasion -

A Biorecognitive Approach for Improved Intravesical Drug Delivery

(Anhang A) beigetragen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde, basierend auf dem Konzept des aktiven Drug-Targetings, versucht, zur Verbesserung der adjuvanten Therapie des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms und anderer das Urothel betreffender Erkrankungen beizutragen. Als Targeting-Protein fand WGA (Wheat Germ Agglutinin) Verwendung, das über Divinylsulfon kovalent an fluoreszenzmarkiertes BSA (Bovines Serum Albumin, fBSA) gekoppelt wurde. BSA sollte hierbei als Modell für größere Biopharmaka fungieren, das später durch den tatsächlichen Wirkstoff ersetzt oder als Spacer/Linker für einen solchen dienen könnte.

Die so erhaltenen Konjugate wurden daraufhin in einem Zellkulturmodell getestet, und sowohl im Hinblick auf ihre Bindung an die Oberfläche von Urothelzellen (SV-HUC-1) als auch ihre Aufnahme in die Zellen charakterisiert. Diese Untersuchungen wurden mit Einzelzellen und mit konfluenten Monolayern, die als Gewebemodell dienten, durchgeführt. Die ersten Schritte galten allerdings der Optimierung der Kopplung, der Aufreinigung des Konjugates und dem prinzipiellen Beweis, dass das entstandene Kopplungsprodukt auch die notwendige Funktionalität aufweist.

Um das für die Konzeptentwicklung optimale Konjugat zu ermitteln, kamen unterschiedliche Konzentrationen an WGA (5-, 10-, 20- und 40-facher molarer

Überschuss, bezogen auf fBSA) zum Einsatz. Vor der Aufreinigung wurde bei allen Konjugaten die Interaktion mit der Zelloberfläche überprüft, um festzustellen, ob das erhaltene Produkt auch tatsächlich zur Zellbindung befähigt ist. Hierfür wurden Einzelzellen verwendet, da die möglichen Bindungsstellen für das Konjugat hier maximiert sind und der Assay somit eine höhere Sensitivität besitzt. Um mögliche unspezifische Bindungsphänomene von BSA erfassen zu können und zu zeigen, dass ausschließlich WGA für die Oberflächeninteraktion mit der Zelle verantwortlich ist, wurde fBSA als Kontrolle in die Untersuchungen mit einbezogen.

In diesen Einzelzellversuchen ließ sich feststellen, dass die relativen Fluoreszenzintensitäten (RFI) als Maß für die Zellbindung bei größerer Konzentration an WGA zwar steigen, sich aber zwischen fBSA/WGA10 und fBSA/WGA40 kaum mehr Unterschiede ergeben (Anhang A, Tab.1.). Das weist darauf hin, dass die Menge an WGA, die an fBSA gekoppelt werden kann, zwar unterschiedlich und vom Molverhältnis abhängig ist, aber die für WGA zugänglichen Kopplungsstellen an fBSA im Bereich eines 10- bis 20- fachen molaren Überschusses von WGA gesättigt sein dürften. Um diese Annahme zu bestätigen, wurde nach der Purifikation mittels Säulenchromatografie (Superdex 200®) nach dem Größenausschlussprinzip ($V: 43\text{cm}^3$, Fraktionsgröße $350\mu\text{l}$, Fließgeschwindigkeit: 0.3ml/min) die Kopplungseffizienz berechnet.

Hierfür wurden alle Fraktionen einzeln spektrophotometrisch bei 280nm vermessen (U-3000 Spektrophotometer, HITACHI, Tokyo/Japan). Dadurch war es möglich, auf die Menge an freiem WGA und somit indirekt auf die Kopplungseffizienz (siehe Anhang A, Tab.1.) zuzuschließen.

Die Kopplungseffizienz sank graduell von 34.0% (fBSA/WGA5) über 30.6% (fBSA/WGA10) auf 25.0% (fBSA/WGA20). Danach erfolgte eine deutliche Abnahme auf 10.4% für fBSA/WGA40. Daraus lässt sich ableiten, dass bei einem 20- bis 40- fachen molaren

Überschuss an WGA die reaktiven Stellen am fBSA-Molekül weitgehend erschöpft sind und somit eine Sättigung der Reaktion eintritt. Deshalb war zwischen diesen beiden Konjugaten (fBSA/WGA20 und fBSA/WGA40) auch nur mehr ein marginaler Anstieg der Zellbindung zu beobachten. Eine Erhöhung des WGA/fBSA-Verhältnisses ab diesem Punkt resultiert also allenfalls in der Einführung weiterer WGA-Gruppen an Stellen, die aufgrund ihrer Zugänglichkeit nur einen minimalen Einfluss auf die Zellbindung haben.

Nicht nur, weil sich die Ergebnisse der Zellbindungsstudien kaum mehr unterscheiden, sondern auch aus ökonomischen Gründen wurde daher für alle folgenden Versuche das fBSA/WGA20- dem fBSA/WGA40-Konjugat vorgezogen.

Aufgrund der Kopplungseffizienz konnte ein ungefährender Modifikationsgrad zwischen 2 (fBSA/WGA5) und 5 (fBSA/WGA20) Molekülen WGA pro Molekül BSA bestimmt werden. Die Ergebnisse korrelierten gut mit jenen der GEMMA-Analyse, bei der ein Molekulargewicht von ca. 180kDa ermittelt wurde und somit einen Modifikationsgrad von 3-4 anzeigt. Auch das Bild der Gelelektrophorese, in der eine ungefähre Verteilung der erhaltenen Produkte in einer Größe zwischen 150 und 210kDA ablesbar war, unterstützt diese Aussage.

Da bei der Aufreinigung des Konjugates nicht, wie erhofft, zwei Peaks (Konjugat bzw. freies fBSA) zu beobachten waren, sondern nur ein breiter Elutionsbereich, wurden für alle weiteren Versuche die ersten 10-12 Fraktionen des Peaks verwendet (Anhang A, Fig.1). Durch diese Vorgehensweise war es möglich, etwaige Verunreinigungen durch nicht modifiziertes fBSA auszuschließen. Das Fehlen von freiem fBSA in den eingesetzten Fraktionen konnte ebenfalls durch GEMMA-Analyse und Acrylamid-Gelelektrophorese bestätigt werden. Im Gegensatz zu nativem Konjugat unmittelbar nach Kopplung zeigte sich hier für die untersuchten Fraktionen vom Anstieg bzw. Zentrum des Peaks (48 + 52) kein Signal im Bereich des fBSA. Zellbindungsstudien mit den

einzelnen Fraktionen des Peaks zeigten erwartungsgemäß eine stärkere Aktivität im frühen Elutionsbereich, wo Konjugate mit höherem Kopplungsgrad vorhanden sein sollten (Anhang A, Abb.1). Ab Fraktion 55 fiel die Aktivität deutlich ab. Dies kann einer zunehmenden Verunreinigung mit nicht modifiziertem fBSA zugeschrieben werden. Ungekoppeltes WGA konnte hingegen ohne Probleme mittels Säulenchromatographie entfernt werden und kann somit nicht mit der Bindung des Konjugates interferieren.

In weiterer Folge wurde eine konzentrationsabhängige Bindungsstudie durchgeführt, um nähere Informationen über die Interaktion des Konjugates mit Urothelzellen zu erhalten. Als Kontrolle wurde, wie in allen Versuchen, fBSA verwendet. Wie zu erwarten stieg mit höherer Konjugatkonzentration auch die zellgebundene RFI an. Die eingesetzten Konzentrationen des Konjugates waren nicht ausreichend, um eine komplette Absättigung WGA-reaktiver Gruppen auf der Zelle zu erreichen, allerdings flacht die Kurve im Bereich der höheren Konzentrationen sichtbar ab (Anhang A, Fig.2).

Um die Bindungsspezifität des Konjugates unter Beweis zu stellen, wurde N,N',N''-Triacetylchitotriose zur kompetitiven Inhibition der Bindung verwendet. Mit der höchsten getesteten Konzentration des Zuckers konnte die Konjugat-Zell-Bindung zu beinahe 80% inhibiert werden. Dies weist auf eine sehr spezifische Interaktion zwischen dem Lektin-Targeter und den korrespondierenden Zuckerresten auf der Oberfläche der Urothelzellen hin (Anhang A, Fig.3) Die unspezifische Bindung beträgt demnach maximal etwa 20%. In mehreren Kontrollversuchen konnte für fBSA alleine jedoch keinerlei Zellinteraktion/Bioadhäsion festgestellt werden. Daher ist davon auszugehen, dass eine Steigerung der Konzentration von N,N',N''-Triacetylchitotriose eine weitere Inhibition der Konjugat-Bindung zur Folge hätte und die unspezifische Bindung somit eigentlich wesentlich geringer ist.

Um die Aufnahme des Konjugates in SV-HUC-1 Zellen zu überprüfen, wurden temperaturabhängige Untersuchungen an Einzelzellen und Monolayern durchgeführt. Bei 4°C ist der Metabolismus der Zelle auf ein Minimum herabgesetzt. Es kann daher keine Internalisation des Konjugates erfolgen und die so erhaltenen RFI-Werte entsprechen weitestgehend einer rein oberflächlichen Membran-Bindung des Konjugates. Bei 37°C ist der Stoffwechsel der Zelle aktiv und Transportprozesse laufen normal ab, das Konjugat kann also von der Zelloberfläche internalisiert werden. Da die zellgebundenen Fluoreszenzintensitäten bei 4°C weder bei Monolayer- noch bei Einzelzellversuchen über die Zeit stark schwankten, ist von einer stabilen Bindung des Konjugates an die Zelloberfläche auszugehen. Sobald jedoch der Stoffwechsel der Zellen - nach Oberflächenbeladung bei 4°C - durch Erwärmung in Gang gesetzt wurde, war eine merkliche Reduktion der zellgebundenen Fluoreszenzintensität zu beobachten. Da die Fluoreszenzemission von Fluorescein pH-abhängig ist und im sauren Milieu später Endosomen/Lysosomen um bis zu 90% reduziert wird, konnte aufgrund der gemessenen Fluoreszenzsignale eine ungefähre Quantifizierung der Internalisation erfolgen. Für eine nähere Charakterisierung der Aufnahme wurden die Zellen außerdem nach der Fluoreszenzanalyse mit Monensin behandelt. Monensin ist ein Ionophor, das den Austausch von H⁺-Ionen gegen K⁺-Ionen katalysiert, wodurch es zu einem pH-Ausgleich zwischen den sauren Kompartimenten und dem Zytoplasma kommt. Dadurch sollte eine Wiederherstellung des ursprünglichen Fluoreszenzsignals nach der Beladung herbeigeführt werden. Auf diese Weise sollte verifizierbar sein, dass die Abnahme des Fluoreszenzsignals nicht darauf beruht, dass sich das Konjugat von der Zelle gelöst hat, sondern tatsächlich in die Zelle aufgenommen wurde.

Bei Internalisationsstudien an Einzelzellen wurde eine Reduktion des Fluoreszenzsignals von ca. 55% nach 120min erreicht, entsprechend einer Aufnahme von ungefähr der

Hälfte des oberflächengebundenen Konjugates. Hier war es möglich, etwa 90% des Signals durch Monensin zurückzustellen, Dies deutet auf einen nur geringen Verlust des Konjugates an die Umgebung hin. Interessanterweise konnten zu früheren Zeitpunkten (15-45min) nur maximal 62% des Signals wiederhergestellt werden. Das legt die Vermutung nahe, dass an diesen frühen Zeitpunkten ein Teil des Konjugates zwar bereits in internalisierter Form vorliegt, wodurch das Fluoreszenzsignal abnimmt, jedoch noch nicht die sauren Kompartimente der Zelle erreicht hat (Anhang A, Fig.4).

Die Ergebnisse an Monolayern waren durchwegs mit jenen an Einzelzellen vergleichbar. Hier erfolgte eine 42%ige Reduktion des Fluoreszenzsignals, das bei einer Internalisationszeit von 60 Minuten zu beinahe 65% wiederhergestellt werden konnte. Ab einer Inkubationsdauer von 90 Minuten bei 37°C überstieg das Fluoreszenzsignal nach Behandlung mit Monensin sogar den ursprünglichen Beladungswert, was auf eine beginnende Degradation des Trägerproteins unter Verminderung des intramolekularen Fluoreszenzquenches hindeutet.

Für eine mikroskopische Bestätigung des Aufnahmeprozesses wurden zeitgleiche bzw. sequenziell gestaffelte Internalisationsstudien mit dem Fluorescein-gelabelten Konjugat und Alexa-markiertem WGA (aWGA) durchgeführt (Anhang A, Abb. 5). Dabei ließ sich eine völlig analoge Zellinternalisation für Konjugat und freies aWGA mit einer Metabolismus-abhängigen Akkumulation in perinukleären Kompartimenten nachweisen. Die gestaffelte Beladung der Zellen mit aWGA nach vorheriger Konjugataufnahme zeigte das Vorhandensein neuer WGA Bindungsstellen auf der Zelloberfläche. Dies deutet auf eine fortlaufende Neuexpression oder ein Recycling der entsprechenden glycosylierten Membranbausteine hin.

Da im Rahmen dieser Arbeit alle Studien an SV-HUC-1 Zellen, also einer Zelllinie ohne malignen Hintergrund, durchgeführt wurden, ist es in weiterer Folge von besonderer

Bedeutung, alle Versuche auch an malignen Zelllinien zu verifizieren. In diesem Sinne wurden - als Vorversuche - Konjugat-Bindungsstudien auch an 5637 (Tumorgrad 2) und HT1376 (Tumorgrad 3) durchgeführt (Abb.3). Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass das Konjugat, wie erhofft, eine erhöhte Präferenz zur Bindung an maligne Zellen aufweist.

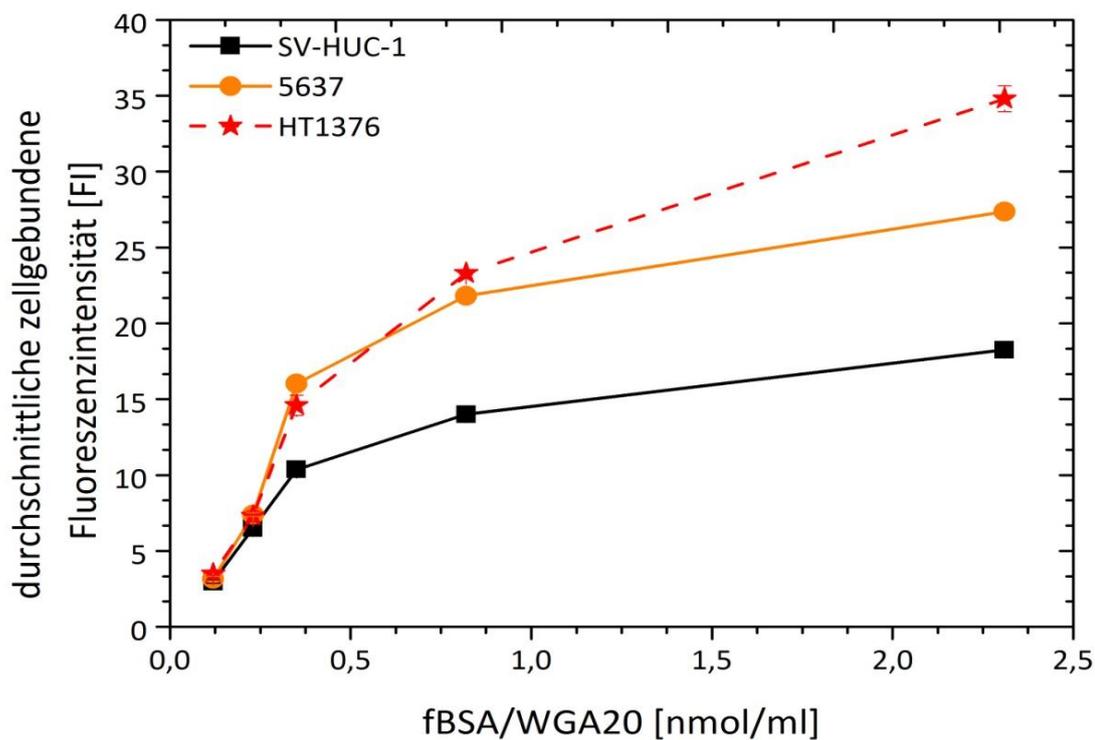


Abb. 3.: Zellgebundene Fluoreszenzintensitäten SV-HUC-1, 5637 und HT1376 ($MW \pm$, $n=3$) in Abhängigkeit der Konzentration. $50 \mu\text{l}$ Zellsuspension ($3.0 \cdot 10^5$ Zellen in PBS + Ca^{2+} und Mg^{2+}) wurden inkubiert mit $50 \mu\text{l}$ fHSA/WGA20 (Konzentration: 0.12, 0.23, 0.35, 0.82 und 2.31 nmol/ml (bezogen auf fBSA)) für 5min (5637), 20min (HT1376) oder 30min (SV-HUC-1). Nach einem Waschschrift wurde die zellgebundene Fluoreszenzintensität mit einem Epics XL-MCL Flowcytometer (Coulter, Miami, USA, ex/em 485/525nm) analysiert.

3.1. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Delivery-System entwickelt, das, basierend auf dem Konzept des aktiven Drug-Targetings, zur Verbesserung der adjuvanten Therapie des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms oder anderer intravesikal zugänglicher Erkrankungen beitragen soll. Das entwickelte Prodrug-System besteht aus fluoreszenzmarkiertem BSA (Bovines Serum Albumin), das über Divinylsulfon kovalent mit WGA (Wheat Germ Agglutinin) verknüpft wurde, welches als Targeting-Protein fungieren soll.

Das Hauptaugenmerk zunächst auf einer Optimierung der Kopplungs- und Reinigungsprozedur, wobei das Endprodukt zellkulturgestützt evaluiert wurde. Dabei erwies sich die Verwendung eines 20-fachen molaren Überschusses an WGA bezogen auf BSA als am geeignetsten. Um ein reines Produkt zu garantieren, wurden für die weitere Charakterisierung nach der Aufreinigung nur die ersten 10-12 Fraktionen des erhaltenen Peaks gepoolt. Unter den gewählten Bedingungen wurde so ein Konjugatgemisch mit durchschnittlichem Modifikationsgrad von 3-5 Molekülen WGA pro Molekül fBSA erhalten. Diese Parameter konnten dabei auch mit Hilfe alternativer Analyseverfahren (GEMMA, Acrylamid-Gelelektrophorese) bestätigt werden.

Anhand von Zellstudien wurde nachgewiesen, dass das Konjugat zur spezifischen Bindung an die Zelloberfläche befähigt ist und in weiterer Folge relativ rasch von den Zellen internalisiert wird. Das konnte auch durch Fluoreszenzmissionsmessung vor und nach Behandlung mit Monensin untermauert werden.

Um die Vermutung, dass WGA und somit auch das Kopplungsprodukt mit höherer Präferenz an maligne Zellen bindet, zu überprüfen, wurden konzentrationsabhängige Bindungsstudien neben SV-HUC-1 (Zellen ohne malignen Hintergrund) zusätzlich auch an

5637 (Tumorgrad 2) und HT1376 (Tumorgrad 3) durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das Konjugat im höheren Konzentrationsbereich tatsächlich eine verstärkte Tendenz zur Bindung an Zellen mit malignem Hintergrund aufweist (*Abb. 3*).

Die Ergebnisse der vorliegenden Diplomarbeit belegen, dass derartige Konjugate einen ersten Schritt in Richtung Verbesserung der adjuvanten Therapie des nicht-muskulinvasiven Harnblasenkarzinoms beruhend auf dem Konzept des aktiven Drug-Targetings darstellen könnten. Hinsichtlich der Spezifität der Bindung und deren Aufnahme in maligne Zellen sind weitere Untersuchungen in Arbeit.

Anhang A

To be submitted to EJPB

Research article

Lectin-Prodrug Conjugates Trigger Urothelial Cytoinvasion – A Biorecognitive Approach for Improved Intravesical Drug Delivery

Neusch L¹, Eggenreich B¹, Herwig E², Marchetti-Deschmann M², Allmaier G², Gabor F¹, Wirth M^{1*}

¹ Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, University of Vienna, Althanstr. 14, 1090 Wien, Austria

² Institute of Chemical Technologies and Analytics, Technical University of Vienna, Getreidemarkt 9, 1060 Wien, Austria

* corresponding author: michael.wirth@univie.ac.at

Keywords:

Drug Delivery, Conjugate, Lectin, Wheat Germ Agglutinin, Bovine Serum Albumine, Urothelium, Intravesical Therapy

Introduction

An unique membrane composition and cell architecture render the urothelial tissue of the lower urinary tract the hardest to penetrate epithelial barrier in the human body [Khandelwal 2009]. Specific transmembraneous proteins, so called uroplakins, assemble to crystalline plaques and form a resistive shielding against the harsh environment of the urine. High-resistance tight junctions impede paracellular transport, and, together with a limited pool of substrate-specific channels and transporters located in the hinge regions between adjacent plaques, maintain the strictly regulated diffusion barrier required for physiological function [Khandelwal 2009, Southgate 2008]. Many of these characteristic features also apply to cells in the diseased state, and thus put a significant hindrance to topical treatment schedules [Sarkar 2010].

The most important clinical indication for intravesical therapy is non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC)[Kaufman 2009]. Its management is complicated by a high rate of recurrence, which can be reduced to a certain degree by taking advantage of the direct access to the target site via instillation. Chemotherapeutic or immunomodulative agents can then be used at higher dosage without risking systemic drug exposure and associated side effects. However, treatment efficacy critically depends on the complete eradication of remaining cancerous or precancerous cells, and as such is limited by the poor urothelial bioavailability. The same limitations are made responsible for the low susceptibility of intracellular bacterial communities of uropathogenic *E. coli* to antibiotics, and ab initio hamper the establishing of novel therapy concepts that involve application of oligonucleotides or other complex biopharmaceuticals [Dhakal 2009, Sarkar 2010].

Over the last decade, the need for enhanced delivery strategies at the urothelium has increasingly been recognized. Apart from technical solutions to support drug administration by means of specialized equipment, efforts have mainly been directed towards the development of extended-release formulations. Most of these comprise hydrogels or particulate drug carriers made of a bioadhesive polymer, and have been designed with primary focus on prolonging residence time in the bladder cavity by means of unspecific tissue interaction. A constantly growing body of knowledge on the structural and functional peculiarities of the target site, however, may now allow for the development of second generation delivery systems, specifically tailored to promote urothelial uptake.

Endocytosis in bladder cells was found to occur by a nonclathrin, noncaveolar pathway, rarely include uroplakine plaques in differentiated cells and generally be of low relevance for fluid-

phase markers [Khandelwal 2009, Kreft 2009]. In contrast, membrane-bound material in the hinge regions between plaques is readily internalized, and subjected to a distinct intracellular trafficking. Such advantages of receptor-mediated, specific cell binding over unspecific bioadhesion are well documented for other tissues, but so far have not been evaluated for drug delivery in the urinary tract.

This study reports on the bioassay-guided development of a second-generation delivery strategy that utilizes the specific interaction of a lectin and its corresponding carbohydrate(s) to shuttle conjugated payload into urothelial cells. Wheat germ agglutinin (WGA), identified as the strongest lectin-based bioadhesive in previous studies, was covalently coupled to fluorescein-labeled bovine serum albumin (fBSA) to give a model drug of high molecular weight for characterization of cell binding and uptake. The modification was shown to result in efficient cytoadhesion and uptake of the fBSA conjugates by single cells and monolayers, assigning promising potential to glycotargeted delivery systems for intravesical therapy.

Materials and Methods

Chemicals

*Wheat germ agglutinin (WGA) from *Triticum vulgare* was purchased from Vector laboratories (Burlingham, USA). Dioxane was obtained from Merck (Darmstadt, Germany) and Superdex 200 prep grade from GE-Healthcare (Buckinghamshire, UK). The tissue culture media were purchased from Lonza (Basel, Switzerland) and Invitrogen Ltd (Paisley, UK). All other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) and of analytical grade.*

Cell culture

The SV-HUC-1 cell line, established from a donor without history of urothelial malignancy, was purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, USA) and used between passages 40 and 55. Cells were cultivated in Ham's F-12 medium containing 10% fetal calf serum, 0.5mM L-glutamine (Merck, Darmstadt, Germany) and Penicillin/Streptomycin in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere at 37° C. For subcultivation, 0.25% trypsin/0.038% EDTA was used. To obtain urothelial cell monolayers for binding and internalization assays, SV-HUC-1 were

seeded in 96-well microplates at a density of 17.000 cells/well and grown to confluency within 5-10 days. Medium was exchanged every other day.

Preparation of fBSA/WGA conjugates

All steps of the preparation process were carried out under protection from light to prevent bleaching of the fluorophore. For activation of primary amino groups of the carrier protein, a solution of 0.5 mg fBSA (7.6 nmol) in 0.5 ml of 20mM HEPES/NaOH pH 8.0 was added dropwise to a mixture of 0.1 ml divinylsulfone and 0.4 ml dioxane under constant agitation. The reaction mix was further stirred for one hour at room temperature followed by exhaustive dialysis against 20 mM HEPES/NaOH pH 8.0 to remove excessive coupling agent.

Covalent lectin modification was carried out by slowly adding 1.0 ml of a WGA solution in 20mM HEPES/NaOH pH 8.0 to the activated fBSA solution under stirring. This mixture was rotated end over end for at least 12 h at room temperature to let the coupling reaction proceed. The concentration of the WGA solution was adjusted to a 5-, 10-, 20- or 40-fold molar excess of lectin compared to fBSA, yielding the corresponding products fBSA/WGA5, fBSA/WGA10, fBSA/WGA20 and fBSA/WGA40, respectively. Non-reacted vinyl groups were saturated by incubating the reaction mix with 10 μ l of a 10 % (w/v) glycine solution in 20mM HEPES/NaOH pH 8.0 for 1h.

Size exclusion chromatography was used to purify conjugates after preparation. 0.5 ml of the reaction mix were applied to a Superdex-200[®] column of a total bed volume of 43cm³ and eluted with isotonic 20 mM HEPES/NaOH pH 7.4. Fractions were collected at a volume of 350 μ l each and analyzed at 280nm to determine total protein content and at 485/525nm (ex/em) for the amount of fBSA. A standard calibration curve of fBSA (0.500 - 0.0078 mg/ml; R²=0.999) in 20 mM HEPES/NaOH pH 7.4 was used for calculation. Optimized borders for fraction pooling were set according to the activity results from cell assays and comparison to unmodified fBSA eluted under the same conditions.

Estimation of the coupling efficacy

Coupling efficacy under different preparation conditions was determined by quantifying the amount of unreacted lectin after conjugation. The elution profile of free WGA in size exclusion chromatography was recorded at 280nm using a U-3000 Spectrophotometer (HITACHI,

Tokyo/Japan) and verified by comparison to a fluorescence-labeled standard. Analogously processed control samples with BSA, conjugate or known amounts of WGA were used to exclude interferences and calculate lectin content. All experiments were carried out in triplicate.

Surface binding of fBSA/WGA conjugates to urothelial cells

Flow cytometry was used to characterize the binding potential of individual fractions or pooled fBSA/WGA conjugates on SV-HUC-1 single cells. The experiments were carried out at 4°C, where cells are in a metabolically quiescent state and active transport processes are restricted to a minimum. For surface loading, 50µl of a pre-cooled cell suspension (3.0×10^5 cells in PBS +Ca²⁺/Mg²⁺) were incubated with 50µl of conjugate solution for 30 minutes. Unbound conjugate was removed by adding 100µl of cold PBS (+Ca²⁺/Mg²⁺) to the incubation mix and subsequent centrifugation at 1000 rpm for 5min. Cells were resuspended in 1ml of fresh PBS (+Ca²⁺/Mg²⁺) and the relative cell associated fluorescence intensity (RFI) was determined on an Epics XL-MCL analytical flow cytometer (Coulter, Miami, USA). A forward versus side scatter gate was used to confine analysis to the single cell population and exclude debris or cell aggregates. Surface-bound fBSA/WGA was detected at 488/525nm (ex/em) and corrected for cellular autofluorescence. A minimum of 2000 cells was accumulated for each measurement, and all experiments repeated in triplicate. The mean channel number of the logarithmic fluorescence intensities of the individual peaks was used for further calculations.

Specificity of the conjugate-cell interaction

To verify specificity of the fBSA/WGA-cell interaction and to check for potential influence of unspecific adhesion, binding studies were repeated under competitive inhibition with N,N',N''-triacylchitotriose, the carbohydrate of highest WGA affinity. 25µl of a SV-HUC-1 cell suspension (3.0×10^5 cells in 25µl PBS +Ca²⁺/Mg²⁺) were added to 25µl of isotonic 20mM HEPES/NaOH pH 7.4 containing different amounts of inhibitor (50.00 - 0.19 nmol/25µl, serial dilution). The suspension was mixed with 50µl of fBSA/WGA20 conjugate (684 pmol/ml corresponding to fBSA) in the same buffer and incubated for 30 minutes at 4°C. Cells were then washed by centrifugation (1000rpm, 5min, 4°C) to remove non-stably bound conjugate and resuspended in fresh buffer. RFI was determined via flow cytometry as described above. Each

concentration step was analyzed in triplicate and compared to a positive control, in which the cell suspension was incubated with the same conjugate in absence of inhibitor.

Endocytosis and intracellular trafficking of fBSA/WGA conjugates

The internalization of fBSA/WGA conjugates was investigated on SV-HUC-1 in single cell and monolayer state. Pulse-chase experiments with or without induction of active transport processes were followed by monensin treatment to gain information on the intracellular distribution.

Briefly, SV-HUC-1 in single cell suspension (50 μ l; 3.0×10^5 cells in PBS +Ca²⁺/Mg²⁺) were incubated with 50 μ l of fBSA/WGA20 (290pmol/ml corresponding to fBSA) in isotonic 20mM HEPES/NaOH pH 7.4 for 30 min at 4°C to let the conjugate bind to the surface (pulse). Cells were washed by centrifugation (1000rpm, 5min, 4°C) to remove unbound conjugate, and the volume adjusted to 200 μ l with isotonic 20mM HEPES/NaOH pH 7.4. Chase incubation was carried out for 15 - 120min either at 4°C or at 37°C in order to discriminate between passive and energy-driven uptake. After determining RFI via flow cytometry as described above, monensin was added to a final concentration of 1.49 μ mol/ml in order to restore the pH-dependent quench of the fluorescein label entrapped in acidic compartments. The fraction of conjugate sorted to the late endosomal/lysosomal pathway was determined by comparing the RFI after 4 min of equilibration time with monensin to the RFI before monensin treatment.

Monolayer experiments were carried out in 96-well microplates. Confluent cell layers were washed and cooled to 4°C prior to surface loading with 50 μ l/well of a fBSA/WGA20 solution (458pmol/ml corresponding to fBSA) in isotonic 20mM HEPES/NaOH pH 7.4. After incubation for 30 minutes at 4°C, cells were thoroughly rinsed with buffer and analyzed at 485/525nm (ex/em) using an Infinite M200 fluorometer (TECAN, Gröding, Austria) to determine the amount of surface-bound conjugate. Time-dependent internalization was followed by monitoring the decrease in RFI upon chase incubation at 4°C or 37°C for 15 - 90min. Prior to each measurement, the supernatant was exchanged by fresh buffer and analyzed fluorimetrically to detect potential dissociation of conjugate from the cell surface. As for single cells, a second measurement was carried out after addition of monensin (1.49 μ mol/ml final concentration) to conclude on conjugate accumulation in acidic compartments.

Results

Optimization of coupling procedure and purification

An adequate number of lectin targeter moieties per fBSA carrier is paramount for effective cytoadhesion. However, the preparation of conjugates with complete modification of all reactive groups on the carrier molecule may require a large excess of targeting ligand in the reaction mix, and not necessarily result in optimum performance. In the current study, we correlated the WGA:fBSA ratio in the preparation procedure to impact on coupling efficacy and cytoadhesion as the key parameter for product optimization.

Increasing the molar excess of WGA stepwise from 5 to 20 resulted in a concomitant, gradual decrease in coupling efficacy from 34.0% for fBSA/WGA5 to 25.0% in case of fBSA/WGA20, respectively (cf. Table 1). The amount of WGA in the reaction mix thus seemed to present the main limiting factor for modification in the lower concentration range. In contrast, a sudden drop in coupling efficacy to 10.4% upon further rising the WGA:fBSA ratio to 40:1 (fBSA/WGA40) pointed to a depletion of accessible divinyl groups on the fBSA carrier as the critical determinant beyond this point.

Binding assays with SV-HUC-1 single cells were carried out in parallel to determine up to what extent the differences in WGA modification between the individual preparations are reflected in the conjugate-cell interaction. Non-modified fBSA was included in the testing to assess unspecific adsorption phenomena that are not mediated by the lectin targeter, and showed only negligible adhesion below 0,01. Corresponding to the higher degree of modification, RFI was shown to increase with rising WGA:fBSA ratio (cf. Table 1). However, only minor improvements in cell binding were observed for a more than 10-fold molar excess of WGA in the coupling reaction. The fBSA/WGA20 conjugate, characterized by an optimized degree of accessible targeting ligands and high cytoadhesive potential, was thus chosen as the best suited formulation for further studies.

The molecular weight of the fBSA/WGA20 conjugate, as determined by GEMMA analysis, was found to lie in the range of 150-180kDa, corresponding to an average modification degree of 3-4 mole WGA per mole fBSA.

Size exclusion chromatography was used to purify the reaction mix, which can be expected to comprise conjugates of different modification degree, as well as unreacted WGA and fBSA.

While excessive lectin could easily be removed, all fluorescein-labeled compounds were found to elute in one broad peak without sufficient baseline separation between unmodified fBSA and the fBSA/WGA conjugate (supplementary material, Figure 1 A). The individual fractions from the main peak were thus analyzed via flow cytometry with regard to their cytoadhesive potential on SV-HUC-1 cells to determine optimal borders for product pooling. Corresponding to the increased number of WGA ligands per mole fBSA, fractions in the higher molecular weight range (fractions 45-52) showed enhanced cell binding values as compared to later eluting fractions, and only negligible binding activity was found in fractions higher than 57 (cf. Figure 1 A). For best yields of active conjugate with minimum inclusion of non-modified fBSA, only the first 10 fractions from the main peak were pooled for further characterization. Absence of free fBSA and lectin was confirmed by gel electrophoresis and GEMMA analysis (cf. Figure 1, B,C).

Cell interaction of fBSA/WGA20 conjugate

A more detailed analysis of the conjugate-cell interaction at 4°C revealed a concentration-dependent surface adhesion for fBSA/WGA20 to SV-HUC-1 single cells. The linear increase of RFI in the range of (0.115 – 0.350 nmol/ml, calculated via fBSA) was followed by gradual leveling off at higher concentrations, pointing to a specific, receptor-mediated binding process (cf. Figure 2). While the state of complete saturation was not reached under the given test conditions, no major alterations in binding potential are to be expected for conjugate concentrations higher than 2.5 nmol/ml.

Binding specificity

The competitive inhibitor N,N',N''-triacetylchitotriose was used to verify specificity of the conjugate-cell interaction. RFI decreased exponentially from 13.83 ± 0.55 for the conjugate alone to a remaining binding value of $2.80 \pm <0.01$ with 50nmol/25 μ l of complementary carbohydrate, corresponding to an inhibition of >80% (cf. Figure 3). This is indicative for a strictly controlled binding process, mediated by specific interaction of the lectin targeter with the corresponding membrane-bound carbohydrate residues. The tendency for unspecific surface adhesion at urothelial cells was shown to remain at a low level (<20%) even after conjugate preparation, ruling out significant influence of the coupling process on adsorption behavior.

Conjugate internalization by SV-HUC-1 single cells

The ligand-mediated uptake of fBSA/WGA20 into urothelial cells was assessed in pulse-chase experiments with or without induction of active transport processes. Initially, SV-HUC-1 single cells were surface loaded with conjugate for 30 min at 4°C, followed by incubation either at 4°C or 37°C for up to 120 min. RFI did not alter distinctively (mean RFI: 9.52 ± 0.21) during incubation at 4°C, where cells are in a quiescent state and metabolic processes are restricted to a minimum (cf. Figure 4). This points to a stable surface association of the conjugate without endocytosis or loss to the surrounding medium. In contrast, when incubated at 37°C to promote active transport, the RFI decreased from 9.52 ± 0.21 to 4.25 ± 0.07 during 120min, corresponding to an overall uptake of more than 55%. To verify endosomal/lysosomal processing of the internalized conjugate, cells were treated with monensin, which equilibrates the pH-gradient between the acidic compartments and the cytoplasm and restores the acidic quench of fluorescein. It was possible to compensate 48.3 - 62.9% of the fluorescence loss at earlier time points, and 87.8 - 90.3 % for an internalization time > 60min. Fluorescein is known to have higher signal intensity in free state than when covalently bound. A combinatorial effect of pH-dependent de-quenching and beginning carrier degradation may thus account for the higher fluorescence readout after monensin treatment at longer incubation time.

Conjugate internalization by SV-HUC-1 monolayers

Cell binding and internalization assays were repeated on SV-HUC-1 in confluent monolayer culture to more closely match the conditions found in the urothelial lining of the bladder tissue. Again, monolayers were surface loaded with fBSA-WGA20 at 4°C for 30min, followed by incubation at either 4° or 37°C for up to 90 min to monitor binding and distinguish between passive and active transport processes. The RFI was found to be stable over time when monolayers were kept at 4°C, demonstrating that fBSA/WGA20 did not detach from the surface (cf. Figure 5). Also, only negligible traces of fluorescence were found in the supernatant at any time point.

In case of incubation at 37°C, the RFI decreased gradually to about 58% of the initial value, where active uptake processes seemed to reach a state of saturation. Monensin treatment resulted in a large, but not complete (42.9 to 64.7 %) restoration of the fluorescein quench to the initial loading value. fBSA was included as a control and yielded a RFI not higher than the auto

fluorescence of the cells (2.0 ± 0.5) after the first washing step, which corresponds to the results found for single cells.

Conjugate internalization by SV-HUC-1 monolayers

Cell adhesion and internalization was followed by fluorescence microscopy to confirm the results of quantitative uptake studies. Concomitant and sequential internalization of Alexa-labeled WGA and fBSA/WGA20 revealed a complete analogy of binding and uptake pathway for free lectin and the conjugate (cf. Figure 6). Intracellular clustering could only be observed upon incubation at 37°C, while binding was confined to the surface at 4°C.

Discussion

The benefits associated with localized treatment schedules for urothelial diseases are compromised by a very selective and limited endocytotic activity of the target tissue and the short residence time available for absorption. It is thus key to the successful implementation of future delivery formulations into practice to best possibly take advantage of endogenous mechanisms that promote internalization. A more profound understanding of the membrane dynamics in urothelial cells has revealed striking differences in regard to uptake and intracellular trafficking of material from the luminal side, depending on whether or not ligand-mediated membrane binding is involved [Kreft 2009].

Fluid-phase markers were shown to be sparsely taken up by differentiated bladder cells. They also seem to have a reduced tendency of entering the late endosomal/lysosomal pathway, but may instead be shuttled back to the apical membrane by kiss-and-run recycling [Kreft 2009]. In contrast, membrane/receptor bound material was found to be internalized between the palques of superficial cells and durably trapped in intracellular compartments.

These findings assign intriguing potential to bioadhesive formulations, going beyond the mere extension of residence time. However, a directed, region-specific cell adhesion may present an essential requirement for efficient tissue uptake.

Lectins specifically adhere to the carbohydrate moieties of glycoproteins or proteoglycans in the cell membrane, and are effectively internalized in the epithelia of lung and the GI tract [Lehr 2000]. With regard to the FimH-mediated cell invasion of *E.coli* in the urinary tract, there is strong indication that the same holds true for the human urothelium [Dhakal 2008]. The conjugation of active pharmaceutical ingredients (API) to lectins may thus provide access to endogenous uptake routes which are not utilizable for the drug alone. However, it remains to be proven that the assembly to larger conjugates does not interfere with the ability to enter the endocytotic pathway, and the coupled payload is effectively accumulated in the target tissue.

In a preliminary screening for carbohydrate-reactive targeting ligands, we identified WGA as the lectin of highest interaction potential with human urothelial cells [Neutsch 2011]. Moreover, its stability under different outward conditions and structural constitution with diametrically opposed binding pockets render it particularly suitable for use in coupling chemistry [Gabor 2002]. We used fBSA as a model compound to evaluate the applicability of the delivery approach even to a payload of larger molecular weight. Such may include novel compounds from the biopharmaceutical pipeline which might be applied after direct conjugation (ligand-drug), or in form of multivalent drug conjugates connected via a spacer to the targeting ligand (ligand-linker-drug).

Naturally, defining the optimal ratio between targeting ligand and carrier molecule is a critical question in the design of conjugated delivery systems. An increased number of accessible lectin would be expected to result in a higher chance for the conjugate to bind to the corresponding carbohydrate moieties at the cell surface. However, next to economic considerations, the risk of inducing a sterical hindrance in the lectin-cell interaction at higher modification degrees or the formation of unwanted byproducts suggest the use of conjugates with the smallest ligand:carrier ratio required for adequate binding. In the present study, variations in the molar excess of WGA to fBSA from 5 to 40 in the conjugate preparation were directly reflected in alterations of coupling efficacy and cell binding (cf. Table 1). However, a steep increase in cell interaction was only found from fBSA/WGA5 to fBSA/WGA10, indicating that a molar excess of at least 10 is required to modify the majority of WGA coupling sites on the BSA molecule with strong influence on cell association. A concomitant analysis of the coupling efficacy revealed that rising the molar excess of WGA up to 20 still resulted in the introduction of additional lectin molecules in the BSA carrier, though without profound impact on binding potential. It might be concluded

that the additional WGA groups are introduced at positions with limited sterical access to membrane-bound carbohydrates, or the maximum binding level is already reached with fBSA/WGA10. Upon raising the ratio of WGA from 20 to 40, the coupling efficacy showed a drastic decrease from 25.0 to 10.4%, which points to a saturation of available coupling groups at an earlier stage (~ fBSA/WGA20). It should be noted that the preparation process is expected to result in a statistical distribution of conjugates with different degrees of modification rather than a single product. Alterations in cell binding and coupling efficacy may thus also reflect shifts in the distribution of the individual products.

With regard to preliminary results, fBSA/WGA20 was chosen as the best suited formulation for a further characterisation of binding and uptake behaviour. The average degree of modification as calculated via coupling efficacy was found to be in the range of 3 to 5 mol WGA per mol fBSA, which was confirmed by GEMMA and acrylamide gel electrophoresis. Though optimal preparation parameters may vary in dependence of the actual carrier molecule in future application, the fBSA model conjugate already gave proof of a well controllable process with the ability to fine-tune the degree of modification. This may be of particular interest for the design of multivalent (ligand-linker-drug) delivery systems, where subsequent immobilization of the API on the ligand-carrier complex relies on the availability of unreacted coupling sites .

Gel permeation chromatography was used to purify the conjugate after preparation and remove unreacted components. While remaining lectin could easily be separated from the product, unmodified fBSA was found to elute close to the conjugate without sufficient baseline resolution, even under optimized conditions (cf. Figure 1). The individual fractions containing fluorescence were thus analysed in detail to determine the optimal cutoff value for pooling. As expected, earlier eluting fractions (45-60) with conjugates containing more lectin molecules per fBSA also exhibited higher activity in the cell assay, while no binding was observed for fractions eluting towards the end of the peak, which may primarily comprise free fBSA. Fraction pooling was thus limited to the first 12 fractions of the peak, where GEMMA analysis and AA gel electrophoresis confirmed the absence of fBSA and free WGA.

Initial cell assays with purified fBSA/WGA20 showed a concentration-dependent surface adhesion to urothelial cells, with a gradual levelling-off at higher concentrations. Though still below the point of saturation, it can be concluded that the majority of accessible WGA-reactive

sites at the cell surface was occupied at maximum concentration. Importantly, these experiments were carried out at 4°C to impede membrane turnover and assess the net binding values without influence of internalization or potential recycling of WGA receptors. For cells in metabolically active state, however, increased membrane fluidity and dynamic turnover of glycoproteins may shift the point of saturation to higher concentration levels. In any case, the gradual saturation points to a specific, receptor-mediated adhesion of the conjugate to the plasma membrane.

High binding specificity is of pivotal importance for targeted delivery systems, and may be of particular relevance for an application at the urothelium. In dependence of their carbohydrate specificity, lectins were shown to be sorted into endocytotic pathways of distinct destination and with different efficacy after adhering to the surface of epithelial cells [Yi 2001]. This points to a critical role not only for quantitative aspects of cell adhesion, but also the specific site of membrane binding. In murine urothelial cells, WGA exhibited a significant preference for adhesion to hinge regions between the uroplakine plaques, which is the primary site for endocytosis to occur [Kreft 2009]. We evaluated binding specificity by competitive inhibition with N,N',N''-triacetylchitotriose, the carbohydrate of highest affinity to the WGA lectin. A gradual inhibition up to a level of >80% pointed to a very low amount of unspecific binding, which corresponds to the negligible adhesion of fBSA on SV-HUC found in control experiments. The WGA conjugate can thus be expected to be actively targeted to the regions of highest endocytotic activity on the apical plasma membrane.

The glycosylation pattern of membrane components may undergo characteristic changes in course of a disease process. Such is e.g. known to occur during malignant transformation in urothelial carcinoma, and may cause preferential binding of certain lectins in the diseased tissue. Comparative studies on cell culture models with or without history of malignant transformation revealed an increased binding potential for WGA to cancerous cells [Neutsch 2011]. Lectin-mediated delivery may thus allow for a tissue-specific targeting, provided the high degree of specific binding results in an enhanced intracellular accumulation.

Despite groundbreaking insights in the recent past, the regulatory mechanisms and pathways involved in endocytotic traffic at the urothelium are still far from being fully understood [Khandelwal 2009]. The dynamic adaption of surface area during cycles of bladder filling and

voiding seem to be the primary driving force, which may also account for the remarkably improved uptake observed for membrane-bound substances as compared to fluid-phase markers [Kreft 2009]. For the first time, we were able to demonstrate that the same pathway could be utilized for the delivery of lectin-conjugated payload, even of molecular weight above 150kDa. More than 50% of surface bound fBSA/WGA20 conjugate was found internalized in SVHUC single cells within 60 min of incubation. Cells in monolayer culture exhibited a slightly reduced and more gradual uptake of up to 42% after 90min, which may result from the smaller surface area accessible in confluent tissue configuration.

Monensin treatment and fluorescence microscopy were used to gain further insights in the intracellular trafficking pathway, and gave evidence for a progressive, though not immediate, transfer into acidic late endosomal/lysosomal compartments. For internalization times of less than 60 min, the fluorescein signal could only partly be restored by monensin. This may indicate a transient accumulation in early endosomes of low acidity, associated with quenching effects that are not merely pH-dependent. At later timepoints, internalized conjugate seems to be transferred to acidic compartments, where the signal can be restored upon levelling the pH. The starting degradation of fluorescein-bearing molecules was previously shown to result in intensity readouts beyond the starting value, as a consequence of reduced intramolecular quenching [Gabor 2002]. Certain lysosomal degradation processes may thus proceed on a faster timescale when cells are in monolayer state.

By providing a reproducible test platform without uncontrollable influence of external stimuli, urothelial cell culture represents a valuable tool for the bioassay-guided optimization of novel delivery strategies. However, urothelial cells *in vitro* are known to retain a proliferative phenotype of potentially higher endocytic activity, and may thus have closer analogy to the diseased, dedifferentiated state (as e.g. found in bladder cancer or interstitial cystitis) than to physiological tissue [Southgate 2007, Kreft2009]. Though the uptake pathway of fBSA/WGA conjugates was shown to parallel the route of WGA alone, and has vivid activity in terminally differentiated urothelium [Kreft 2008], further evaluation *in vivo* will be required for a quantitative estimation of the potential benefits associated with carbohydrate-mediated delivery systems.

Conclusion

By providing access to endogenous uptake routes that are not utilizable for solubilized compounds, conjugation to lectins was shown to offer remarkable potential for enhanced cytoinvasion of urothelial cells. WGA may at this promote surface adhesion in membrane regions that have particularly high endocytotic activity. WGA-modified fBSA was used as a model for prodrug conjugates of high molecular weight, and was effectively accumulated in late endosomal/lysosomal compartments of single cells and monolayers. The successful conjugate delivery in cell culture models provides novel stimuli for the development of lectin-based prodrug concepts for intravesical therapy of urothelial carcinoma, and warrants further investigation in more comprehensive *in vivo* settings.

References

J. Barthelmes, G. Perera, J. Hombach, et al., Development of a mucoadhesive nanoparticulate drug delivery system for a targeted drug release in the bladder, *Int. J. Pharm.* (2011) in press

B.K. Dhakal, R.R. Kulesus, M.A. Mulvey, Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*, *Eur. J. Clin. Invest.* 38 (2008) 2-11

F. Gabor, A. Schwarzbauer, M. Wirth, Lectin-mediated drug delivery: binding and uptake of BSA-WGA conjugates using the Caco-2 model, *Int. J. Pharm.* 237 (2002) 227-239

D.S. Kaufman, W.U. Shipley, A.S. Feldman, Bladder cancer, *Lancet* 374 (2009) 239-249

P. Khandelwal, S.N. Abraham, G. Apodaca, Cell biology and physiology of the uroepithelium, *Am J Physiol Renal Physiol* 297 (2009) F1477-F1501

L. Neutsch, V. Plattner, S. Polster-Wildhofen et al., Lectin-mediated biorecognition as a novel strategy for targeted delivery to bladder cancer, *J. Urol* (2011) in press

S.G. Sarkar, R. Banarjee, Intravesical drug delivery: Challenges, current status, opportunities and novel strategies, *J. Control. Rel.* (2010) doi: 10.1016/j.jconrel.2010.08.031

J. Southgate, C.L. Varely, M.A.E. Garthwaite et al., Differentiation potential of urothelium from patients with benign bladder dysfunction, *BJU International* 99 (2007) 1506-1516

M.E. Kreft, R. Romih, M. Kreft et al., Endocytotic activity of bladder superficial urothelial cells is inversely related to their differentiation stage, *Differentiation* 77 (2009) 48-59

M.E. Kreft, K. Jezernik, M. Kreft et al., Apical plasma membrane traffic in superficial cells of bladder urothelium, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1152 (2009) 18-29

C.-M. Lehr, Lectin-mediated drug delivery: The second generation of bioadhesives, *J. Control. Rel.* 65 (2000) 19-29

S.M.P. Yi, R.E. Harson, J. Zabner et al., Lectin binding and endocytosis at the apical surface of human airway epithelia, *Gene Therapy* 8 (2001) 1826-1832

Tables and figures

Figure 1

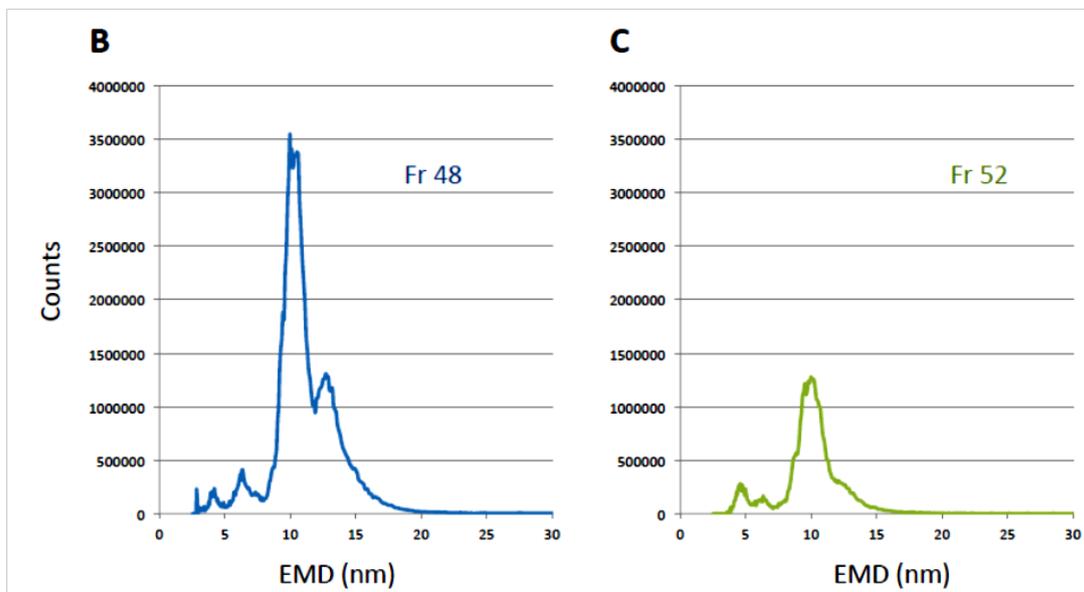
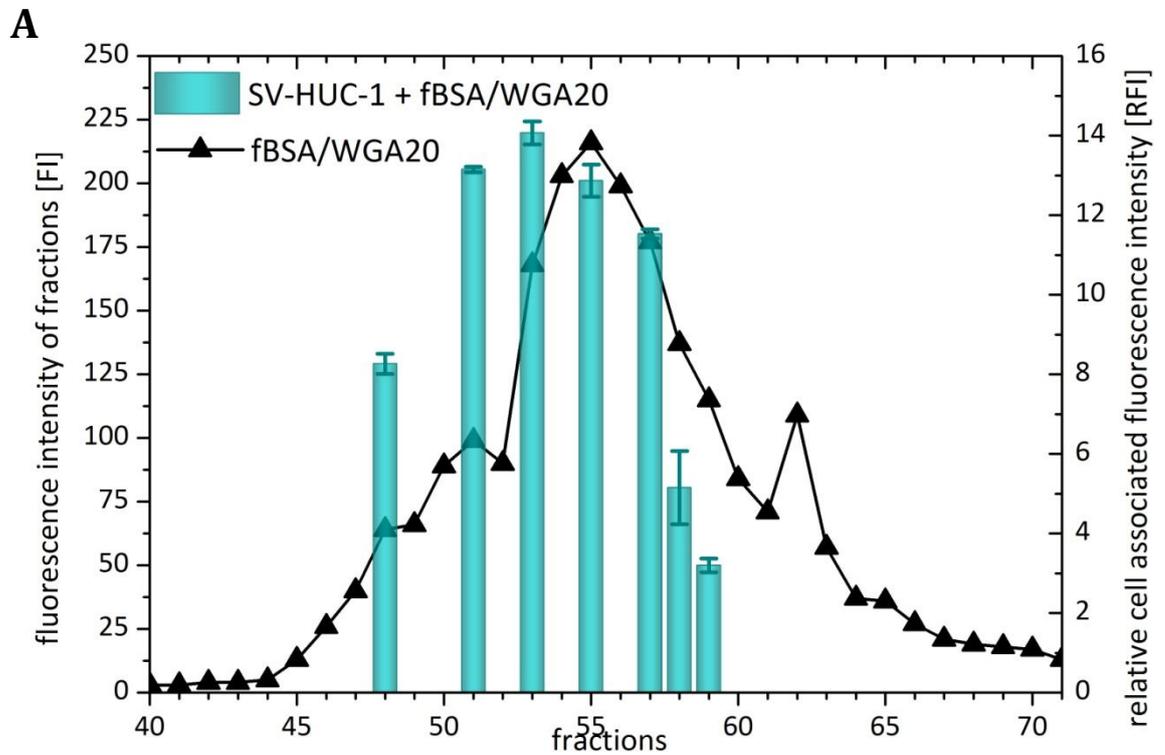


Figure 2

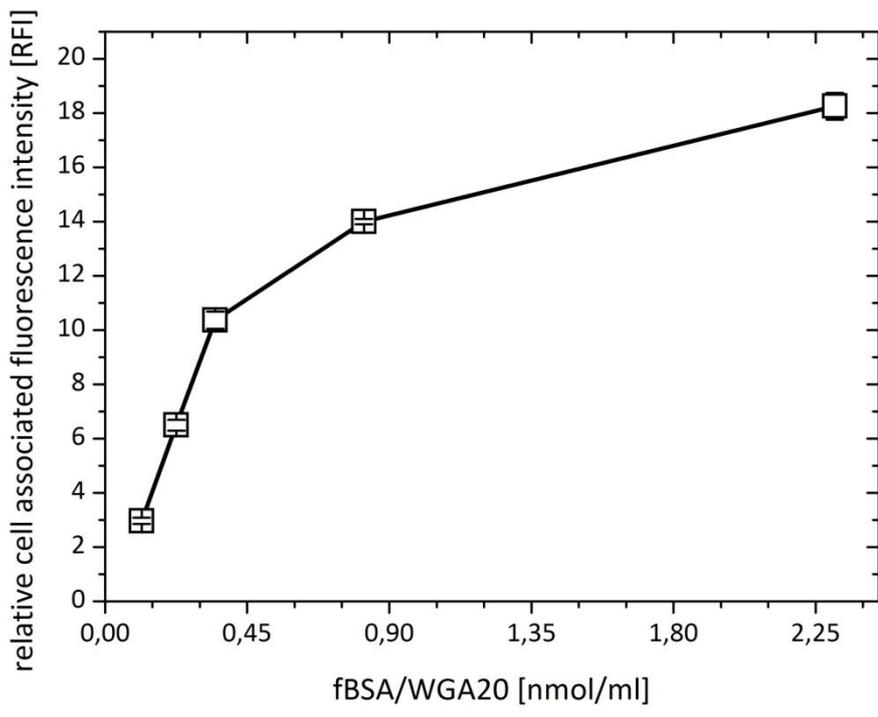


Figure 3

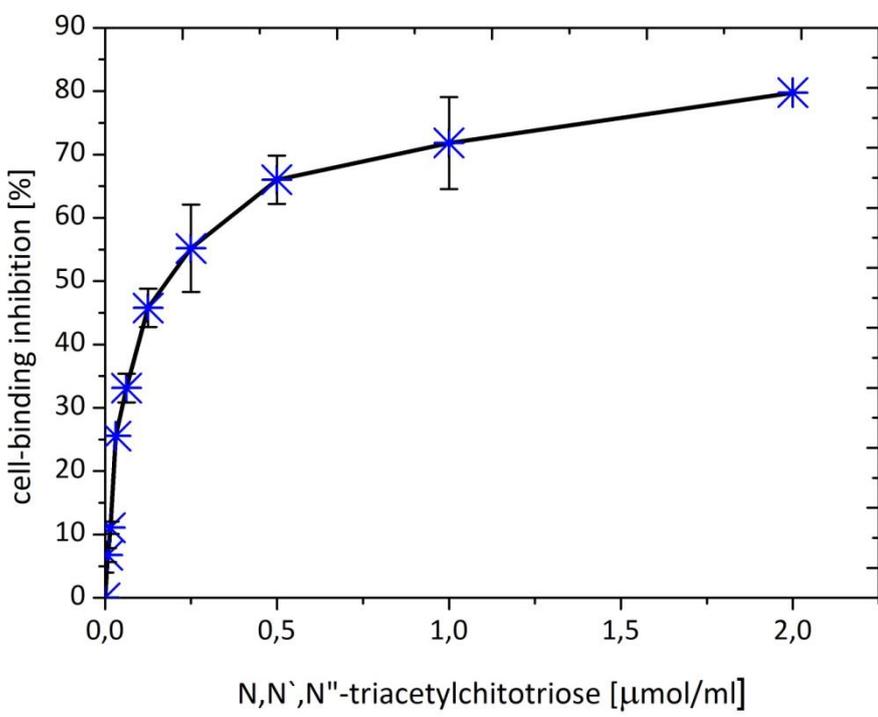


Figure 4

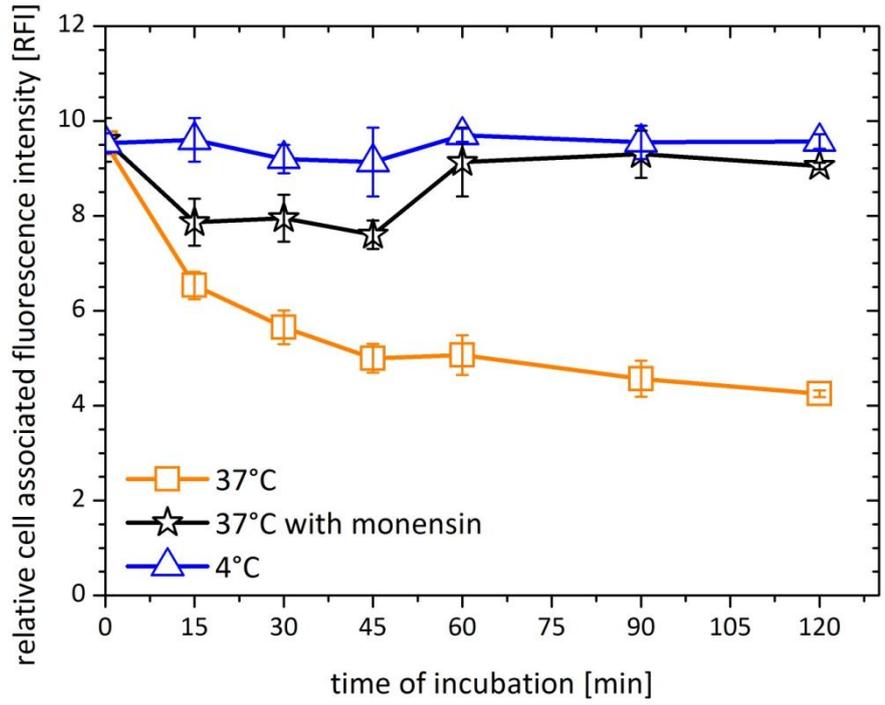


Figure 5

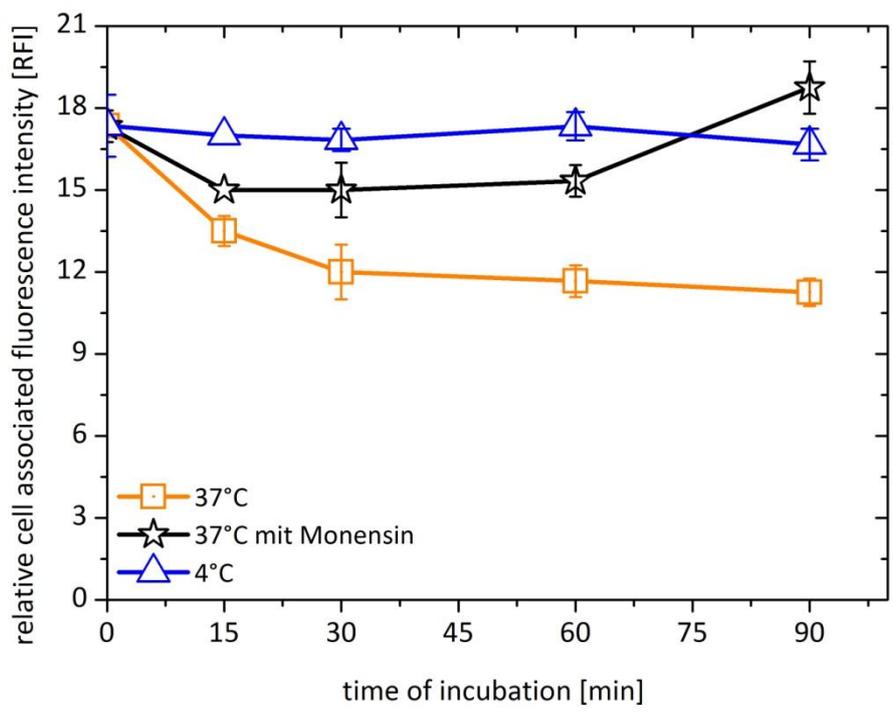


Figure 6

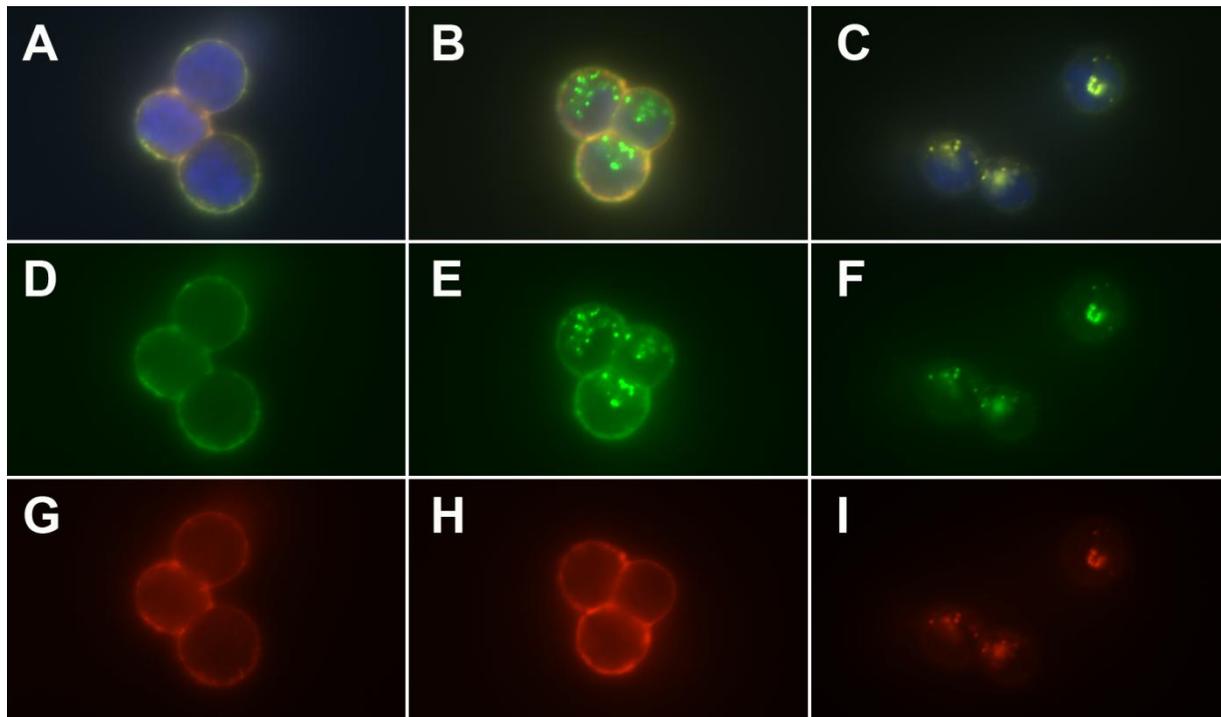


Table 1

| Conjugate | Ratio of WGA to fBSA in conjugate preparation [fold molar excess] | Relative cell-associated fluorescence intensity [RFI \pm SD] | Coupling efficacy [%] |
|------------|---|--|-----------------------|
| fBSA/WGA5 | 5 | 0.75 \pm 0.17 | 34.0 |
| fBSA/WGA10 | 10 | 1.47 \pm 0.28 | 30.6 |
| fBSA/WGA20 | 20 | 1.57 \pm 0.15 | 25.0 |
| fBSA/WGA40 | 40 | 1.61 \pm 0.56 | 10.4 |
| fBSA | - | <0,01 | - |

Captions

Fig.1: Biological activity and GEMMA spectra of the fractionated fBSA/WGA20 conjugate. **(A)** Fluorometric analysis at 485/525nm (ex/em) yielded the elution profile of fluorescein-labeled compounds. The cytoadhesive potential of chosen fractions was determined in binding assays on SV-HUC-1 single cells. RFI values represent mean \pm standard deviation (n =3). Gemma spectra were recorded for the purified fractions 48 **(B)** and 52 **(C)**.

Fig.2: Concentration-dependent cytoadhesion of the fBSA/WGA20 conjugate. SV-HUC-1 single cells were incubated with varying concentrations of conjugate (30min, 4°C), washed, and analyzed for cell-associated fluorescence via flow cytometry. Values represent mean \pm standard deviation (n =3).

Fig.3: Competitive inhibition of fBSA/WGA20-cell association by N,N',N''-triacetylchitotriose. SV-HUC-1 cells were incubated with fBSA/WGA20 (684pmol/ml) for 30min at 4°C in presence of increasing amounts of complementary carbohydrate (0.0 – 2.0 μ mol/ml). Cells were washed and analyzed for cell-associated fluorescence intensity via flow cytometry. Values represent mean \pm standard deviation (n =3).

Fig.4: Internalization of fBSA/WGA20 conjugate by SV-HUC-1 single cells as determined via pulse-chase incubation. Cells were surface-loaded with fBSA/WGA20 (290pmol/ml) at 4°C and chase-incubated for up to 120min at 4°C or 37°C, respectively. RFI was determined via flow cytometry prior and after monensin addition. Values represent mean \pm standard deviation (n =3).

Fig.5: Internalization of fBSA/WGA20 conjugate by SV-HUC-1 monolayers. Confluent cell monolayers were incubated with fBSA/WGA20 (458pmol/ml) at 4°C for surface binding. Internalization was followed during chase-incubation for up to 90min at 4°C or 37°C, respectively. Supernatant was exchanged by fresh buffer and cell-bound fluorescence determined at 485/525nm (ex/em), prior and after addition of monensin. Values represent mean \pm standard deviation (n =3).

Fig.6: Microscopic analysis of conjugate binding and internalization by pulse-chase incubation of SV-HUC-1 single cells. Images show merged channels with Hoechst 33342 nuclei stain **(A-C)**, or individual channels for fluorescein **(D-F)** and alexa label **(G-I)**. Co-incubation with fBSA/WGA20 conjugate and Alexa-WGA at 4°C **(A, D, G)**. Sequential internalization of fBSA/WGA20 conjugate (37°C, 45min) after surface loading (4°C, 30min), followed by incubation with Alexa-WGA (4°C,

30min) (**B, E, H**). Co-internalization of fBSA/WGA20 conjugate and Alexa-WGA at 37°C after surface loading at 4°C (**C, F, I**).

Tab.1: Process parameters for fBSA/WGA conjugate preparation and impact on cytoadhesion. Cell binding to SV-HUC-1 single cells and coupling efficacy were determined for conjugates prepared with different molar ratios of WGA:fBSA. Conjugate concentration for bioassays was adjusted to 1nmol/ml, values represent mean \pm standard deviation (n =3). Coupling efficacy denotes the percentage of WGA consumed during the modification process.

Anhang B

Weitere im Rahmen der Diplomarbeit durchgeführte Untersuchungen

1. fHSA/WGA-Konjugate

1.1. Einleitung

In dem im Rahmen der Diplomarbeit vorgestellten konzeptionellen Ansatz wurde Serumalbumin als Modellprotein verwendet, stellvertretend für Wirkstoffe aus der Biotech Pipeline oder aber als Spacer/Linker zur Kopplung mehrerer Arzneistoffmoleküle an ein Targeting-Protein. Um immunologische Reaktionen, wenngleich in der Blase ohne direkten Kontakt zum Blutkreislauf eher unwahrscheinlich, bei letzterem Ansatz hintanzuhalten, wurde ursprünglich das humane dem bovinen Serumalbumin als Kopplungspartner für WGA vorgezogen.

1.2. Materialien und Methoden

1.2.1. Chemikalien

Wheat germ agglutinin (WGA) aus *Triticum vulgare* wurde von Vector laboratories (Burlingham, USA) erworben. Dioxan stammte von Merck (Darmstadt, Germany) und Superdex 200[®] prep grade von GE-Healthcare (Buckinghamshire, UK). Die

Gewebekulturmedien wurden von Lonza (Basel, Switzerland) bzw. Invitrogen Ltd (Paisley, UK) geliefert. Alle anderen Chemikalien wurden bei Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) gekauft und wiesen Analysequalität auf.

1.2.2. Zellkultur

SV-HUC-1 Zellen

SV-HUC-1 Zellen stammen ursprünglich von einem Spender, dessen Urothel keine maligne Veränderung aufwies, und wurden von der American Type Culture Collection (Rockville, USA) bezogen. Die Zellen wurden in HAM's F-12 Medium in befeuchteter 5% CO₂/95% Luftatmosphäre bei 37°C kultiviert. Dem Medium wurden noch zusätzlich 10% FCS, 0.5mM L-Glutamin und 5ml 10µg/ml Penicillin/Streptomycin-Lösung zugesetzt. Für die Experimente wurden Zellen der Passagen 17 bis 25 eingesetzt. Die Subkultivierung erfolgte mit 0.25% Trypsin/EDTA.

5637

Die 5637 Zelllinie, bezogen von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA), ist malignen Ursprungs und weist nach der Klassifikation den Tumorgrad 2 auf. Die Kultivierung erfolgte in befeuchteter 5% CO₂/95% Luftatmosphäre bei 37°C, die Subkultivierung wurde mit 0.25% Trypsin/EDTA durchgeführt. RPMI 1640, dem 10% FCS, 4mM L-Glutamin und 150µg/ml Gentamycin zugesetzt wurden, wurde als Medium für die Zellkultivierung verwendet. Die für die Zellbindungsstudien eingesetzten Passagen lagen zwischen 73 und 94.

1.2.3. Herstellung der fHSA/WGA-Konjugate

0.5ml einer Lösung von 0.5mg fHSA in 20mM HEPES/NaOH-Puffer pH 8.0 wurden tropfenweise und unter ständigem Rühren 0.5ml einer Mischung von Divinylsulfon und Dioxan (1+4) zugesetzt. Nach einstündigem Rühren wurde überschüssiges Divinylsulfon durch ausgiebige Dialyse gegen 20mM HEPES/NaOH-Puffer pH 8.0 entfernt. Anschließend wurde der jeweils gewünschte molare Überschuss an WGA (5- bzw. 20-fach im Vergleich zu fHSA, gelöst in 1ml 20mM HEPES/NaOH-Puffer pH 8.0; fHSA/WGA5 bzw. fHSA/WGA20) zugegeben. Nach einer mindestens 12-stündigen Inkubation unter ständiger end-over-end Agitation wurden 10 μ l einer 10% (M/V) Lösung von Glycin in 20mM HEPES/NaOH-Puffer pH 8.0 zur Absättigung der Reaktion zugesetzt [23].

1.2.4. Zellbindungsstudien

Alle Untersuchungen zur Zellbindung fanden vor der Aufreinigung des Konjugates statt. Hierfür wurden 50 μ l vorgekühlte (4°C) Zellsuspension (3.0×10^5 Zellen in PBS + Ca²⁺ und Mg²⁺) mit 50 μ l Konjugatlösung versetzt. Die Inkubationszeit der Zellen war je nach Zelllinie unterschiedlich. Sie betrug bei den 5637-Zellen 5min und bei den SV-HUC-1 Zellen 30min. Die Beladung wurde stets bei 4°C durchgeführt, da bei dieser Temperatur der Stoffwechsel der Zellen auf ein Minimum herabgesetzt ist und somit keine Aufnahme des Konjugates in die Zellen stattfinden kann. Ungebundenes Konjugat wurde durch Waschen entfernt. Dazu wurden 100 μ l kalter PBS (+ Ca²⁺ und Mg²⁺) zur inkubierten Zellsuspension zugesetzt und anschließend 5min lang bei 1000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und die Zellen in frischem PBS (+ Ca²⁺ und Mg²⁺) resuspendiert.

Mit Hilfe eines Epics XL-MCL Flowcytometers (Coulter, Miami, USA) erfolgte eine Dreifachbestimmung der relativen zellassozierten Fluoreszenzintensität (RFI). Dabei wurden jeweils Daten von mindestens 500 Zellen erfasst.

1.2.5. Aufreinigung des Konjugates

Die Aufreinigung des fHSA/WGA-Konjugates erfolgte über Gelchromatographie mit einer Superdex-200[®] Säule. Auf die Säule mit einem Durchmesser von 11mm und einem Volumen von 43cm³ wurden 0.5ml der Konjugatmischung bzw. 0.5ml reines fHSA aufgetragen und mit 20mM HEPES/NaOH-Puffer pH 8.0 eluiert. Zu Kontrollzwecken wurden zusätzlich 0.5mg reines fHSA in 0.5ml 20mM HEPES/NaOH-Puffer pH 8.0 gelöst und mit Harnstoff (Endkonzentration 6mol/l) versetzt. Anschließend wurde diese Probe mit 20mM HEPES/NaOH-Puffer pH 8.0, versetzt mit Harnstoff (Endkonzentration 2mol/l), eluiert. Die gesammelten Fraktionen hatten jeweils ein ungefähres Volumen von 350µl und wurden einzeln mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikrotiterplattenreaders (Infinite M200 TECAN, Grödig/Salzburg Austria) bei ex/em 485/525nm analysiert.

1.3. Ergebnisse und Diskussion

1.3.1. Untersuchungen zur Zellbindung

Der Zellaassay an SV-HUC-1 Zellen und 5637 Zellen diente dazu, die prinzipielle Funktionalität des Konjugates zu beweisen und zu zeigen, dass das Kopplungsprodukt konzentrationsabhängig an beide Zelllinien bindet.

Die RFI-Werte lagen bei der Bindungsstudie mit fHSA/WGA5 an 5637-Zellen zwischen 4.07 ± 0.32 und 8.50 ± 0.20 , bei fHSA/WGA20 zwischen 8.53 ± 0.25 und 16.07 ± 0.32 . An SV-HUC-1 Zellen konnten RFI Werte für fHSA/WGA5 zwischen 2.90 ± 0.35 und 6.60 ± 0.17 , für fHSA/WGA20 Werte zwischen 6.37 ± 0.12 und 12.57 ± 0.21 ermittelt werden (Abb.4). Als Negativkontrolle wurde reines fHSA verwendet. Da die RFI-Werte bei fHSA-inkubierten Zellen jedoch nicht über der natürlichen Eigenfluoreszenz der Zellen lagen, war keine Korrektur der Bindungswerte um den Negativkontroll-Wert notwendig. Das Ergebnis sollte daher auch durch möglicherweise nicht abgetrenntes fHSA in der Konjugatmischung nicht verändert werden.

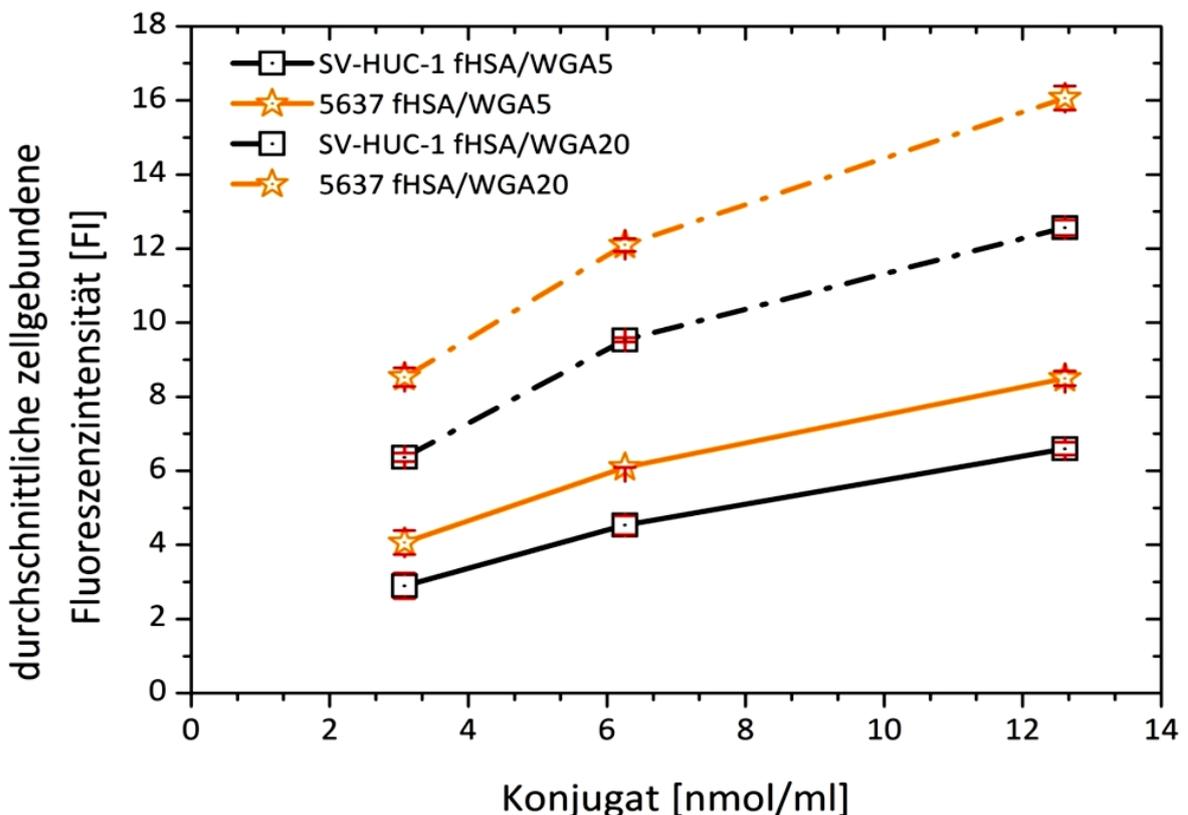


Abb.4: Konzentrationsabhängige Bindung der fHSA/WGA Konjugate an SV-HUC-1 und 5637 (MW±STABW, n=3). 50µl Zellsuspension ($3.0 \cdot 10^5$ Zellen in PBS + Ca^{2+} und Mg^{2+}) inkubiert mit 50µl fHSA/WGA5 oder fHSA/WGA20 (Konzentration: 3.08, 6.25 und 12.61 nmol/ml (bezogen auf fBSA, Berechnung: Abb.6) für 5min (5637) bzw. 30min (SV-HUC-1). Nach einem Waschschrift wurde die RFI der Zellen mit einem Epics XL-MCL Flowcytometer analysiert. Die Einstellung der Konjugatkonzentration, bezogen auf fHSA, erfolgte anhand einer Eichgerade (Abb. 6) mit reinem fBSA.

Anhand dieser Versuche konnte gezeigt werden, dass die Kopplung zu einem stabilen Produkt führt, das zur Zellbindung befähigt ist, also genügend freie WGA-Bindungsstellen aufweist. Zusätzlich konnte bestätigt werden, dass das fHSA/WGA-Konjugat etwas stärker an Tumorzellen bindet als an Zellen ohne malignen Hintergrund. Somit scheint die Entwicklung von Drug-Targeting-Konzepten mit Hilfe von WGA als Targeter prinzipiell möglich [4].

1.3.2. Aufreinigung des Konjugates

Bei der fluorimetrischen (ex/em: 485/525nm) Analyse der einzelnen Fraktionen aus der Gelchromatographie wurden zwei voneinander getrennte Peaks (*Abb.5*) festgestellt. Um die Annahme zu untermauern, dass der erste Peak das Kopplungsprodukt und der zweite ungebundenes fHSA darstellt, wurde unter denselben Bedingungen eine Vergleichschromatographie mit reinem fHSA durchgeführt. Überraschenderweise zeigte diese ebenfalls zwei Peaks. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass humanes Serumalbumin zur Polymerisierung neigt oder per se in zwei verschiedenen Größenklassen vorliegt [24]. Zur Klärung dieser Frage wurde dem Reaktionsgemisch vor der Aufreinigung Harnstoff (Konzentration: 6M) zugesetzt und die darauffolgende Elution ebenfalls in harnstoffhaltigem Puffer (20mM HEPES-Puffer pH 8.0 mit Harnstoff (2M)) durchgeführt, um eventuelle Dimere/Multimere zu dissoziieren. Aber auch nach Zugabe von Harnstoff blieben die Ergebnisse unverändert, was das Vorliegen zweier oder mehrerer unterschiedlich großer HSA-Fractionen im Ausgangsprodukt vermuten lässt.

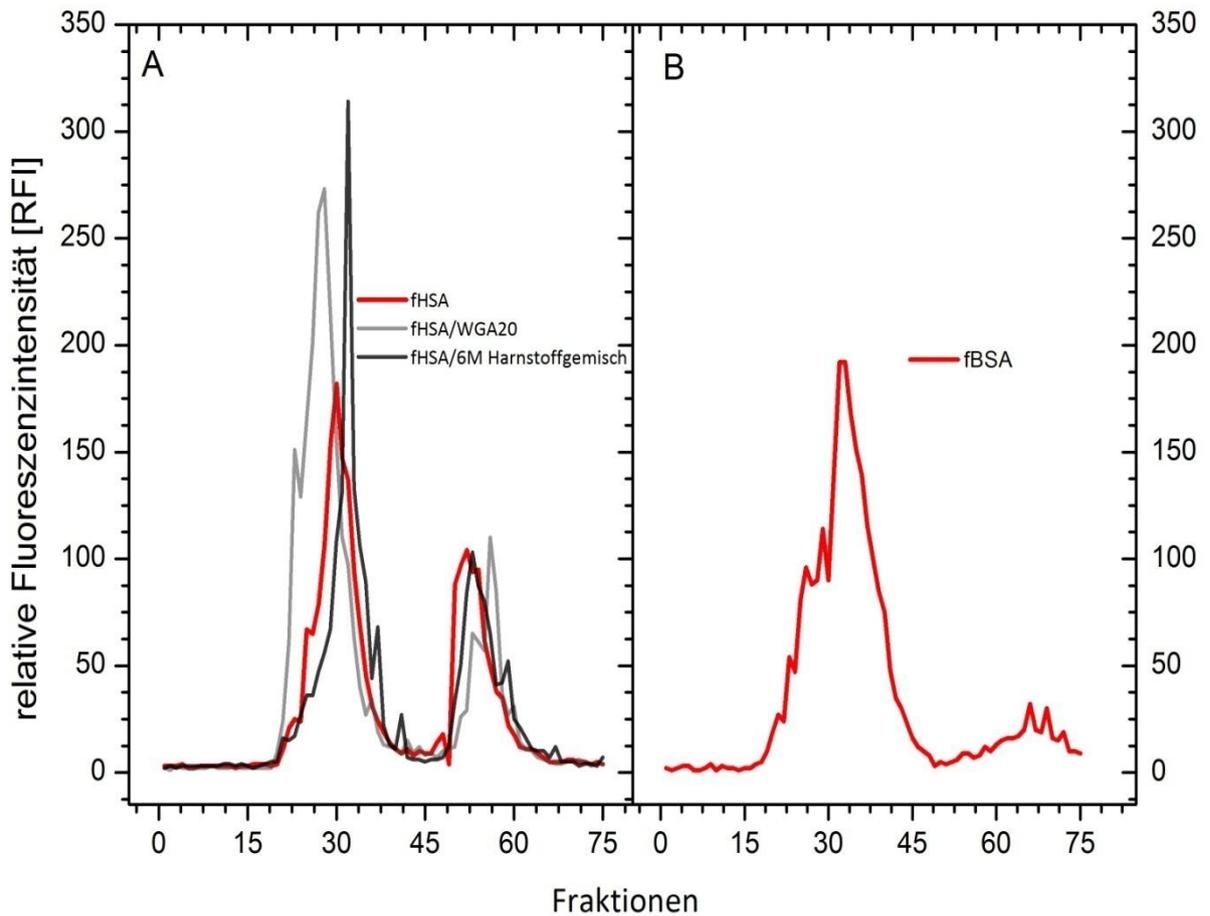


Abb. 5 Elutionsprofil (ex/em: 485/525nm) der einzelnen Fraktionen (ca. 350 μ l) nach der Aufreinigung mittels Gelchromatographie über Superdex-200® prep grad: Konjugat (fHSA/WGA20), reines fHSA bzw. fHSA versetzt mit Harnstoff (6M/2M) (A) sowie fBSA (B).

Um festzustellen, ob sich fBSA ähnlich verhält, wurde dieses im selben Systemchromatographisch aufgetrennt. Nach fluorimetrischer Analyse zeigte sich hier jedoch nur ein Hauptpeak (Abb. 5.).

fBSA scheint also in seiner Gesamtheit homogener zu sein, obwohl auch hier schon Polymerisierung nachgewiesen wurde [24].

Aufgrund des größtmäßig besser definierten Ausgangsproduktes wurde daher fBSA anstelle von fHSA als Kopplungspartner für WGA in der Konzeptstudie verwendet. Die Feinjustierung der Konjugataufreinigung erscheint mit dem homogeneren fBSA einfacher,

überdies bietet der Einsatz von kostengünstigerem fBSA einen ökonomischen Vorteil. Für den Fall, dass im zukünftig angedachten Endprodukt das bovine Serumalbumin nicht insgesamt durch einen Arzneistoff ersetzt wird, sondern als Linker zwischen Arzneistoff und Lektin erhalten bleiben soll, kann alternativ immer auf das humane Albumin zurückgegriffen werden. Dadurch sollten Überempfindlichkeitsreaktionen gegenüber dem körperfremden bovinen Protein ausgeschlossen werden können. Die obigen Versuche belegen, dass im Bedarfsfall ein einfacher Ersatz von fBSA durch fHSA ohne gravierende Auswirkungen auf die Kopplungsreaktion möglich ist.

2. Herstellung von fBSA/PNA-Konjugaten

2.1. Einleitung

PNA bindet, wie in früheren Untersuchungen an Zellkulturen gezeigt, wesentlich selektiver an bestimmte kanzerogen veränderte Harnblasenzellen als WGA [4]. Die Bindung an SV-HUC-1 Zellen, die dem gesunden Urothel entsprechen, scheint hingegen vernachlässigbar gering. Falls die Entwicklung eines PNA-basierenden Delivery-Systems gelänge, könnte diese Eigenschaft bei der Tumorthherapie der Harnblase von großer Bedeutung sein, da damit das maligne Gewebe wesentlich spezifischer behandelt und die Belastung des gesunden Gewebes reduziert werden könnte. Deshalb wurde im Rahmen dieser Diplomarbeit auch versucht, PNA über Divinylsulfon an fBSA zu koppeln.

2.2. Chemikalien und Methoden

2.2.1. Chemikalien

Peanut Agglutinin (PNA) von *Arachis hypogaea* wurde bei Vector laboratories (Burlingham, USA) erworben. β -Galaktose und fBSA stammte von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Alle anderen Chemikalien entsprachen jenen, die auch für die fHSA/WGA-Kopplung verwendet wurden (siehe Punkt 1.2.1.).

2.2.2. Zellkultur

HT1376

HT1376, eine Harnblasenkarzinom-Zelllinie (Grade 3) wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Germany), erworben. Die Zellen wurden in DMEM-Medium (versetzt mit 15% FCS, 2mM L-Glutamin und 5ml 10µg/ml Penicillin/Streptomycin-Lösung) in befeuchteter 5% CO₂/95% Luftatmosphäre bei 37°C kultiviert. Zum Passagieren der Zellen wurde 0.25% Trypsin/EDTA eingesetzt. Für die jeweiligen Versuche wurden Zellen der Passagen 4 bis 27 verwendet.

SV-HUC-1 Zellen (siehe Anhang B, unter Punkt 1.2.2.)

5637 (siehe Anhang B, unter Punkt 1.2.2.)

2.2.3. Herstellung von fBSA/PNA-Konjugaten

Bei der Herstellung der fBSA/PNA-Konjugate wurde analog zu jenem Kopplungsprotokoll verfahren, das auch für die fHSA/WGA-Kopplung Anwendung fand (siehe Anhang B, Punkt 1.2.3.). Die Unterschiede beliefen sich einzig darauf, dass entweder PNA (5- bzw.10-facher molarer Überschuss im Vergleich zu fBSA) gelöst in 20mM HEPES/NaOH-Puffer pH 8.0 alleine oder zusätzlich noch ein 5- bis 10-facher molarer Überschuss (bezogen auf PNA) an β-Galaktose dem aktivierten fBSA Reaktionsgemisch zugesetzt wurden [23, 25].

2.2.4. Zellbindungsstudien

Die generelle Durchführung der Versuche erfolgte analog zu Anhang B Punkt 1.2.4. Die Inkubationszeit für HT1376 Zellen betrug 20min bei 4°C.

2.3. Ergebnisse und Diskussion

2.3.1. Untersuchung der Zellbindung

Aus den Zellbindungsversuchen lässt sich ableiten, dass eine einfache fBSA/PNA-Kopplung nicht zu den erhofften Ergebnissen führt. Die Ergebnisse legen nahe, dass im Laufe des Kopplungsprozesses ein Großteil der Bindungsstellen des PNA-Moleküls, die für die Interaktion mit der Zelloberfläche verantwortlich sind, entweder besetzt oder sterisch blockiert werden. Aus diesem Grund wurde in weiterer Folge versucht, durch Zusatz von β -Galaktose, einem komplementären Zucker, eine nicht kovalent gebundene Schutzgruppe für die Bindungstasche einzuführen [25]. Durch die Verwendung des Zuckers als Schutzgruppe konnte die RFI der Zellbindung bei 5637-Zellen von 0.33 ± 0.06 auf 2.03 ± 0.15 und bei HT1376 von 0.4 ± 0.1 auf 1.27 ± 0.12 gesteigert werden. Die RFI-Werte der SV-HUC-1 Zelllinie übersteigen, wie erwartet, kaum die Eigenfluoreszenz der Zellen und unterstreichen somit die These, dass PNA vermehrt an entartete Blasenzelltypen bindet (*Tab.1.*).

| | SV-HUC-1 MW der RFI±STABW | 5637 MW der RFI±STABW | HT1376 MW der RFI±STABW |
|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| fBSA/PNA5 | 0.37±0.06 | 0.33±0.06 | - |
| fBSA/PNA5+5xβGal | 0.37±0.05 | 2.03±0.15 | 0.83±0.06 |
| fBSA/PNA5+10xβGal | - | 0.57±0.11 | 0.63±0.06 |
| fBSA/PNA10 | 0.23±0.06 | - | 0.40±0.10 |
| fBSA/PNA10+5xβGal | - | - | 1.27±0.12 |
| fBSA/PNA10+10xβGal | - | - | 0.73±0.15 |

Tab. 1: Bindung unterschiedlich hergestellter fBSA/PNA Konjugate an unterschiedliche Zelltypen (SV-HUC, 5637, HT1376): fBSA/PNA5 (\pm verschiedene Konzentrationen an β -Galaktose; Konzentration Konjugat: 12,16nmol/ml (bezogen auf fBSA, Berechnug: Abb.6)); fBSA/PNA10 (\pm verschiedene Konzentrationen an β -Galaktose; Konzentration Konjugat: 8,49nmol/ml (bezogen auf fBSA, Berechnug: Abb.6)) MW±STABW, n=3. 50 μ l Zellsuspension ($3.0 \cdot 10^5$ Zellen in PBS + Ca^{2+} und Mg^{2+}) inkubiert mit 50 μ l Konjugat \pm β -Gal. für 30 min (SV-HUC-1) 20min (HT1376) und 5min (5637). Ungebundenes Konjugat wurde mittels Zentrifugation entfernt und anschließend die RFI flowcytometrisch analysiert.

Zur Verbesserung der immer noch limitierten Zellbindung der fBSA/PNA-Konjugate wurde eine Steigerung der Schutzgruppen-Konzentration versucht. Mit 10-fachem molaren Zuckerüberschuss (im Vergleich zu PNA) waren die RFI-Werte der Konjugate jedoch unter jenen mit 5-fachem Zuckerüberschuss. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens ist, dass die β -Galaktose nach erfolgter Kopplungsreaktion nicht vollständig von den PNA-Bindungsstellen entfernt werden konnte und somit die Fähigkeit des Konjugates, an die Zelloberfläche zu binden, kompetitiv reduziert wurde. Die RFI-Werte der Zelloberflächenbindung von fBSA/PNA-Konjugaten sind verglichen mit jenen der fBSA/WGA-Konjugate insgesamt sehr gering, was eventuell auf eine mangelnde Kopplungseffizienz im Fall von PNA hindeuten könnte. Allerdings wäre bereits eine in engen Grenzen funktionierende PNA-Kopplung wegen der höheren Spezifität der

resultierenden Konjugate für maligne Zellen von potentiellm Nutzen und sollte daher in zukünftigen Studien weiterverfolgt werden.

3. Eichgerade fBSA

Eichgerade (fBSA) zur Berechnung der Konjugatkonzentrationen. Die Gerade war in dem Bereich von 0.005 bis 0.250mg/ml linear.

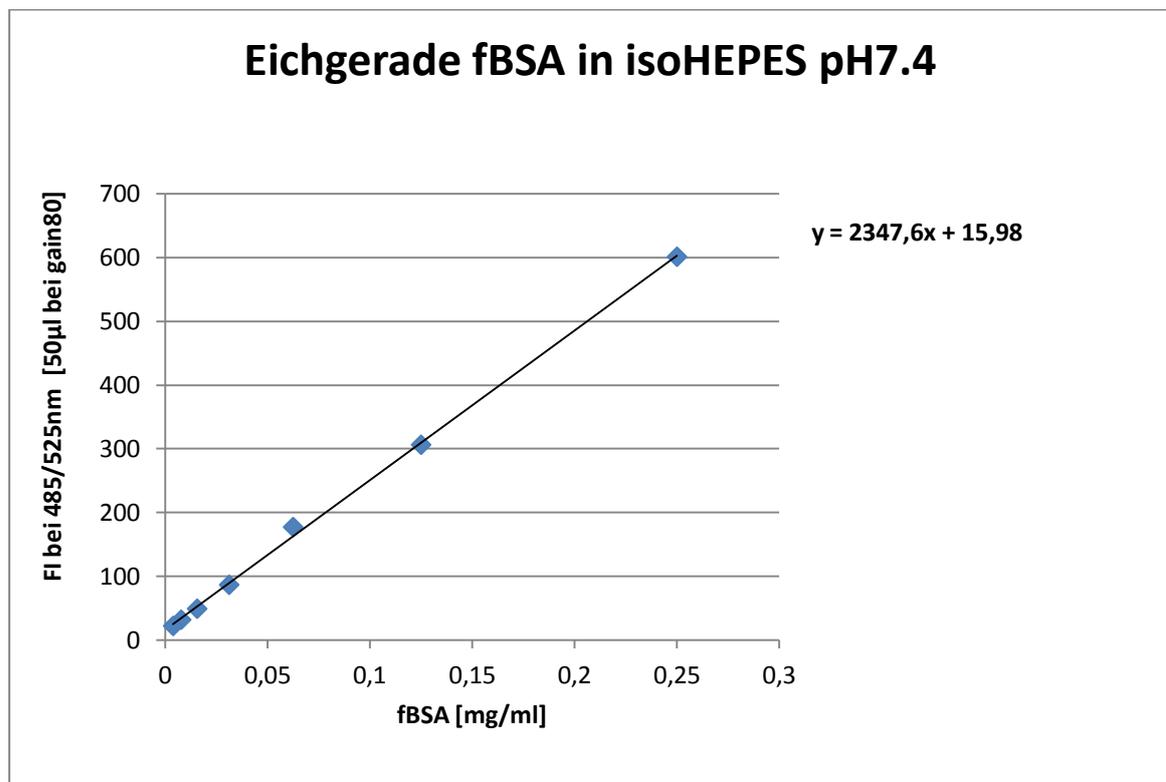


Abb. 6: Eichgerade für fBSA zur Konzentrationsberechnung der fBSA/WGA- und fHSA/WGA-Konjugate

5. Literaturverzeichnis

- 1: Jocham, Miller,
Praxis der Urologie, Band II.
Georg Thieme Verlag Stuttgart New York 2007; 3: 67-120.

- 2: Shen Z, Shen T, Wientjes MG et al,
Intravesical treatments of bladder cancer: review.
Pharmaceutical Research 2008; 25: 1500-1510.

- 3: Juan Pablo Burgués Gasión, Juan Fernando Jiménez Cruz,
Improving Efficacy of intravesical chemotherapy
European Urology 2006; 50: 225-234.

- 4: Neusch L, Plattner V E, Polster-Wildhofen S, et al,
Lectin Mediated Biorecognition as a Novel Strategy for Targeted Delivery to Bladder
Cancer
Journal of Urology, 2011, in print

- 5: Aumüller G, Aust G, Doll A, et al,
Anatomie. Duale Reihe
Georg Thieme Verlag Stuttgart 2007; 774-779

- 6: Benninghoff, Drenckhahn,
Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, Band 1,
Elsevier, München, Urban & Fischer Verlag, 2008; 17: 794-796

- 7: Rathert P, Roth S,
Urinzytologie, Praxis und Atlas:
Springer Medizin Verlag Heidelberg 2008;4: 16.

- 8: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/born-martin-ludovico-2002-09-23/HTML/born-ch1.html>
(Sa. 10.09.2011)

- 9: Khandelwal P, Abraham SN, Apodaca G,
Cell biology and physiology of the uroepithelium.
American Journal of Physiology and Renal Physiology. 2009; 297: F1477.
- 10: Xue-Ru Wu, Xiang-Peng Kong, Angel Pellicer, Gert Kreibich and Tung-Tien Sun,
Uroplakins in urothelial biology, function, and disease:
review. www.kidney-international.org2009; 1153-1165.
- 11: Robert Koch Institut,
Krebs in Deutschland, 2005/2006, Häufigkeiten und Trends,
Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der
epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.;
7. Ausgabe, 2010
- 12: Kälbe T,
Umweltfaktoren als wesentliche Ursache des Blasenkarzinoms und seiner Epidemiologie –
Ein historischer Überblick
(Hrsg) Lehmann, Retz, Stöckle,
BLASENKARZINOM,
Springer Medizin Verlag Heidelberg,2005: 17-26,
- 13: Kausch von Schmeling I.
Diagnostik und Therapie des nicht muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms - State of the
Art
Aktuelle Urologie 2010; 41: 307-315
- 14: <http://www.uro-ganzheitsmedizin.at/blasenkrebs.htm> (Sa. 10.09.2011)
- 15: Richard J. Sylvester,
Editorial Comment
European Urology 2006; 50: 233.

- 16:** Langguth P , Fricker G, Wunderli-Allenspach H,
Biopharmazie
WILEY-VCH Verlag, Weinheim, 2004; 9, 395-401.
- 17:** Müller-Esterl W,
Biochemie, Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler
Elsevier GmbH, München, Spektrum Akademischer Verlag, 2004; 343-344.
- 18:** Horn F,
Biochemie des Menschen; Das Lehrbuch für das Medizinstudium
Georg Thieme Verlag Stuttgart 2009; 3: 18-19.
- 19:** Lis H, Sharon N,
Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition.
Chemical Reviews 1998; 98: 637-674.
- 20:** <http://www.vectorlabs.com/catalog.aspx?prodID=334> (Sa. 10.09.2011)
- 21:** <http://www.vectorlabs.com/catalog.aspx?prodID=256> (Sa. 10.09.2011)
- 22:** Gabor F, Wirth M,
Lectin-mediated drug delivery: fundamentals and perspectives,
STP.Pharma Sciences 13 (2003): 3-16.
- 23:** Gabor F, Schwarzbauer A, Wirth M,
Lectin-mediated drug delivery: binding and uptake of BSA-WGA conjugates using the
Caco-2 model
International Journal of Pharmaceutics 237 (2002): 227-239.
- 24:** Szymanski W.W, Kaufman S.L, Linnemayr K, Allmaier G,
Comparison of molecular mass data of biomolecules obtained by GEMMA and MALDI-
TOF-MS
Journal of Aerosol Science, 1997; 28(1): 141-142(2)

25: Qui Cai, Zhi-Rong Zhang,
Lectin-mediated cytotoxicity and specificity of 5-fluorouracil conjugated with peanut
agglutinin (5-Fu-PNA) *in vitro*
Journal of Drug Targeting, 2005; 13(4): 251-257

Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Delivery-System entwickelt, das, basierend auf dem Konzept des aktiven Drug-Targetings, zur Verbesserung der adjuvanten Therapie des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms oder anderer intravesikal zugänglicher Erkrankungen beitragen soll. Das entwickelte Prodrug-System besteht aus fluoreszenzmarkiertem BSA (Bovines Serum Albumin), das über Divinylsulfon kovalent mit WGA (Wheat Germ Agglutinin) verknüpft wurde, welches als Targeting-Protein fungieren soll.

Das Hauptaugenmerk zunächst auf einer Optimierung der Kopplungs- und Reinigungsprozedur, wobei das Endprodukt zellkulturgestützt evaluiert wurde. Dabei erwies sich die Verwendung eines 20-fachen molaren Überschusses an WGA bezogen auf BSA als am geeignetsten. Um ein reines Produkt zu garantieren, wurden für die weitere Charakterisierung nach der Aufreinigung nur die ersten 10-12 Fraktionen des erhaltenen Peaks gepoolt. Unter den gewählten Bedingungen wurde so ein Konjugatgemisch mit durchschnittlichem Modifikationsgrad von 3-5 Molekülen WGA pro Molekül fBSA erhalten. Diese Parameter konnten dabei auch mit Hilfe alternativer Analyseverfahren (GEMMA, Acrylamid-Gelelektrophorese) bestätigt werden.

Anhand von Zellstudien wurde nachgewiesen, dass das Konjugat zur spezifischen Bindung an die Zelloberfläche befähigt ist und in weiterer Folge relativ rasch von den Zellen internalisiert wird. Das konnte auch durch Fluoreszenzmissionsmessung vor und nach Behandlung mit Monensin untermauert werden.

Um die Vermutung, dass WGA und somit auch das Kopplungsprodukt mit höherer Präferenz an maligne Zellen bindet, zu überprüfen, wurden konzentrationsabhängige Bindungsstudien neben SV-HUC-1 (Zellen ohne malignen Hintergrund) zusätzlich auch an

5637 (Tumorgrad 2) und HT1376 (Tumorgrad 3) durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das Konjugat im höheren Konzentrationsbereich tatsächlich eine verstärkte Tendenz zur Bindung an Zellen mit malignem Hintergrund aufweist (*Abb. 3*).

Außerdem wurden Konjugate mit PNA (Peanut Agglutinin) als Lektin entwickelt und deren Bindungsspezifität überprüft. Die RFI-Werte der Zelloberflächenbindung von fBSA/PNA-Konjugaten sind verglichen mit jenen der fBSA/WGA-Konjugate insgesamt sehr gering, was eventuell auf eine mangelnde Kopplungseffizienz im Fall von PNA hindeuten könnte.

Zusätzlich wurde fHSA (fluoreszenzmarkiertes humanes Serum Albumin) an WGA (Wheat Germ Agglutinin) gekoppelt. Allerdings erwies sich HSA als weniger homogen wie BSA. Die Feinjustierung der Konjugataufreinigung erschien deshalb mit dem homogeneren fBSA einfacher, überdies bietet der Einsatz von kostengünstigerem fBSA einen ökonomischen Vorteil

Die Ergebnisse der vorliegenden Diplomarbeit belegen, dass fBSA/WGA-Konjugate einen ersten Schritt in Richtung Verbesserung der adjuvanten Therapie des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms beruhend auf dem Konzept des aktiven Drug-Targetings darstellen könnten. Hinsichtlich der Spezifität der Bindung und deren Aufnahme in maligne Zellen sind weitere Untersuchungen in Arbeit.

Summary

The structural and compositional characteristics of the urothelial tissue account for a problematically low bioavailability in intravesical therapy, and call for the implementation of penetration-promoting delivery modalities to improve treatment impact. This study presents the first biorecognitive approach for intravesical drug delivery, based on the specific interaction between lectins and the corresponding carbohydrates at the cell membrane. Fluorescence-labeled bovine serum albumin (fBSA) or human serum albumin (fHSA) was covalently coupled to wheat germ agglutinin (WGA) to yield a model prodrug (fBSA/WGA conjugate) for the characterization of cytoadhesive and cytoinvasive potential in cell culture models. Coupling protocol and purification procedure were optimized and validated by a comparative screening in bioassays and physicochemical analysis of molecular weight. Preliminary studies demonstrated the general applicability of the coupling procedure to lectins of different carbohydrate specificity. Binding and uptake by human urothelial cells of non-malignant origin (SV-HUC-1) were compared to that by cells deriving from grade 2 (5637) or grade 3 (HT-1376) urothelial carcinoma. In contrast to unmodified fBSA, WGA-conjugates were effectively internalized (>50%) and processed to acidic compartments. Specificity of the conjugate-cell interaction was validated via competitive inhibition with the complementary carbohydrate. Intracellular accumulation was followed microscopically and verified by monensin-induced de-quenching. Utilizing receptor-mediated endocytotic pathways, glycotargeted delivery platforms may thus provide a potent tool for the establishing of novel therapy concepts for intravesical application.

6. Curriculum vitae

Britta Eggenreich

*03. September 1986 in Hallein

Gschwandnerg. 34/16, 1170 Wien

Tel.: 0650/6412601

Email: britta_eggenreich@hotmail.com

Eltern

Wolfgang Eggenreich (MSD), Andrea Eggenreich

Geschwister

Stefan Eggenreich (Dipl.-Ing.)

Familienstand

ledig

Schule

1992 - 1996

Volksschule am Dom, St. Johann im Pongau

1996 - 2004

Bundesrealgymnasium, St. Johann im Pongau

Studium

Ab 2004

Pharmazie Studium an der Universität Wien

04/2010 - 02/2011

Diplomarbeit am Department Pharmaceutical
Technology and Biopharmaceutics

Sonstige Tätigkeiten

| | |
|--------------------------|---|
| 06/2004 | Praktikum in der Anna Apotheke, St. Johann im Pongau |
| 07/2005 | Ferialpraktikum, E-CC Call Center GmbH |
| 01/2006 - 01/2010 | Museumsaufsicht, Bank Austria Kunstforum, geringfügig |
| 07/2006 + 08/2007 | je ein zwei wöchiges, freiwilliges Praktikum in der Anstaltsapotheke des Kardinal Schwarzenberg'schen Krankenhauses |
| 08/2008 + 07/2009 | Praktikum in der Adler Apotheke, 1080 Wien |
| 03/2010 - 06/2011 | Tutorin am Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Universität Wien |