



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Therapie von Harnwegsinfekten: Adhäsionsstudien von
Lektin-funktionalisierten Trimethoprim-PLGA-Nanopartikeln
an artifiziellem humanem Urothel“

verfasst von / submitted by

Johanna Christina Semmler

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2021/ Vienna, 2021

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

a.o. Univ.- Prof. Mag. Dr. Franz Gabor

Danksagung und Widmung

Mein Dank gilt a.o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor und a.o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth für die Möglichkeit, meine Diplomarbeit in ihrer Arbeitsgruppe schreiben zu dürfen und für das Vertrauen, das sie in mich gesetzt haben. Es war eine äußerst lehrreiche und gewinnbringende Zeit für mich und ich habe viel von ihrem Wissen und konstruktiven Kritik profitiert.

Besonderer Dank gebührt auch Mag. Dr. Bernhard Brauner, der mich stets fachlich kompetent betreute und der immer motivierende Worte für mich übrig hatte, wenn ich mal ins Zweifeln geriet. Danke für dein offenes Ohr, deine Unterstützung und deine fachkundige Beratung hinsichtlich der Speisekarten jeglicher in der Nähe befindlicher Restaurants.

Ein herzliches Dankeschön auch an alle DissertantInnen und DiplomandInnen und das gesamte restliche Team des Departments für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, die ich kennen lernen durfte! Es war mir jeden Tag eine große Freude, bei euch zu sein und die vielen gemeinsamen Mittagessen und lustigen Abende werden mir lange in Erinnerung bleiben. Ein so tolles, aber trotzdem produktives Arbeitsklima (frei nach dem Motto „Ora et Gabora“), bei dem Zusammenhalt und Hilfsbereitschaft großgeschrieben werden, ist etwas ganz Besonderes.

Insbesondere auch ein großes Dankeschön an Mag. Patricia Haiss und Mag. Patrik Schwarz für ihre Unterstützung!

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meinen Geschwistern Katharina und Christian bedanken! Sie haben mich auf meinem gesamten Lebensweg begleitet und waren immer für mich da. Danke für alles!

Wien 2021

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
2. Problemstellung und Zielsetzung.....	9
3. Ergebnisse	11
3.1. Optimierung der Herstellung von WGA-Trimethoprim-Nanopartikeln	11
3.1.1. Optimierung der Herstellung von TMP-Nanopartikeln.....	11
3.1.2. Einfluss der Lagerung auf Partikelgröße	15
3.1.3. Studie zur Freisetzung von BodiPy aus den PLGA-Nanopartikeln.....	18
3.1.4. Bestimmung des Zeta-Potenzials und Einfluss der WGA-Belegungsdichte an der Partikeloberfläche.....	21
3.2. Bindungsstudien am SV-HUC-Modell	22
3.2.1. Charakterisierung von Trimethoprim-PLGA-Nanopartikeln	22
3.2.2. Bindungsstudie bei pH 5.....	23
3.2.3. Bindungsstudie bei pH 7.....	26
3.2.4. Bindungsstudie bei pH 7 mit Vorinkubation bei pH 5.....	28
4. Zusammenfassung	30
5. Abstract.....	32
6. Anhang	33
6.1. Verwendete Chemikalien	33
6.2. Verwendete Geräte	34
6.3. Herstellung von Trimethoprim-beladenen, BodiPy-markierten PLGA-Nanopartikeln	36
6.4. Charakterisierung der Nanopartikel	38
6.4.1. Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers und der Größenverteilung	38
6.4.2. Bestimmung des Zeta-Potentials	38
6.4.3. Quantifizierung des Trimethoprimgehalts durch HPLC	38
6.5. Modifikation der Nanopartikeloberfläche mit WGA.....	41
6.5.1. Immobilisierung von WGA an der PLGA-Nanopartikel-Oberfläche.....	41
6.5.2. BCA-Assay zur Quantifizierung von WGA.....	42
6.6. Zellkultur.....	44
6.6.1. Chemikalien und Medien	44
6.6.2. Mediumswechsel.....	44

6.6.3.	Subkultivierung von SV-HUC-Zellen	45
6.6.4.	Kultivierung von SV-HUC in 96-Well-Mikrotiterplatten	45
6.7.	Bindungsstudien am Zellmodell	45
5.8.	Herstellung von Kunsturin	46
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	48
8.	Abbildungsverzeichnis	50
9.	Literaturverzeichnis	52

1. Einleitung

Eine der verbreitetsten bakteriellen Infektionskrankheiten ist der Harnwegsinfekt. Jährlich sind weltweit rund 150 Millionen Menschen davon betroffen [1]. Vor allem Frauen sind aufgrund anatomischer Gegebenheiten wie der kürzeren Urethra besonders anfällig [2]. 84% der US-amerikanischen Patienten, die unter Harnwegsinfekten leiden, sind weiblich und die Hälfte aller Frauen erkranken zumindest einmal in ihrem Leben an einem Harnwegsinfekt [3]. Neben dem weiblichen Geschlecht zählen unter anderem auch sexuelle Aktivität, vaginale Infektionen, Diabetes oder eine genetische Disposition zu den Risikofaktoren [4, 5].

Harnwegsinfektionen können nach anatomischen Gesichtspunkten unterschieden werden. Liegt eine Infektion des oberen Harntrakts vor, spricht man von einer Pyelonephritis. Bei unteren Infekten wird je nach betroffenen Organen zwischen einer Urethritis und einer Zystitis unterschieden [6]. Außerdem ist im klinischen Alltag eine Differenzierung zwischen einer unkomplizierten Harnwegsinfektion, die bei ansonsten gesunden Personen vorliegt, und einer komplizierten Harnwegsinfektion sinnvoll. Letztere zeichnet sich durch Vorliegen von prädisponierenden Risikofaktoren aus, wie zum Beispiel Vorerkrankungen der Harnwege, einer Schwangerschaft oder Diabetes mellitus [7, 8].

Eine Harnwegsinfektion kann mit Symptomen wie allgemeinem Unwohlsein, Dysurie, Hämaturie oder Fieber einhergehen [1]. Schwere Verläufe können auch weitreichendere Folgen wie Nierenschäden oder Sepsis nach sich ziehen [3].

Harnwegsinfektionen können sowohl von grampositiven als auch von gramnegativen Bakterien verursacht werden. Der mit Abstand häufigste Erreger ist das uropathogene *Escherichia coli* (UPEC), der bei unkomplizierten Harnwegsinfekten für 75% der Fälle und bei komplizierten Harnwegsinfekten für 65% der Fälle verantwortlich ist [5].

Die Infektion der Harnwege erfolgt häufig endogen durch eine Übertragung der Keime aus dem Gastrointestinaltrakt [9].

Die Expression diverser Virulenzfaktoren ermöglicht es den E-coli Bakterien die ansonsten sterilen Harnwege zu kolonialisieren [10]. UPEC bindet über sein D-Mannose-bindendes Adhäsin FimH an Typ 1 Pili der Uroplakine und $\alpha_1\beta_3$ Integrine des Blasenepithels. Das ist der erste Schritt zur bakteriellen Invasion in die oberste Zellschicht, bestehend aus den sogenannten „umbrella cells“. Nach der Internalisierung kann es zu einer Ruhephase oder zur Bildung von biofilmähnlichen intrazellulären Mikrokolonien kommen [5]. Durch diese Mechanismen schützt sich das Bakterium vor den Abwehrmechanismen des Körpers und vor der Ausspülung durch den Harn, sodass es für eine Antibiotikatherapie schwerer zugänglich ist [11]. Diese persistierenden Erreger können dann immer wieder Rezidive verursachen [12].

Bei der Behandlung von unkomplizierten Harnwegsinfekten zählen Antibiotika wie Fosfomycin-Trometamol, Nitrofurantoin, Pivmecillinam oder Fluorchinolone zur First-Line-Therapie. Auch Trimethoprim bzw. Trimethoprim-Sulfamethoxazol wird häufig zur Eradikation von E-coli und anderen uropathogenen Keimen eingesetzt [13, 14].

Trimethoprim hemmt mit hoher Selektivität die bakterielle Dihydrofolat-Reduktase und dadurch die Entstehung der für die Übertragung von C₁-Einheiten notwendigen Tetrahydrofolsäure. Dies hat Auswirkungen auf die DNA-Biosynthese. Das Molekül weist neben einer hydrophoben, dreifach methoxylierten aromatischen Teilstruktur eine zyklische Guanidin-Struktur im 2,4-Diaminopyrimidin-Teil auf. Da Trimethoprim einen pK_s-Wert von 7,12 besitzt, liegt es bei biologisch relevanten pH-Werten zu ca. 50% als amphiphiles Kation vor [15].

Während unkomplizierte Harnwegsinfekte mit einer oralen Gabe von Antibiotika gut therapierbar sind, stößt diese Behandlungsmethode vor allem bei rezidivierenden Erkrankungen an ihre Grenzen. Als relativ sichere und effektive Alternative zur Prophylaxe und Therapie von rezidivierenden Harnwegsinfekten kann eine intravesikale Applikation mittels Katheter in Betracht gezogen werden [16]. Durch die direkte Instillation können im Vergleich zur peroralen Therapie höhere lokale Konzentrationen bei gleichzeitig niedrigeren Dosen erzielt werden und somit auch systemische Nebenwirkungen verringert werden [17]. Allerdings bringt die Katheterisierung auch einige Nachteile mit sich. Neben konstanten Verdünnungsvorgängen und dem Auswaschen der Arzneistoffe durch die kontinuierliche Entleerung der Blase stellt auch die Undurchlässigkeit des Urothels für Wirkstoffe ein Problem dar [17].

Durch Drug Targeting kann eine gezielte und selektive Anreicherung der Antibiotika an das Urothel, dem Wirkort, erreicht werden [18]. Somit kann durch galenische Ansätze eine Optimierung der Therapie angestrebt werden.

Der Wirkstoff wird dazu in pharmakologisch inerte Trägermaterialien in Form von Nanopartikeln eingebettet. Durch Oberflächenmodifikation der Partikel können diese zur Adhäsion an das Blasenepithel befähigt werden [19–21].

2. Problemstellung und Zielsetzung

Die Relevanz, bestehende Therapieansätze zu verbessern und neue Behandlungsmethoden zu finden, zeigt sich deutlich in statistischen Erhebungen. 20-30% aller Frauen erleiden nach einer initialen Infektion innerhalb eines halben Jahres ein Rezidiv. Einige davon erleben im Folgejahr sechs oder mehr rezidivierende Infekte [22].

Hinzu kommen die steigenden Antibiotika-Resistenzraten der Erreger von Harnwegsinfekten wie *Escherichia coli* [23]. Diese unterliegen sowohl zeitlichen als auch regionalen Schwankungen und sind für unkomplizierte Harnwegsinfekte oft nicht exakt untersucht, da zu deren Behandlung eine routinemäßige Durchführung einer Urinkultur nicht empfohlen wird [24]. Laut der Resistenzstatistik 2019 des Robert-Koch-Instituts zeigt *E. coli* im ambulanten Versorgungsbereich bereits viele Resistenzen, beispielsweise weist der Erreger gegenüber Cefuroxim eine Resistenzrate von 11,9% auf, gegenüber Ampicillin 41,3% und gegenüber Trimethoprim 23,3% [25]. Laut einer 2013 durchgeführten Studie von Allocati et. al. sind bereits 2,6% der *E-coli* Stämme in Österreich multiresistent [23]. Aufgrund der Häufigkeit von Harnwegsinfektionen stellen die für diese Indikationsstellung verschriebenen Antibiotika einen wesentlichen Anteil des Gesamtantibiotikaabsatzes dar [8]. Da aber, trotz bisher guter Behandlungserfolge, besonders auf lange Sicht durch Resistenzentwicklungen die Effektivität dieser etablierten Medikationsform abnimmt, ist die Erforschung alternativer therapeutischer Ansätze erforderlich.

Das Verstehen der Mechanismen der Adhäsion von UPEC eröffnet neue technologische, biomimetische Therapiemöglichkeiten. Die Entwicklung neuer Arzneistoffträger wie oberflächenmodifizierter Nanopartikel, die sich, ähnlich dem bakteriellen Adäsion FimH, durch biorekognitive Interaktion an die Zellmembran heften können, kann die instillative Therapie von Harnwegsinfekten verbessern [17]. Die Adhäsion der wirkstoffbeladenen Nanopartikel am Blasenepithel könnte die Effektivität von Antibiotika steigern, indem die Verweildauer in der Blase erhöht und die Diffusionswege verringert werden [20]. Dadurch können die Dauer und die Häufigkeit einer Katheterisierung gesenkt werden [26]. Ein weiterer positiver Aspekt der räumlichen Nähe des Antibiotikums zum Urothel durch Adhäsion und infolgedessen auch einer gesteigerten Internalisierung könnte die Prävention von Rezidiven durch die verbesserte Resorption und die effektivere Bekämpfung intrazellulärer Mikrokolonien sein [26]. Die Eradikation von im Urothel eingenisteten Erregern ist durch eine herkömmliche Antibiotikatherapie oft nicht möglich [10].

Studien von Neutsch et al. zeigen, dass zu diesem Zweck die Oberfläche von Partikeln mit pflanzlichen Lektinen funktionalisiert werden kann. Die höchste Bindungsaffinität wies dabei das Weizenkeimlektin (wheat germ agglutinin, WGA) aus *Triticum vulgare* auf [19–21]. WGA bindet spezifisch an bestimmte Zuckerkomponenten an der Oberfläche von Urothelzellen, Sialinsäure und N-acetyl-D-glucosamin, wodurch eine Anlagerung an die Oberfläche von Zellmembranen möglich ist [27].

Neben des gezielten Drug-Targetings durch die Möglichkeit der Oberflächenfunktionalisierung mit WGA bietet der Einbau des Wirkstoffs in Nanopartikel weitere Vorteile. Dazu zählen die gesteigerte Löslichkeit [28], als auch eine kontrollierte Dosisfreisetzung, wodurch sowohl die Wirksamkeit als auch die Verträglichkeit gesteigert werden können. Auch die Dissolutionsraten einer Vielzahl von Arzneistoffen können durch nanopartikuläre Systeme verbessert werden, wodurch eine höhere Bioverfügbarkeit erzielt werden kann [29, 30].

Als Trägermaterial zur Herstellung von Nanopartikeln eignet sich ein Polymer aus Milch- und Glykolsäure, Poly(lactid-co-glycolid (PLGA), das sich durch gute Biokompatibilität, biologische Abbaubarkeit und mechanische Festigkeit auszeichnet. Im Sinne einer kontrollierten Wirkstofffreisetzung ist auch die durch das molare Verhältnis von Milch- zu Glykolsäure justierbare Erosionsdauer von Bedeutung. Hinzu kommt die Möglichkeit, verschiedenste Stoffe in die Partikelmatrix einbauen zu können [31, 32]. Eine Funktionalisierung mit WGA ist durch die zahlreichen freien Carboxylgruppen an der Partikeloberfläche möglich [33].

In der vorliegenden Arbeit werden Methoden zur Herstellung und Lagerung von Trimethoprim-beladenen, WGA-funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln zur intravesikalen Instillation bei Harnwegsinfekten optimiert. Weiters wird die Freisetzung des in die Nanopartikel eingebauten Farbstoffs, BodiPy, beleuchtet sowie der Einfluss der Menge des immobilisierten Lektins auf das Zeta-Potential untersucht. Zudem werden Bindungsstudien der smarten Nanopartikel an menschlichen Blasenepithelzellen vorgestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Optimierung der Herstellung von WGA-Trimethoprim-Nanopartikeln

3.1.1. Optimierung der Herstellung von TMP-Nanopartikeln

Um die Vorteile von nanopartikulären Systemen wie verbesserte Bioverfügbarkeit [29] und Löslichkeit [28] optimal ausnutzen zu können, muss gewährleistet werden, dass es im und nach dem Herstellungsprozess zu keiner Zusammenlagerung von Partikeln zu Agglomeraten kommt, wodurch die Durchschnittsgröße um ein Vielfaches ansteigen könnte.

Insbesondere bei der Reinigung der Partikel, die meist durch Zentrifugation erfolgt, kommt es durch die Vervielfachung der mittleren Erdbeschleunigung zu Zusammenlagerungen der Nanopartikel. Um das Herstellungsprotokoll so zu modifizieren, dass sowohl eine ausreichende Trennung von festen und flüssigen Bestandteilen der Suspension als auch eine ausreichende Stabilität der Partikel gewährleistet werden kann, wurde eine Charge einem Belastungstest unterzogen.

Dazu wurden Aliquote von 5 mg kurz nach der Herstellung unter Kühlung auf 4°C bei unterschiedlichen Bedingungen zentrifugiert. Dabei ist sowohl die Umdrehungszahl als auch die Dauer der Zentrifugation von Bedeutung.

Zur Beurteilung der Ergebnisse wurden sowohl die Partikelgröße als auch der Polydispersitätsindex (PDI) herangezogen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der bei der Modifikation des Herstellungsprotokolls beachtet werden muss, ist die Resuspendierbarkeit der Dispersion. Da für die nachfolgenden Experimente entweder eine Suspension der Nanopartikel in destilliertem Wasser oder in HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 mit 0,1 % (w/v) Pluronic (HEPES/PLU) verwendet wurde, wurde im Anschluss die Fähigkeit der Partikel untersucht, sich in 5 ml des jeweiligen Lösungsmittels zu verteilen. Um die Reinigung effizient zu gestalten, ist es außerdem wichtig, dass sich die Feststoffe möglichst vollständig von der flüssigen Phase trennen, sodass der Verlust an Partikeln in den einzelnen Waschschrritten geringgehalten werden kann. Dies ist insbesondere auch für Experimente wichtig, bei denen die Konzentration der Partikelsuspension von Bedeutung ist.

Im ersten Schritt wurde ein Teil der Partikel bei einer geringen Belastung von 5220 x g 10 Minuten unter Kühlung auf 4°C zentrifugiert (siehe Abbildung 1).

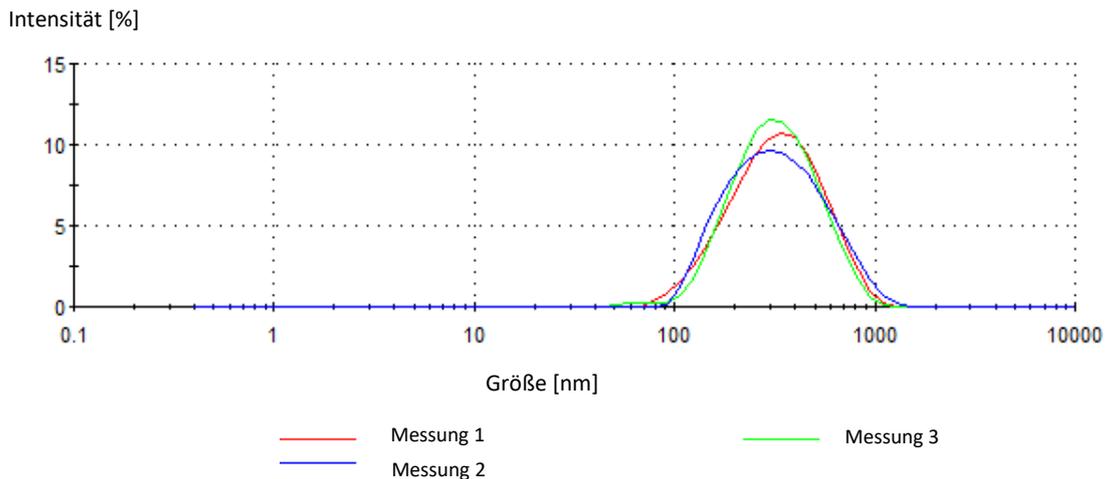


Abbildung 1: Größenverteilung der PLGA-Nanopartikel nach 10-minütiger Zentrifugation bei 5220 x g und 4°C.

Eine Aggregation konnte hier nur in sehr geringem Ausmaß festgestellt werden. Der Partikeldurchmesser des Überstandes lag bei 281,3 nm bei einem PDI von 0,186 (siehe Tabelle 1). Das entstandene Pellet konnte sowohl in Aqua dest. als auch in HEPES/PLU sehr leicht resuspendiert werden, was auch den Vorteil einer Zeitersparnis mit sich bringt. Allerdings befand sich ein Großteil der Partikel noch im Überstand, was vor allem bei mehrfacher Wiederholung von Waschschrinen zu großen Verlusten führen würde.

Tabelle 1: Durchschnittliche Durchmesser und PDI von Partikeln im Überstand nach Zentrifugation mit verschiedenen Einstellungen.

Zentrifugationsprotokoll	Durchmesser (nm)	PDI
10 Min., 5220 x g, 4°C	281,3 ± 2,1	0,186 ± 0,01
10 Min., 23446 x g, 4°C	209,6 ± 1,8	0,210 ± 0,01
30 Min., 38759 x g, 4°C	187,5 ± 2,3	0,236 ± 0,01
15 Min., 23000 x g, 4°C	233,4 ± 1,7	0,192 ± 0,01

Bei der Zentrifugation bei einer höheren Umdrehungszahl von 23446 x g, ebenfalls 10 Minuten und unter Kühlung auf 4°C (siehe Abbildung 2), konnte eine durchschnittliche Partikelgröße von 209,6 nm mit einem PDI von 0,210 festgestellt werden. Durch Behandlung am Ultraschallbad für wenige Sekunden konnte auch hier das Pellet vollständig resuspendiert werden. Das verbliebene Pellet war nach der Behandlung bei diesen Einstellungen deutlich kleiner. In Abbildung 2 kann man die Bildung von Agglomeraten im µm-Bereich an der Bildung einer zweiten Population erkennen.

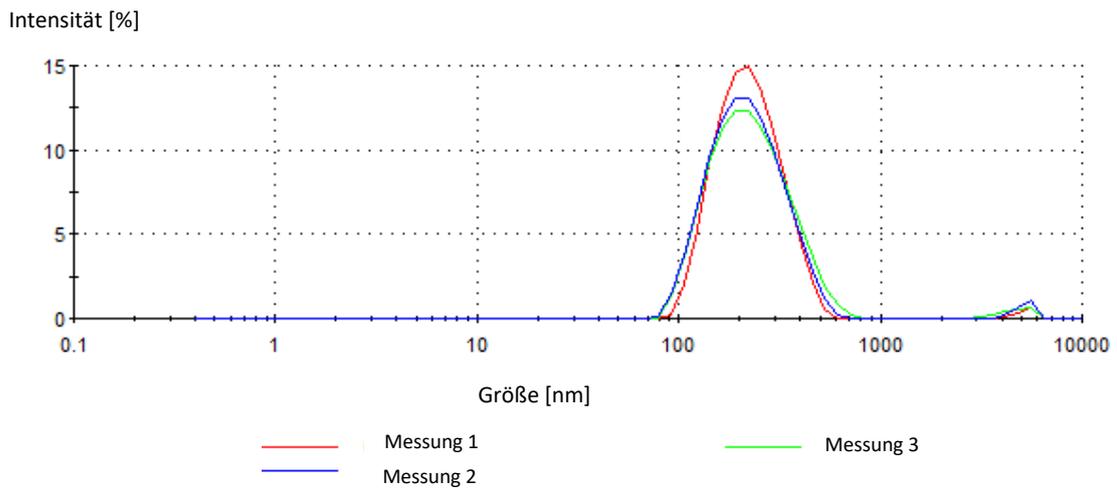


Abbildung 2: Größenverteilung der PLGA-Nanopartikel nach 10-minütiger Zentrifugation bei 23446 x g und 4°C.

Als höchste Stufe der Belastung wurde eine halbe Stunde lang bei 38759 x g bei 4°C zentrifugiert (siehe Abbildung 3). Der Durchmesser der Partikel im Überstand lag hier im Durchschnitt bei 187,5 nm und der PDI stieg auf 0,236 (siehe Tabelle 1). Das Pellet war wie auch im vorherigen Schritt sehr klein und in HEPES/PLU und destilliertem Wasser resuspendierbar, allerdings vor allem in Letzterem nur langsam im Ultraschallbad. Zusätzlich würde dieses Zentrifugationsprotokoll vor allem bei mehreren aufeinander folgenden Waschschritten einen großen zeitlichen Aufwand bedeuten.

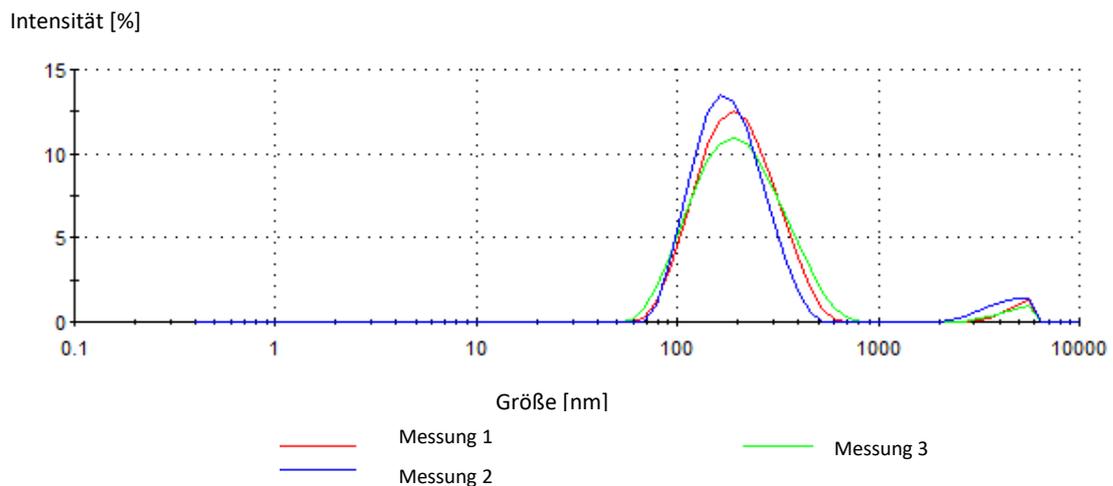


Abbildung 3: Größenverteilung der PLGA-Nanopartikel nach halbstündiger Zentrifugation bei 38759 x g und 4°C.

Als geeigneten Kompromiss zwischen größtmöglicher Ausbeute bei möglichst geringer Belastung für die Partikel und gleichzeitig guter Resuspendierbarkeit ergibt sich die Zentrifugation bei 23000 x g für 15 Minuten unter Kühlung auf 4°C. Diese Einstellungen wurden an einem weiteren Aliquot überprüft und lieferten Partikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 233,4 nm und einem PDI von 0,192 (siehe Tabelle 1). Die Ergebnisse, die in Abbildung 4 dargestellt sind, zeigen, dass sich diese Einstellungen für die folgenden Versuche eignen, da die Größenverteilung der Nanopartikel annäherungsweise einer Gauß'schen Normalverteilung entspricht und keine messbaren Partikelagglomerate im höheren µm-Bereich nachweisbar sind.

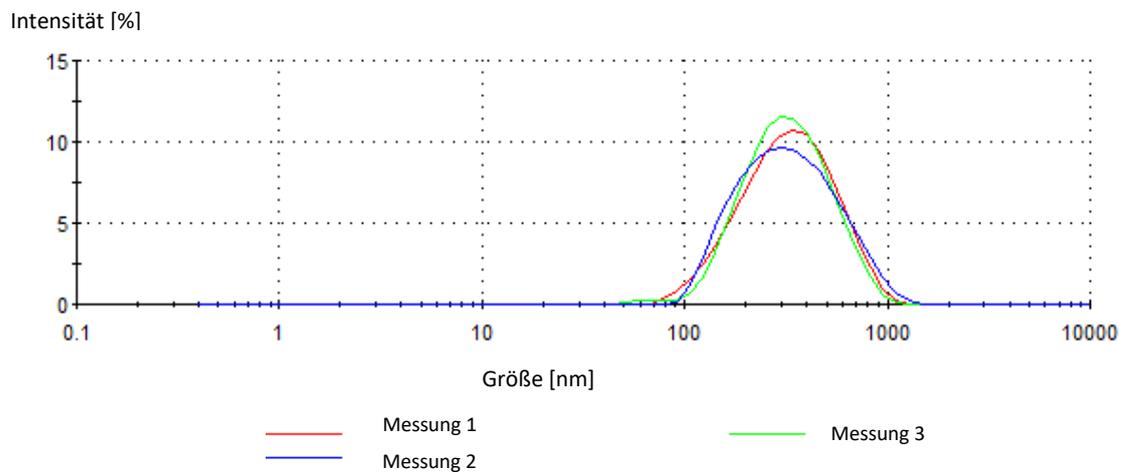


Abbildung 4: Größenverteilung der PLGA-Nanopartikel nach 15-minütiger Zentrifugation bei 23000 x g und 4°C.

3.1.2. Einfluss der Lagerung auf Partikelgröße

3.1.2.1. Lyophilisation

Die Lagerung der Nanopartikel in Suspension war nur über einen kurzen Zeitraum möglich, da es nach einigen Tagen zur Bildung von Agglomeraten kam und aufgrund fehlender Studien die Stabilität der Partikel nicht gewährleistet werden kann. Um die Qualität der hergestellten Partikel über einen längeren Zeitraum garantieren zu können, mussten diese lyophilisiert werden. Durch die Gefriertrocknung kam es allerdings zu ausgeprägten Agglomeratbildungen (siehe Abbildung 5) und damit zu einem Anstieg der durchschnittlichen Partikelgröße.

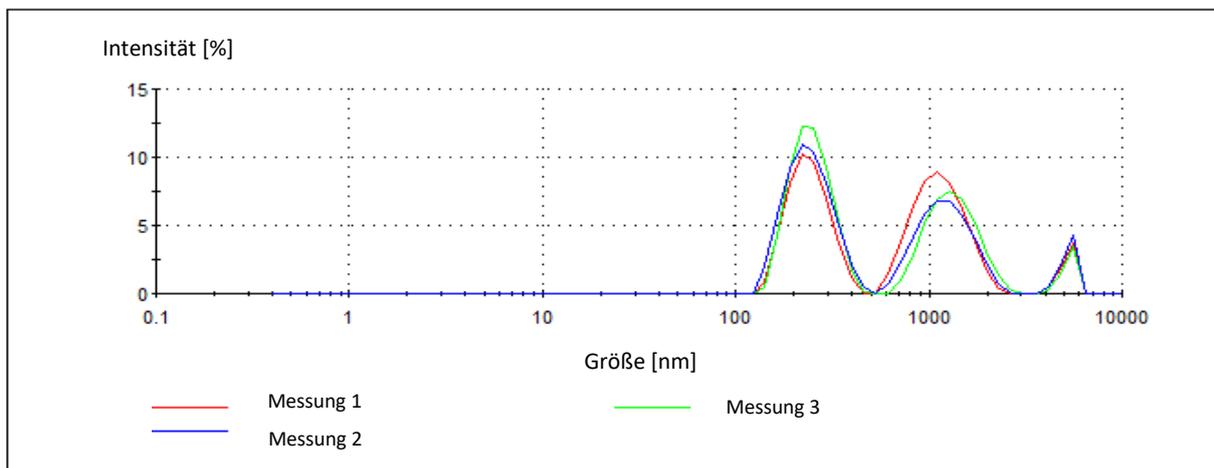


Abbildung 5: Größenverteilung der Nanopartikel nach Lyophilisation und Resuspendieren in Aqua dest.

Um diesem Effekt entgegenzuwirken, wurden dem destilliertem Wasser 2% Saccharose und 0,1% Pluronic zugesetzt. Zucker als Polyole besitzen kryoprotektive Eigenschaften, wodurch die Redispergierbarkeit der Nanopartikel erhöht werden konnte [34]. Der Zusatz von Pluronic dient zusätzlich der Herabsetzung der Grenzflächenspannung. Wie in Abbildung 6 erkennbar ist, konnte die Größenverteilung der PLGA-Nanopartikel dadurch vereinheitlicht und die Bildung von Agglomeraten reduziert werden.

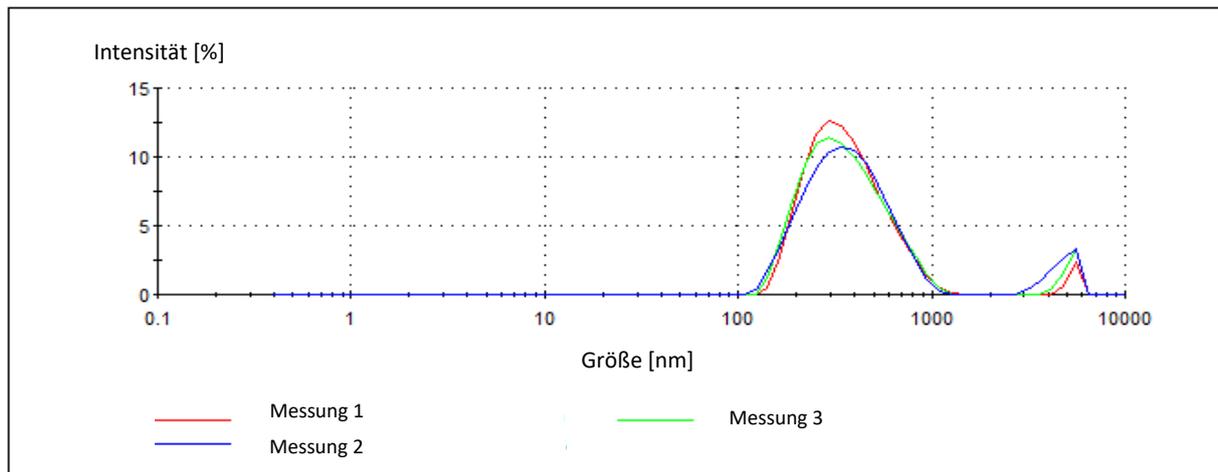


Abbildung 6: Größenverteilung der Nanopartikel nach Lyophilisation mit Kryoprotector-Zusatz

3.1.2.2. Abtrennung von agglomerierten Nanopartikeln

Bei der Lagerung der Nanopartikel als Suspension unter Kühlung kam es nach nur wenigen Tagen zu Agglomeratbildung (siehe Abbildung 7). Obwohl der Partikeldurchmesser 270,3 nm bei einem PDI von 0,209 betrug, ist im Histogramm deutlich eine zweite Partikelpopulation im Mikrometerbereich erkennbar.

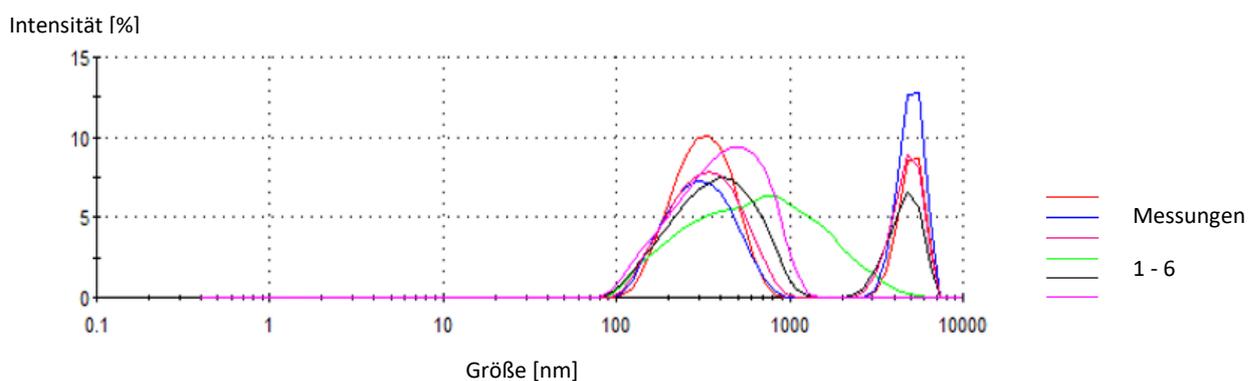


Abbildung 7: Größenverteilung der Nanopartikel nach Lagerung in Suspension.

Da sowohl für die pharmazeutische Anwendung als auch für die Durchführung der nachfolgenden Analysen eine möglichst homogene Partikelpopulationen mit reproduzierbaren Durchmesser essentiell sind, wurde im Rahmen dieser Diplomarbeit nach Möglichkeiten gesucht, die größeren Feststoff-Anteile abzutrennen.

Dazu wurde die Partikelgrößenverteilung und der PDI einer fünf Tage im Kühlschrank in HEPES/PLU gelagerten Partikelsuspension im Zetasizer bestimmt. Im Anschluss wurde ein Teil der Suspension bei 5220 x g eine Minute zentrifugiert, um die Belastung möglichst gering zu halten, und danach analysiert (siehe Abbildung 8). Der durchschnittliche Partikeldurchmesser betrug 266,8 nm bei einem PDI von 0,210.

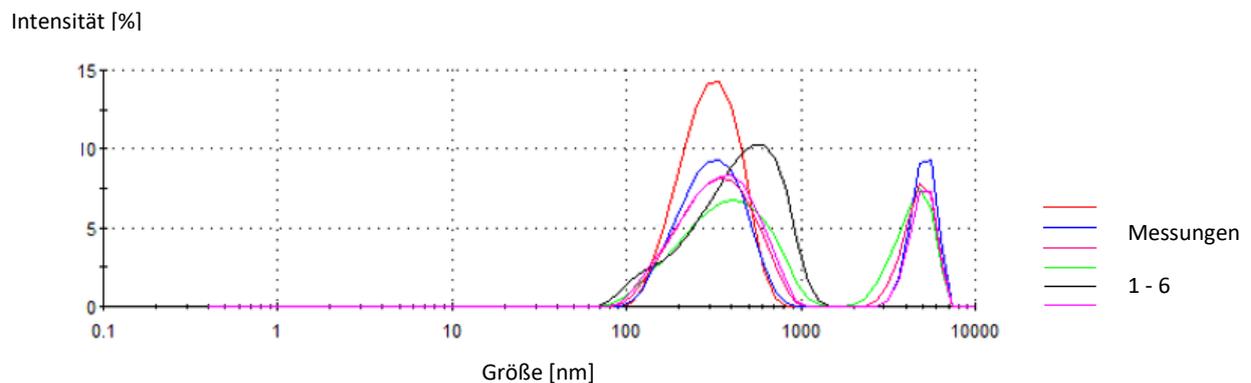


Abbildung 8: Größenverteilung der Nanopartikel nach Zentrifugation (5520 x g, 1 Minute).

Ein weiteres Aliquot wurde durch einen Filter mit einer Porenweite von 1 μm filtriert. Die Größenverteilung nach der Filtration ist in Abbildung 9 ersichtlich, wobei ein durchschnittlicher Partikeldurchmesser 253,8 nm und ein PDI von 0,174 gemessen wurde.

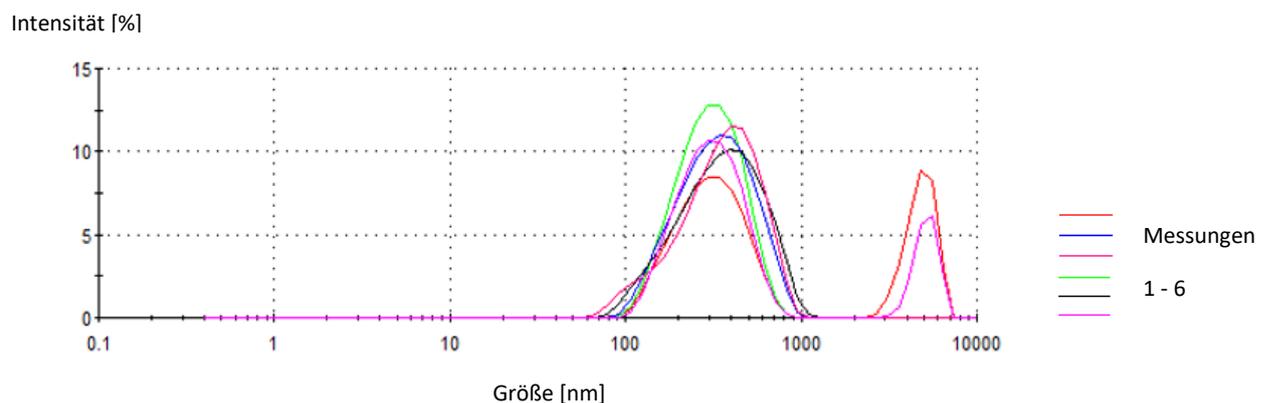


Abbildung 9: Größenverteilung der Nanopartikel nach Filtration (1 μm Porenweiten).

Als effektivste Methode stellte sich damit die Filtration heraus. Der Polydispersitätsindex konnte dabei um 17% und die durchschnittliche Partikelgröße um 6% reduziert werden. Im Gegensatz dazu blieb die Molmassenverteilung nach der Zentrifugation auf etwa demselben Niveau mit einem PDI von 0,210.

3.1.3. Studie zur Freisetzung von BodiPy aus den PLGA-Nanopartikeln

Um PLGA-Nanopartikel quantifizieren zu können, wurden sie mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BodiPy) markiert. Um die Stabilität des Einbaus des Farbstoffs zu evaluieren, wurde eine Studie zur Freisetzung von BodiPy aus den Nanopartikeln durchgeführt. Dazu wurden PLGA-Nanopartikel mit derselben Menge an Farbstoff hergestellt, wie sie auch für die Bindungsstudien eingesetzt werden. Die Chargenbezeichnung NTB 0,10 beschreibt Trimethoprim-hältige, BodiPy-markierte Nanopartikel, die mit 0,10 µg BodiPy hergestellt wurden. Parallel dazu wurde die Charge NTB 0,87 mit einem höheren BodiPy-Gehalt analysiert (Siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Größe, PDI und BodiPy-Menge von zwei Partikelchargen.

Charge	Durchmesser (nm)	PDI	BodiPy-Menge (µg)
NTB 0,10	400,5 ± 2,3	0,18 ± 0,02	0,10
NTB 0,87	382,1 ± 1,9	0,21 ± 0,02	0,87

Es wurden Suspensionen beider Partikelchargen in Kunstharn pH 5 und pH 7 hergestellt und auf die Konzentration von 5 mg/ml eingestellt. Die Suspensionen wurden in Eppendorfgläsern mit jeweils 1 ml Füllmenge bei 37°C ohne Bewegungseinfluss gelagert. Danach wurde täglich je ein Eppendorfglas beider Chargen, jeweils in Kunstharn pH 5 und pH 7, analysiert. Dazu wurden die Proben 20 Minuten bei 23000 x g unter Kühlung auf 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde 800 µl Überstand abgehoben und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dieser Arbeitsschritt sollte sicherstellen, dass lediglich die in Lösung gegangenen Farbstoffmoleküle, nicht aber die Nanopartikel selbst analysiert werden. Nach der zweiten Zentrifugation wurden 150 µl des Überstands vorsichtig abgehoben, in eine Mikrotiterplatte übergeführt und die relative Fluoreszenzintensität (RFI) bei einer Excitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionwellenlänge von 525 nm ermittelt. Ein Leerwert mit ausschließlich Kunstharn pH 5 bzw. pH 7 wurde ebenfalls erfasst und in die Auswertung miteinbezogen.

Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, wurden aus Nanopartikeln der Charge NTB 0,10 über einen Zeitraum von acht Tagen nur wenige Farbstoff-Moleküle freigesetzt. Die relative Fluoreszenz Intensität blieb bis zu diesem Zeitpunkt unabhängig vom pH-Wert des Kunstharns unter einem Wert von 170. Ab dem zehnten Tag stieg die Freisetzung, vor allem bei den in Kunstharn pH 7 gelagerten Nanopartikeln, deutlich an.

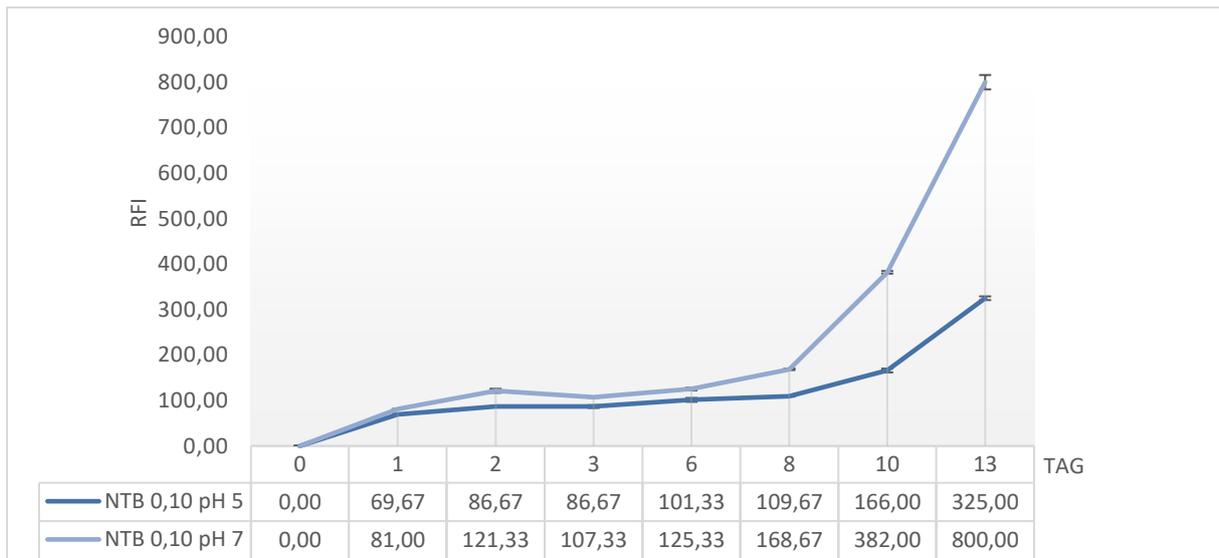


Abbildung 10: Freisetzungsprofil von BodiPy aus den PLGA-Nanopartikeln der Charge NTB 0,10 nach Lagerung in Kunstharn pH 5 und Kunstharn pH 7.

Abbildung 11 zeigt die Freisetzungskurve von BodiPy aus Partikeln mit erhöhtem Farbstoffanteil der Charge NTB 0,87. Die Partikel mit einer größeren BodiPy-Dichte weisen zwar eine insgesamt höhere Freisetzungsrates von Farbstoff auf, jedoch kann auch hier von einer Stabilität bis zum maximal achten Tag bzw. bis zum sechsten Tag bei Lagerung in Kunsturin pH 7 gesprochen werden, da die Werte auf einem relativ stabilem Niveau bei einem RFI von unter 1000 bleiben. Der RFI steigt auch hier ab dem 10. Tag bzw. bei Kunsturin pH 7 ab dem achten Tag. Aus den Partikeln, die in Kunstharn pH 7 gelagert wurden, wurde auch bei dieser Charge insgesamt mehr BodiPy freigesetzt.

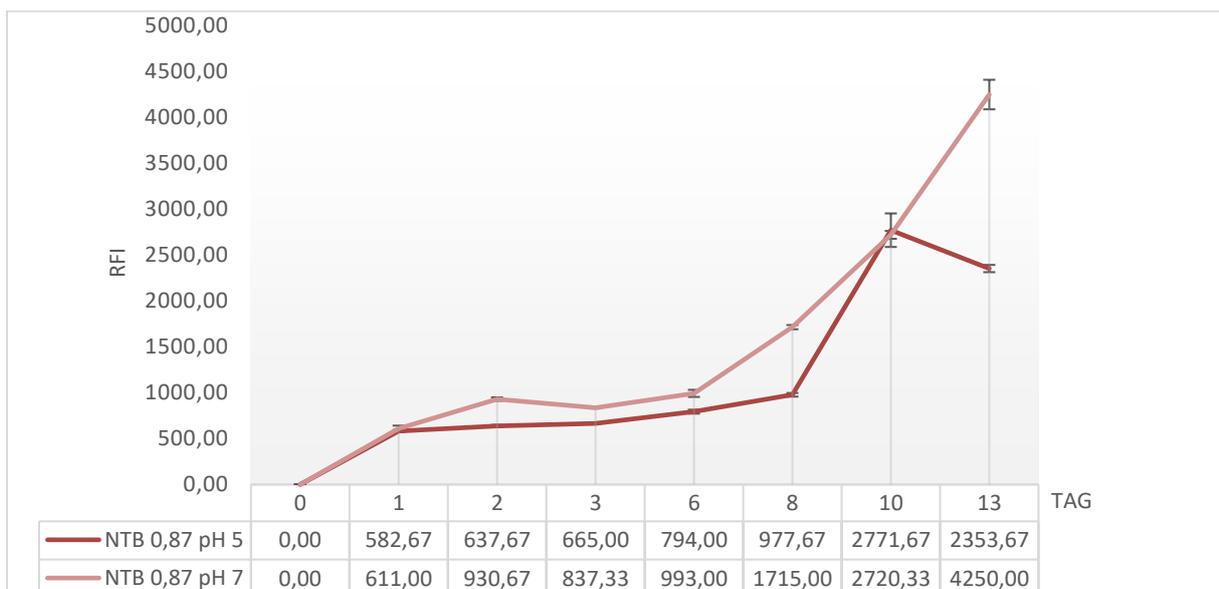


Abbildung 11: Freisetzungsprofil von BodiPy aus den PLGA-Nanopartikeln der Charge NTB 0,87 nach Lagerung in Kunstharn pH 5 und Kunstharn pH 7.

Zusammenfassend ergab die Studie zur Freisetzung von BodiPy aus PLGA-Nanopartikeln, dass der Farbstoff für die Dauer von acht Tagen stabil in der Matrix eingebaut ist. Dadurch können weitere Studien, die auf der relativen Fluoreszenz Intensität zur Quantifizierung der Partikel beruhen, reproduzierbar durchgeführt werden ohne eine unkontrollierte Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Stabilität bei Lagerung in Kunstharz pH 5 bei beiden Chargen deutlich höher ist.

3.1.4. Bestimmung des Zeta-Potenzials und Einfluss der WGA-Belegungsdichte an der Partikeloberfläche

Die Untersuchung des Zeta-Potentials von Trimethoprim-PLGA-Nanopartikeln lieferte umfassende Erkenntnisse über deren Oberflächeneigenschaften. Dazu wurden Partikel mit unterschiedlich hohem Grad an Beladung mit WGA hergestellt, um auch den Einfluss der immobilisierten Lektine einbeziehen zu können.

Das Zeta-Potential beschreibt den tatsächlichen Ladungszustand eines in Suspension bewegten Partikels an seiner Scherebene. Ein hoher positiver oder negativer Wert von unter -30 mV oder über +30 mV ist aufgrund der elektrostatischen Abstoßung der einzelnen Partikel ein Indikator für eine stabile Nanosuspension [35]. Die untersuchten Partikel wiesen ein hohes negatives Potential von durchschnittlich -57,25 mV auf (siehe Abbildung 12) und sind damit elektrostatisch stabilisiert.

Die Tendenz, mit steigender WGA-Beladungsrate niedrigere negative Werte aufzuweisen, stellt aber auch ein Maß für den Substitutionsgrad dar, da mehr Carboxylgruppen an der Bindung mit einem Lektin beteiligt sind. Die Partikel mit 0,25 mg WGA pro mg Partikel weisen mit -58,9 mV ein höheres Zeta-Potential auf als Partikel mit 1,00 mg WGA pro mg Partikel mit -56,5 mV und Partikel mit 3,00 mg WGA pro mg Partikel nur mehr -55,9 mV. Zwar ist aufgrund der vorliegenden Daten ein Trend zu erkennen, allerdings müssen aufgrund der Überlappung der Werte unter Einbeziehung der Standardabweichungen größere angelegte Studien durchgeführt werden, um zu verifizieren, ob eine Korrelation zwischen einer höheren Immobilisierungsrate von WGA und einem niedrigeren negativem Zeta-Potential vorliegt.

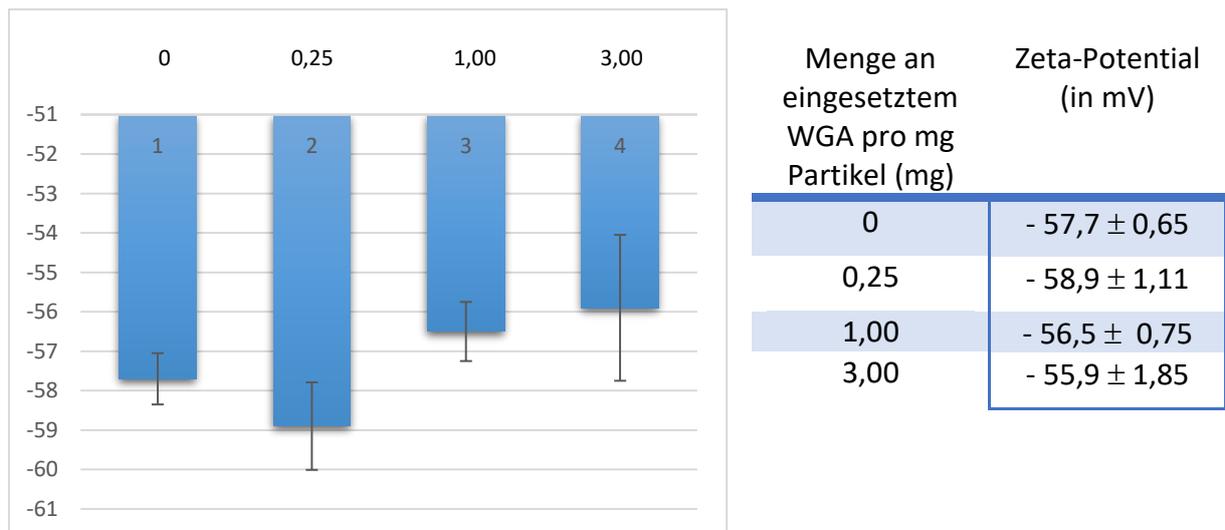


Abbildung 12: Abhängigkeit des Zetapotentials von der zur Oberflächenmodifikation der Partikel eingesetzten WGA-Menge.

3.2. Bindungsstudien am SV-HUC-Modell

3.2.1. Charakterisierung von Trimethoprim-PLGA-Nanopartikeln

Zur Durchführung der Bindungsstudien am SV-HUC-Zellmodell wurden drei Nanopartikelchargen unter identischen Bedingungen hergestellt. Die Eigenschaften in Bezug auf die Größenverteilung, des eingebauten Wirkstoffs sowie der Menge des an die Partikeloberfläche gebundenen Weizenkeimlektins sind in Tabelle 3 angegeben.

Die durchschnittliche Größe der mit PLGA Mn 2300 hergestellten Partikel lag zwischen 290 und 450 nm. Die für die Bindungsstudien eingesetzten Nanopartikel wiesen einen untereinander vergleichbaren Durchmesser zwischen 390,9 nm und 410,0 nm auf. Der PDI der drei Chargen lag zwischen 0,14 und 0,17, was für ein polydisperses System mit enger Verteilung spricht [36]. Die Partikel wurden unter Verwendung von 60 mg Trimethoprim hergestellt und zeigten eine TMP-Beladung von durchschnittlich 4,31%.

Um den Einfluss der WGA-Immobilisierungsrate auf die Adhäsion der Nanopartikel an den SV-HUC-Zellen zu analysieren, wurden Partikel ohne WGA und Partikel mit unterschiedlichen Mengen an Lektin hergestellt. Dazu wurden entweder 1000 µl HEPES pH 8 bzw. Lösungen von WGA in HEPES pH 8 in den Konzentrationen 250 µg/ml (WGA „250“), 1000 µg/ml (WGA „1000“) oder 3000µg/ml (WGA „3000“) pro Eppendorfgefäß zugesetzt. Die resultierende Menge an oberflächengebundenem WGA in µg pro mg Partikel ist in Tabelle 3 ersichtlich.

Tabelle 3: Größenübersicht, Trimethoprim-Gehalt und Menge an oberflächengebundenem WGA der für die Bindungsstudien mit Kunsturin (KH) eingesetzten Partikelchargen.

Charge	Durchmesser (nm)	PDI	TMP-Gehalt [%]	WGA „250“ [µg/mg _{Partikel}]	WGA „1000“ [µg/mg _{Partikel}]	WGA „3000“ [µg/mg _{Partikel}]
NP KH pH 5	392,2 ± 1,8	0,17 ± 0,01	4,31 ± 0,09	1,74 ± 0,06	5,21 ± 0,14	10,67 ± 0,10
NP KH pH 7	410,0 ± 3,5	0,19 ± 0,02	4,40 ± 0,15	1,84 ± 0,32	5,45 ± 0,23	10,96 ± 0,25
NP KH pH 5 + KH pH 7	390,9 ± 3,2	0,14 ± 0,01	4,23 ± 0,12	1,81 ± 0,13	4,98 ± 0,17	9,89 ± 0,09

3.2.2. Bindungsstudie bei pH 5

In vorangegangenen Studien konnte eine gesteigerte Adhäsion von Partikeln mit einer durch WGA funktionalisierten Oberfläche an porcine Urothelzellen nachgewiesen werden [26]. Um zu evaluieren, ob durch eine Erhöhung der WGA-Menge eine gesteigerte Adhäsion erzielt werden kann, wurde im Rahmen dieser Diplomarbeit die Bindungsrate von TMP-beladenen PLGA-Nanopartikeln mit unterschiedlichem WGA-Gehalt an Monolayern von SV-HUC-Zellen (Passage 75) untersucht.

Die Studie wurde bei 37°C durchgeführt, um in-vivo Bedingungen möglichst nahe zu kommen. Nach einstündiger Inkubation der Partikelsuspension in künstlichem Urin pH 5 wurden zur Simulation der natürlichen Verdünnungs- und Strömungsvorgänge durch die konstante Harnsammlung in der Blase mehrere Waschschriffe mit Kunsturin pH 5 durchgeführt. Um die Steigerung der Bindungsrate durch WGA analysieren zu können, wurde eine Negativkontrolle mit Partikeln ohne Lektin miteinbezogen. Außerdem wurde reiner Kunsturin pH 5 als Leerwert miteinberechnet.

Die Quantifizierung der auf den Zellen verbliebenen Partikel nach der Inkubation bzw. nach zwei, vier und sechs Waschschriffen erfolgte fluorimetrisch nach Auflösen der Nanopartikel mit Acetonitril und dem Überführen der Lösung in eine 96-well-Mikrotiterplatte. Es wurden jeweils drei wells für jeden Datenpunkt analysiert.

Die 100%-Werte, die direkt nach der Inkubation erfasst wurden, zeigen eine unterschiedliche absolute relative Fluoreszenzintensität (siehe Abbildung 13), da Suspensionen der Partikel auf die Zellen aufgetragen wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Werte standardisiert und die Ergebnisse der Waschschriffe auf einen 100%-Wert bezogen (siehe Abbildung 14).

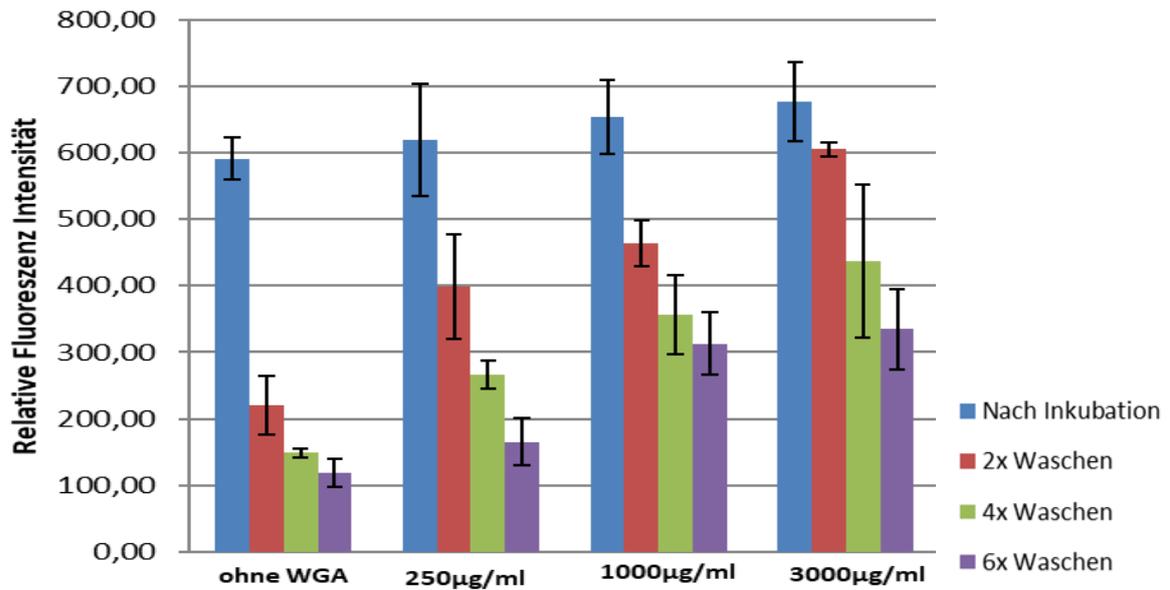


Abbildung 13: Absolute RFI-Werte entsprechend der Bindungsrate von Bodipy-markierten Nanopartikeln mit steigender WGA-Beladung in Kunsturin pH 5 an SV-HUC-Monolayern. Fluorimetrische Analyse der anhaftenden Nanopartikel nach Inkubation bzw. nach zwei, vier und sechs Waschschrinen (Bodipy, Exzitationswellenlänge: 485 nm, Emissionswellenlänge: 525 nm).

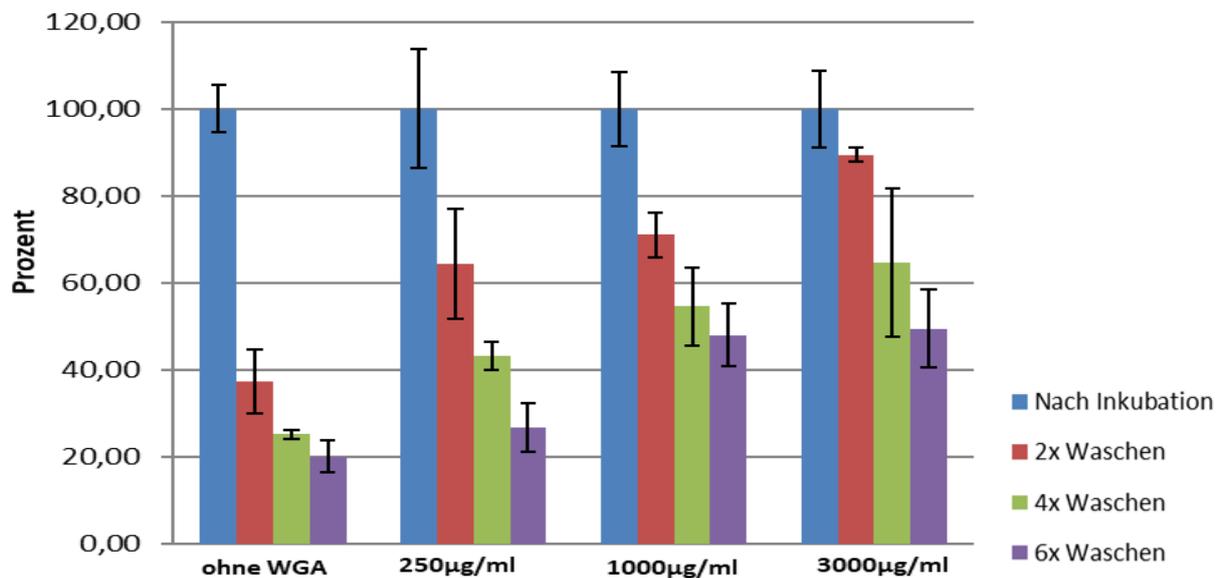


Abbildung 14: RFI in Relation zum 100%-Wert nach der Inkubation. Bindungsrate von Bodipy-markierten Nanopartikeln mit steigender WGA-Beladung in Kunsturin pH 5 an SV-HUC-Monolayer. Fluorimetrische Analyse der anhaftenden Nanopartikel direkt nach einstündiger Inkubation bzw. nach zwei, vier und sechs Waschschrinen (Bodipy, Exzitationswellenlänge: 485 nm, Emissionswellenlänge: 525 nm).

Wie in Abbildung 14 dargestellt ist, wiesen auch Partikel ohne WGA eine inhärente Adhäsion an die Zelloberfläche auf. So hafteten auch nach dem zweiten Waschgang noch mehr als ein Drittel der Partikel auf dem Monolayer, nach sechsmaligem Waschen sank dieser Wert auf ein Fünftel.

In der Zellstudie zeigten die Nanopartikel mit oberflächlich immobilisiertem Lektin im Mittel eine gesteigerte Bindungsrate. Von den Partikeln mit dem geringsten WGA-Gehalt verblieben nach zwei Waschgängen 64%, nach dem sechsten Waschschrift noch 27% der Partikel auf den Zellen. Bei den Partikeln mit höherem WGA-Gehalt adhärten nach dem letzten Waschschrift noch etwa die Hälfte der Partikel, nämlich 48%, an den Zellen. Die Nanopartikel mit dem höchsten WGA-Gehalt zeigten die höchste Bindungsrate. Es verblieben nach zweimaligem Waschen 89%, nach vier Waschschriften 65% und nach sechs Waschschriften 49% der Partikel auf den Zellen.

Da die Steigerung der Adhäsion von Partikeln mit 3000 µg/ml im Vergleich zu jenen mit 1000 µg/ml nach dem letzten Waschschrift vernachlässigbar war, und lediglich nach dem zweiten und vierten Waschen eine Erhöhung um 18% bzw. 11% mit sich brachte, ist aus wirtschaftlicher Sicht die Überlegung angebracht, ob eine Verdreifachung der eingesetzten WGA-Menge sinnvoll ist.

Durch die Oberflächenmodifikation der Partikel mit der höchsten WGA-Dichte konnte die Bindungsrate nach sechs Waschgängen im Vergleich zu Lektin-freien Partikeln auf das 2,45-fache gesteigert werden.

Insgesamt konnte eine Korrelation einer erhöhten Menge an WGA mit einer Steigerung der Bindungsaffinität zu SV-HUC-Zellen nachwiesen werden. Die Ergebnisse dieser Studie müssen allerdings aufgrund der großen Schwankungen und Standardabweichungen in weiteren Analysen validiert werden, um verlässliche und allgemein gültige Aussagen treffen zu können.

3.2.3. Bindungsstudie bei pH 7

Der pH-Wert des Urins liegt im Durchschnitt bei 6,0. Er wird von vielen Faktoren, allen voran der Ernährung, beeinflusst. Da eine Harnwegsinfektion allerdings mit einer Alkalisierung des Harns einhergeht [37], wurde eine Analyse der Bindungsfähigkeit von oberflächenmodifizierten PLGA-Nanopartikeln in einem nicht sauren Milieu durchgeführt.

Der nach einer modifizierten Vorschrift des „Artificial urine Siriraj“ von Chutipongtanate und Thongboonkerd [38] hergestellte Kunsturin war bis zu einem pH-Wert von 7 stabil. Im Basischen kam es zur Ausfällung von Einzelkomponenten. Aus diesem Grund wurde eine weitere Bindungsstudie an SV-HUC-Zellen (Passage 78) unter identischen Voraussetzungen durchgeführt und lediglich der pH des Kunsturins von pH 5 auf pH 7 erhöht.

Abbildung 15 zeigt die absoluten Werte der relativen Fluoreszenzintensität, abzüglich des Leerwertes mit reinem Kunsturin pH 7.

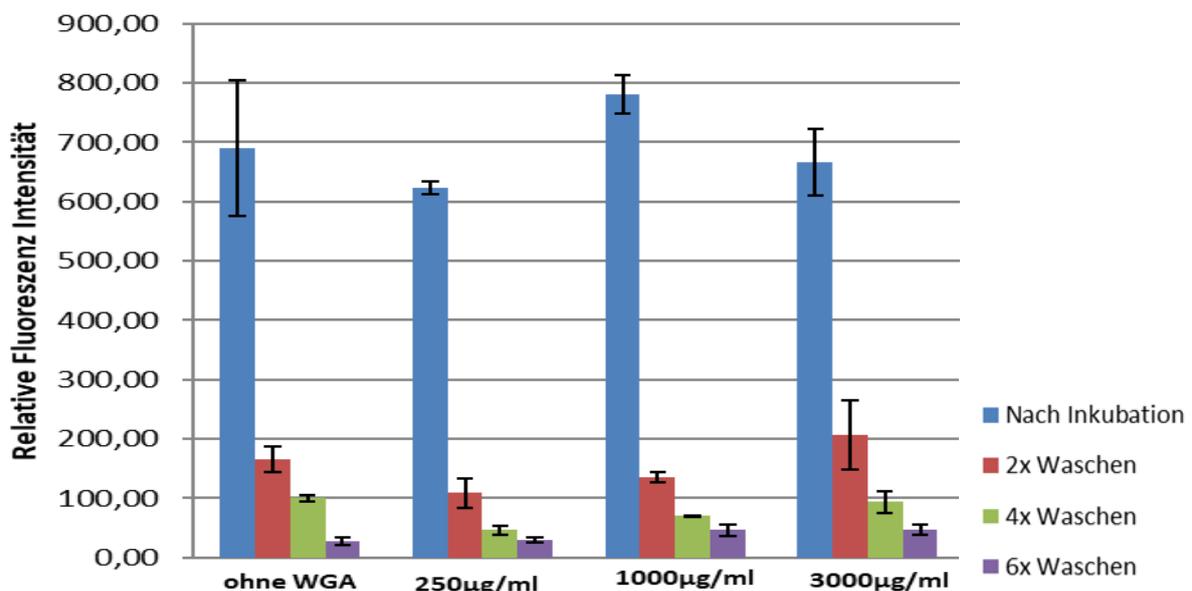


Abbildung 15: Absolute RFI-Werte entsprechend der Bindungsrate von BodiPy-markierten Nanopartikeln mit steigender WGA-Beladung in Kunsturin pH 7 an SV-HUC-Monolayern. Fluorimetrische Analyse der anhaftenden Nanopartikel nach Inkubation bzw. nach zwei, vier und sechs Waschschrritten (BodiPy, Exzitationswellenlänge: 485 nm, Emissionswellenlänge: 525 nm).

Um die Adhäsion der Partikel mit unterschiedlicher WGA-Beladung besser vergleichen zu können, wurden die jeweiligen RFI-Werte nach der Inkubation auf 100% genormt und die Werte nach dem zweiten, vierten und sechsten Waschschrtritt darauf bezogen (Siehe Abbildung 16).

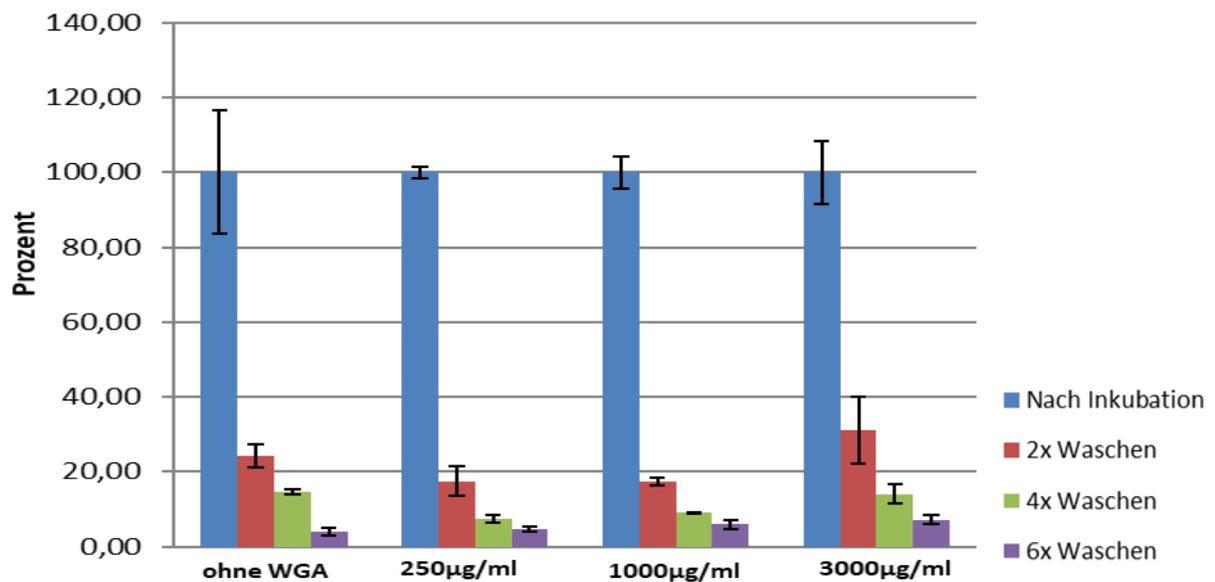


Abbildung 16: RFI in Relation zum 100%-Wert nach der Inkubation. Bindungsrate von Bodipy-markierten Nanopartikeln mit steigender WGA-Beladung in Kunsturin pH 7 an SV-HUC-Monolayer. Fluorimetrische Analyse der anhaftenden Nanopartikel direkt nach einstündiger Inkubation bzw. nach zwei, vier und sechs Waschschritten (Bodipy, Exzitationswellenlänge: 485 nm, Emissionswellenlänge: 525 nm).

Im neutralen pH-Bereich sank die Bindungsaffinität aller PLGA-Nanopartikel zum Zellmonolayer, unabhängig von der Menge des oberflächlich immobilisierten WGAs. Selbst bei höchster Lektin-Funktionalisierung von 3000 µg/ml waren nach dem zweiten Waschschriff nur noch rund ein Drittel der Partikel gebunden, nach vier Waschschriffen 14% und nach dem sechsten Waschen nur noch 7%. Der Anteil der auf den Zellen haftenden Partikel nach dem letzten Waschschriff betrug bei den 1000 µg/ml Partikeln noch 6%, bei der geringsten WGA-Beladung von 250 µg/ml noch 5%.

Auch die Nanopartikel ohne WGA-Funktionalisierung interagierten in vergleichbarem Ausmaß mit den Zellen. So hafteten nach zweimaligem Waschen noch 24% der Partikel am SV-HUC-Monolayer und bei der letzten Messung konnten noch 4% der ursprünglichen Partikelmenge nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigten alle Partikel, unabhängig von der eingesetzten WGA-Menge, bei einem pH-Wert von 7 eine deutlich geringere Adhäsion an Urothelzellen als bei pH 5. Obwohl die Steigerung von 4% ohne WGA auf 7% mit der höchsten Lektindichte auf der Nanopartikeloberfläche nicht groß ist, ist doch eine inhärente Bindungsfähigkeit der PLGA-Nanopartikel an die Zellen erkennbar.

3.2.4. Bindungsstudie bei pH 7 mit Vorinkubation bei pH 5

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde eine weitere Bindungsstudie an SV-HUC-Monolayern (Passage 80) durchgeführt, bei der zunächst eine Stunde lang mit einer Partikelsuspension in Kunsturin pH 5 inkubiert wurde. In den nachfolgenden Waschschrritten, die die Strömungsvorgänge des Urins in der Blase simulieren sollen, wurde Kunsturin pH 7 verwendet, um den in-vivo Vorgängen möglichst nahe zu kommen. So sollte eruiert werden, ob die Primärinkubation mit Kunsturin im Sauren ausreichend ist, um die initiale Bindung der PLGA-Nanopartikel zu vermitteln - vergleichbar mit den Ergebnissen der ersten Bindungsstudie, die ausschließlich bei pH 5 durchgeführt wurde.

Alle anderen Parameter der Bindungsstudie wurden mit Ausnahme der Änderung des pH-Wertes des Kunsturins gleich gehalten.

Entsprechend der Rohdaten steigt im Mittel die SV-HUC-Bindungsrate der PLGA-Nanopartikel mit steigender WGA-Menge zur Oberflächenfunktionalisierung. Aber auch die Partikel ohne WGA-Funktionalisierung zeigten wiederum eine intrinsische Fähigkeit zur Adhäsion (Siehe Abbildung 17 und Abbildung 18).

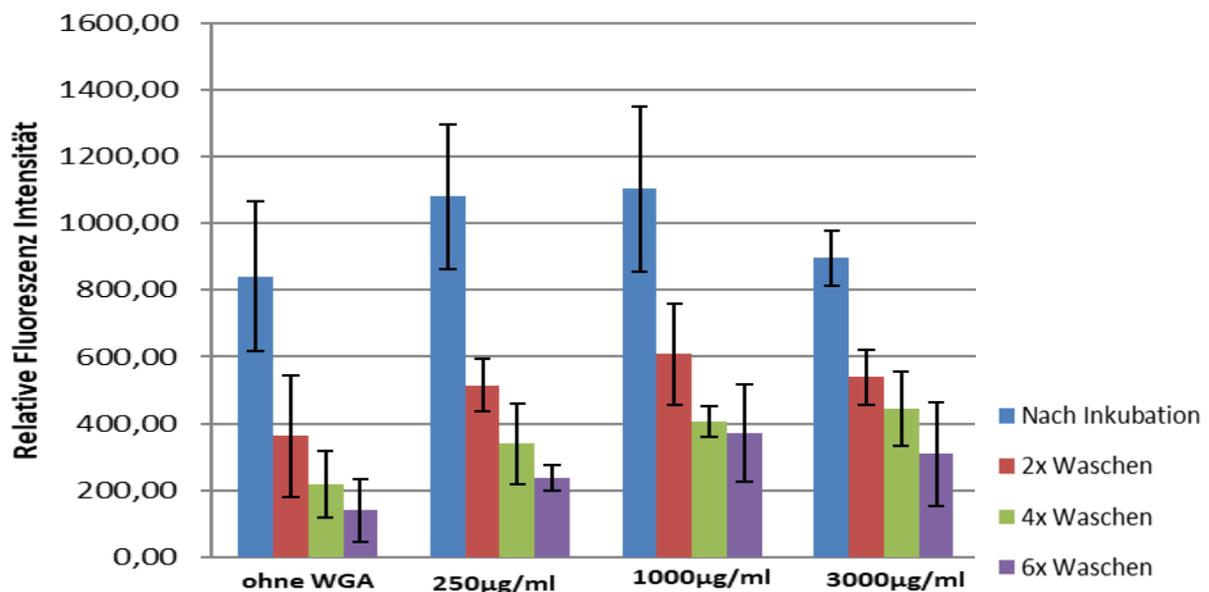


Abbildung 17: Absolute RFI-Werte entsprechend der Bindungsrate von Bodipy-markierten Nanopartikeln mit steigender WGA-Beladung bei einer Inkubation in Kunsturin pH 5 und anschließendem Waschen mit Kunsturin pH 7 an SV-HUC-Monolayern. Fluorimetrische Analyse der anhaftenden Nanopartikel nach Inkubation bzw. nach zwei, vier und sechs Waschschrritten (Bodipy, Exzitationswellenlänge: 485 nm, Emissionswellenlänge: 525 nm).

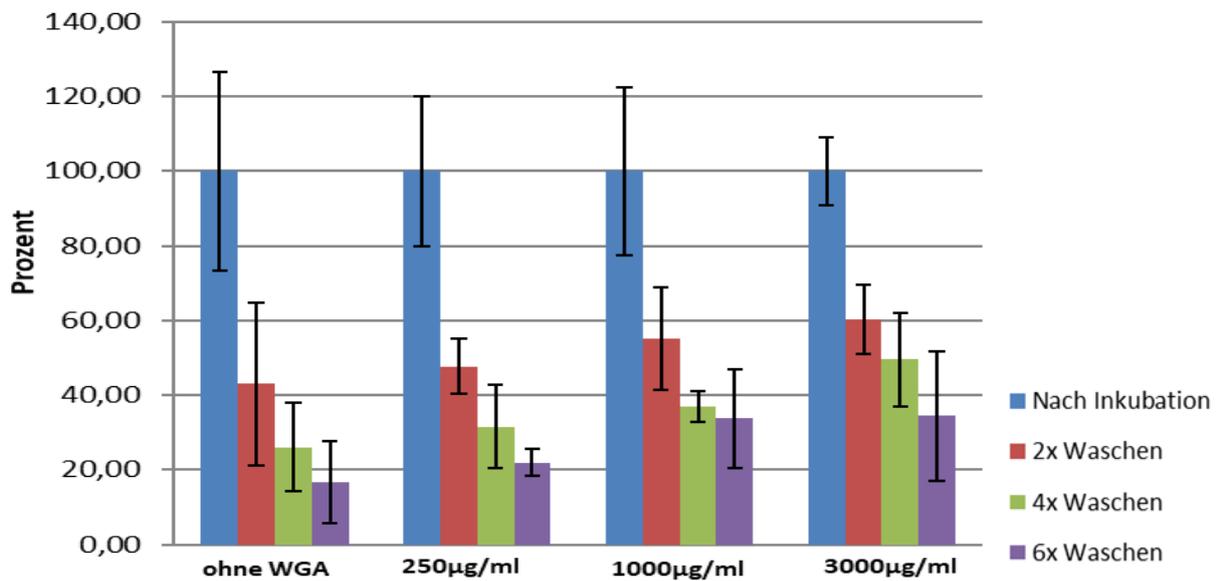


Abbildung 18: RFI in Relation zum 100%-Wert nach der Inkubation. Bindungsrate von Bodipy-markierten Nanopartikeln mit steigender WGA-Beladung bei einer Inkubation in Kunsturin pH 5 und anschließendem Waschen mit Kunsturin pH 7 an SV-HUC-Monolayer. Fluorimetrische Analyse der anhaftenden Nanopartikel nach Inkubation bzw. nach zwei, vier und sechs Waschschritten (Bodipy, Exzitationswellenlänge: 485 nm, Emissionswellenlänge: 525 nm).

Der Effekt, dass eine Verdreifachung der WGA-Beladung von 1000 µg/ml auf 3000 µg/ml nach dem letzten Waschen keine wesentliche Steigerung (33% auf 34%) zur Folge hatte, konnte auch in dieser Studie gezeigt werden.

Zwar verdoppelte sich der Anteil der nach sechs Waschschritten an den Zellen adhärenen Partikel von 17% auf 34% beim Vergleich von WGA-freien Partikeln mit Nanopartikeln, die mit 3000 µg/ml WGA hergestellt wurden. Jedoch konnten bei allen eingesetzten WGA-Konzentrationen die Bindungsrate nicht in dem Ausmaß gesteigert werden, um mit den Werten der ersten Bindungsstudie vergleichbar zu sein.

Die Erkenntnisse aus den drei Bindungsstudien legen den Schluss nahe, dass die Partikel-Zell-Bindung mit größerer Effizienz bei pH 5 als im neutralen Bereich erfolgt, aber auch das Milieu der nachfolgenden Waschschriffe einen Einfluss auf die Adhäsionsrate der PLGA-Nanopartikel ausübt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass PLGA-Nanopartikel eine beachtliche inhärente Affinität zu SV-HUC-Zellen aufweisen und die Bindungsrate durch den Einsatz von WGA noch gesteigert werden kann.

Aufgrund der großen Anfälligkeit für Fehler und den großen Standardabweichungen der vorliegenden Bindungsstudien, sind jedoch weitere Analysen nötig, um die Ergebnisse zu verifizieren.

4. Zusammenfassung

Aufgrund der hohen Prävalenz von Harnwegsinfekten, den steigenden Antibiotikaresistenzen und der unzureichenden Effektivität gängiger Therapien von Harnwegsinfekten ist die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden nötig.

Die intravesikale Instillation des Wirkstoffs bietet viele Vorteile, allerdings sind dieser Methode durch konstante Verdünnungsvorgänge und dem Auswaschen des Arzneistoffs Grenzen gesetzt. Vor allem die Eradikation von intrazellulär persistierenden Erregern, die zu häufigen Rezidiven führen, stellt aus klinischer und therapeutischer Sicht ein großes Problem dar. Der Einsatz von nanopartikulären Trägersystemen, die an die Zellen des Urothels adhären, bietet Möglichkeiten, die instillative Behandlung von Harnwegsinfekten für den Patienten zu verbessern.

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurden dazu Verfahren entwickelt und Prozessschritte optimiert, Trimethoprim-beladene, BodiPy-markierte Nanopartikel mit einer Matrix aus PLGA herzustellen, zu charakterisieren und deren Oberfläche mit Weizenkeimlektin zu modifizieren, um schließlich die Adhäsion an gesunde Blasenellen im SV-HUC-Zellmodell ex-vivo zu analysieren.

Die Herstellung der Nanopartikel erfolgte nach dem „solvent-evaporation“-Verfahren unter Bildung einer O/W-Emulsion. Ein optimiertes Reinigungsprotokoll, das einen Kompromiss zwischen Ausbeute und Resuspendierbarkeit darstellt, ergab Nanopartikel mit einem Durchmesser von 230 nm in einer Gauß'schen Verteilung. Die im Rahmen der Lagerung bei 4°C durch Ostwald Reifung entstandenen Agglomerate konnten einfachsten durch Filtration abgetrennt werden. Die Analyse des Zeta-Potentials der Nanopartikel mittels Laser-Doppler-Mikro-Elektrophorese zeigte ein hohes negatives Potential von durchschnittlich - 57,25 mV, sodass die Dispersionen eine hohe elektrostatische Stabilität aufweisen. Eine Oberflächenmodifikation mit Weizenlektin bewirkt im Mittel eine maximale Abnahme um 1,8 mV und kann als qualitativer Beweis der Funktionalisierung gewertet werden.

Als Voraussetzung für Bindungsstudien an Monolayern von gesunden Blasenellen im SV-HUC-Zellmodell konnte der stabile Einbau von Markermolekülen in die Nanopartikelmatrix für mindestens acht Tage bei 37°C nachgewiesen werden. Die Bindungsstudien zeigten eine hohe unspezifische Bindung der Nanopartikel an Blasenepithelzellen unabhängig von der Acidität des Kunsturins. Unter sauren Bedingungen zeigten Partikel mit einer größeren Menge an immobilisiertem WGA eine gesteigerte Adhäsion, sodass nach vier Waschschritten, die die laufende Verdünnung durch die kontinuierliche Produktion von Harn sowie die Miktion imitieren sollten, um 40% und nach sechs Waschschritten um 29% mehr Partikel an das Urothel gebunden waren, sofern die Oberfläche mit Weizenlektin funktionalisiert war. Bei einer Inkubation in Kunstarn pH 5 und anschließendem Waschen mit Kunstarn pH 7 konnte eine Verbesserung der Adhäsion durch gesteigerte WGA-Immobilisierung nachgewiesen werden, jedoch in geringerem Ausmaß von maximal 34%. Die PLGA-Nanopartikel blieben allerdings unabhängig vom pH-Wert des Kunstarns auch ohne Lektin zu einem Anteil von bis zu 20% am Zellmonolayer haften.

Insgesamt konnten in dieser Diplomarbeit einige Parameter geklärt werden, die im Rahmen einer präklinischen Entwicklung einer Arzneiform von Bedeutung sind. Besonders die Zellbindungsstudien können als Teil eines „proof of concept“ gewertet werden, die in Zukunft eine effizientere und Patienten-freundliche Therapie von schweren Harnwegserkrankungen erwarten lassen.

5. Abstract

Due to the urgent demand for more potent therapy regimens for urinary tract infections, especially in preventing recurrences, the development of new treatment strategies is needed.

Intravesical instillation of antibiotics offers many benefits, but this method is still limited by constant dilution and washout of the drug by miction. Furthermore, the low permeability of the urothelial layer counteracts eradication of intracellular persistent pathogens, which leads to frequent recurrences. A new approach to circumvent these issues is the usage of nanoparticulate carrier-systems and biorecognitive targeting concepts.

For this purpose, key parameters were optimized for preparation and purification of trimethoprim- and BodiPy-loaded PLGA-nanoparticles, as well as their surface modification with bioadhesive wheat germ agglutinin.

Centrifugation at 23000 x g for 15 minutes at 4°C proved to be adequate for preparation of a dispersion containing 233 nm particles in a Gaussian distribution. Optionally, aggregated particles can be easily removed by using a 1 µm filter. Analysis of the zeta potential of the nanoparticles as a function of WGA loading revealed that a zeta potential of -57.7 mV in case of parent nanoparticles but decreased to -55.9 mV in case of WGA-functionalization.

Most important for reliable binding studies, the dye leakage from the nanoparticles was as low as studies can be performed up to eight days without any doubt. Binding studies were performed ex-vivo on artificial healthy urothelium represented by SV-HUC-monolayers. Independent from the pH of artificial urine, the non-specific adhesion of the PLGA nanoparticles was unexpectedly high. Nevertheless, in acidic artificial urine the binding rate of nanoparticles with WGA-functionalized surface was 40% after four or after six washing steps 29% higher than that of plain particles. The washing steps imitated the effect of dilution by continuously produced urine and miction on bioadhesion.

All in all, this diploma work contributed to elucidation of parameters important for preclinical development of a new formulation. Especially the cell adhesion studies are considered as a part of a “proof of concept” that is expected to contribute to a more efficient and more patient-friendly therapy of severe urinary tract infections.

6. Anhang

6.1. Verwendete Chemikalien

Hersteller	Chemikalie
AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)	- 2,6,8-Trihydroxypurin (Harnsäure)
Carl-Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	- 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid (EDAC) - Essigsäureethylester, ≥99,5%, Ph.Eur., reinst (Ethylacetat) - N-Hydroxysuccinimid ≥ 99%, zur Synthese (NHS) - Natriumchlorid ≥ 99%, Ph.Eur., USP - HEPES Pufferan® ≥99,5%, buffer grade - Glycin Pufferan® ≥99%, p.a. - MES Pufferan® ≥99% - Di-Natriumoxalat ≥99%
Evonik Nutrition & Care GmbH (Darmstadt, Deutschland)	- Resomer RG 503 H- Polylactid-co- glycolid (PLGA RG 503 H)
Fluka Chemie GmbH (Buchs, Deutschland)	- Harnstoff puriss., p.a.ACS; ≥ 99,5% (T)
Invitrogen (Eugene, Oregon, USA)	- 4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora3a,4a- diaza-s-indacene; BodiPy 493/503 (BodiPy)
MERCK KGaA (Darmstadt, Deutschland)	- Natriumhydrogencarbonat reinst, Lebensmittelqualität - Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, zur Analyse - Kaliumdihydrogenphosphat, reinst - Calciumchlorid-Dihydrat, reinst - Ammoniumchlorid, zur Analyse - Magnesiumsulfat-Heptahydrat, reinst
Riedel-de-Häen (Seelze, Deutschland)	- Kaliumchlorid, reinst
Sigma-Aldrich	- Natriumcitrat tribasisch Dihydrat, puriss. - Natriumsulfat, ReagentPlus™ ≥99,0%
Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)	- Micro BCATM Protein Assay Kit - Gibco™ F12K Nutrient Mixture (1x) [+] LGlutamin) von Gibco Life Technologies (Carlsbad, Californien) erhältlich bei Thermo Fisher Scientific - Gibco™ Penicillin Streptomycin (Pen Strep)

Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
 VWR BDH Chemicals (Wien, Österreich)

- Wheat Germ Agglutinin (WGA)
- Dimethyl Sulfoxide, anhydrous (DMSO) [1][SEP]
- Acetonitril HiPerSolv CHROMANORM® for HPLC- SUPER GRADIENT Reag. Ph. Eur., USP, ACS

6.2. Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage	Sartorius (Göttingen, Deutschland) - MC 210P
Analytische HPLC	Shimadzu Corp. (Kyoto, Japan) - Nexera XR, - Quaternäre Pumpe - Probengeber - Thermostatisierter Säulenofen - Diodenarray und Wellenlängendetektor - Software: LabSolutions
Dispergiergeräte	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) - Acclaim™120, analytische RP18e Säule Omni International (Kennesaw, GA, USA) - 5000 Ika Labortechnik (Staufen im Breisgau, Deutschland) - Ultra- Turrax T8
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Axio Observer.Z1 microscopy system LED illumination system "Colibri" and the AxioVision Rel. 4.8.2 software (Zeiss, Göttingen, Germany)
Gefriertrocknungsanlage	Christ (Osterode am Harz, Deutschland) - Alpha 1-4 LDplus Vakuumpumpe: Pfeiffer (Wetzlar, Deutschland) - Vacuum Duo ^{Line}
Inkubator	Thermo Scientific (Waltham, Massachus- etts, USA) - BBD 6220 CO2 Inkubator
Laborwaage	Sartorius (Göttingen, Deutschland) - LC 1201S
Lichtmikroskop	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)

Magnetrührheizplatte	- Axio Observer.Z1 mit LED illumination System Colibri® und Zeiss Beleuchtungseinrichtung HXP 120 Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland) - MR 3000
Mikrotiterplattenfluorimeter	Tecan (Männedorf, Schweiz) - Infiniate M200 Pro
pH-Meter	Mettler Toledo (Columbus, OH, USA) - Seven Compact - InLab® Semi Micro
Rotationsverdampfer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland) - Hei-VAP Advantage
Schüttelapparat	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel, Deutschland) - 3005
Sterilraum Werkbank	ESCO Micro Pte. Ltd. (Changi South Street, Singapur) - Class II Biosafety Cabinet Labculture Plus
Ultraschallbad	Bandelin (Berlin, Deutschland) - Sonorex Super 10 P
Ultraschall-Homogenisierer	Bandelin electronic GmbH & Co. KG (Berlin, Deutschland) - Sonoplus HD 2070
Vortexer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland) - REAX 2000
Zentrifugen	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) - Centrifuge 5804 R Heraeus (Hanaus, Deutschland) - Megafuge 1.0 ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA) - Sorvall® RT7
Zetasizer (Laser-Partikelgrößenmessgerät)	Malvern Instruments (Malvern UK) - Zetasizer Nano ZS

6.3. Herstellung von Trimethoprim-beladenen, BodiPy-markierten PLGA-Nanopartikeln

Die Nanopartikel werden nach dem „solvent evaporation“-Verfahren hergestellt, wo aus einer Öl-in-Wasser-Emulsion das organische Lösungsmittel abgedampft wird.

In einem kleinen verschließbaren Gefäß werden 400 mg Polylactid-co-Glycolid (PLGA) in 2,48 ml Ethylacetat unter Kühlung gelöst. Im Rahmen dieser Diplomarbeit werden zwei verschiedene Typen von PLGA, PLGA RG 503H sowie PLGA Mn 2300, verwendet, die auch bei der Herstellung der Nanopartikel unterschiedlich zu behandeln sind.

Der Lösung von PLGA wird unter Rühren eine Lösung aus 60 mg Trimethoprim in 500 µl DMSO zugesetzt. Zusätzlich werden 2 µl einer Lösung von 0,5 mg/ml BodiPy in Ethylacetat beigemischt. Nach Zugabe der Farbstoff-Lösung ist unter Lichtausschluss zu arbeiten.

Nach kurzer Homogenisierung der organischen Phase wird diese zügig und ohne Nachtropfen in 8 ml einer 2% (w/v) Pluronic® F-68 Lösung in Wasser überführt und durch Behandlung mit einem Ultra-Turrax Dispergiergerät (Ultra-Turrax T8, Ika Labortechnik) für PLGA Mn 2300 oder mit einer Ultraschall-Sonde (Sonoplus HD 2070, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Germany) für PLGA RG 503H emulgiert (Tabelle 1). Die entstandene Emulsion wird zügig und ohne Nachtropfen in 150 ml wässrige 3% (w/v) Lösung Pluronic® F-68 Lösung eingebracht und unter Kühlung und zusätzlicher Luftzufuhr mit einem Ultra-Turrax Dispergiergerät (Omni International 5000) auf Stufe 2 dispergiert. Durch die Verdunstung der organischen Phase erhärtet in diesem Schritt die Mikro- bzw. Nanotröpfchen aus PLGA, Wirkstoff und Farbstoff, was auch namensgebend für die Methode der „solvent evaporation“ ist.

Nach einer Stunde werden eventuell verbleibende Ethylacetatreste im Rotationsverdampfer (HeiVAP Core; Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach, Germany) unter vermindertem Druck bei Raumtemperatur restlos entfernt. Die Dauer und das Ausmaß der Druckreduktion hängen von der verwendeten PLGA-Sorte ab und sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Zur Reinigung werden die Partikel mit 20 mM HEPES/NaOH-Puffer pH 7 mit 0,1 % (w/v) Pluronic (HEPES/PLU) gewaschen und darin suspendiert. Um größere Agglomerate abzutrennen, können als zusätzlicher Schritt die Partikel durch einen Filter der Maschenweite 1 µm filtriert werden.

Zur Konzentrationsbestimmung der Suspension werden mindestens zwei Aliquote von 1,0 ml entnommen und mit 2 ml Aqua dest. gewaschen, wobei mit 14.000 UpM (20817 x g) bei 4°C 15 Minuten zentrifugiert wird. Das Pellet wird anschließend in jeweils 2,0 ml Aqua dest. resuspendiert, bei -80 °C gefroren und das Wasser durch Lyophilisation entfernt.

Tabelle 4: Parameter zur Herstellung von Nanopartikeln aus PLGA RG 503 H und PLGA Mn 2300.

Arbeitsschritt	PLGA RG 503 H	PLGA Mn 2300
Emulgierung	Ultraschall, 70% Leistung, 1 Min	Ultra-Turrax, Stufe 6, 5 Min
Behandlung am Rotationsverdampfer	130 mbar 30 Min lang 0 mbar 30 Min lang	300 mbar 30 Min lang 250 mbar 10 Min lang 200 mbar 10 Min lang 150 mbar 10 Min lang 0 mbar 5 Min lang
Reinigung	40.000xg, 4°C, 30 Min lang	23.000xg, 4°C, 15 Min lang

6.4. Charakterisierung der Nanopartikel

6.4.1. Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers und der Größenverteilung

Dazu werden 600 µl einer 1 mg/ml Nanopartikel-Suspension in Aqua dest., HEPES/PLU oder einer wässrigen Kryoprotector-Lösung (2% Saccharose, 0,1% Pluronic® F-68 in Aqua dest.) im Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) analysiert. Es ist darauf zu achten, dass die Küvette luftblasenfrei befüllt ist. Durch Messung der zeitlichen Schwankung der Streulichtintensität auf Basis der Brown'schen Molekularbewegung nach dem „Dynamic light scattering (DLS)“-Verfahren wird der durchschnittliche hydrodynamische Durchmesser errechnet. Der Polydispersitätsindex (PDI) wird zur Beurteilung der Homogenität der Partikelgrößenverteilung herangezogen. Außerdem wird die Größenverteilung nach Intensität (mean intensity) berechnet.

6.4.2. Bestimmung des Zeta-Potentials

Das Zeta-Potential wird mittels Laser-Doppler-Mikro-Elektrophorese ebenfalls im Zetasizer Nano ZS bestimmt. Dazu wird eine 1 mg/ml Suspension in destilliertem Wasser hergestellt und mindestens 0,75 ml luftblasenfrei in eine Küvette überführt und analysiert.

6.4.3. Quantifizierung des Trimethoprimgehalts durch HPLC

Die Beladung der Nanopartikel mit dem Wirkstoff Trimethoprim wird mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) bestimmt.

6.4.3.1. *Probenvorbereitung*

Ein aliquoter Teil der Partikelsuspension in HEPES/PLU wird bei 14.000 UpM (20817 x g) und 4°C 15 Minuten zentrifugiert und mit Aqua dest. gewaschen. Das in destilliertem Wasser aufgenommene Pellet wird gut suspendiert, bei -80°C gefroren und anschließend lyophilisiert.

Nach der Gefriertrocknung werden 2,5 – 8,0 mg Partikel in ein Wheaton-Glas eingewogen und in 2 ml Ethylacetat vollständig gelöst. Zur Quantifizierung des Wirkstoffs mittels HPLC ist es nötig, PLGA und Trimethoprim voneinander zu trennen. Da Letzteres eine bessere Löslichkeit in angesäuertem Wasser aufweist, wird im nächsten Schritt mit 1 ml 0,1%iger (v/v) Ameisensäure in Aqua dest. ausgeschüttelt. Um eine möglichst vollständige Extraktion zu gewährleisten, ist eine ausreichend lange Durchmischung der beiden Phasen nötig. Nach vollständiger Phasentrennung wird die untere, wässrige Phase vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt, die wässrigen Phasen vereinigt und mindestens drei Stunden belüftet, um etwaige Ethylacetatreste zu entfernen. Anschließend wird die Probe erneut gefriergetrocknet.

Das Lyophilisat wird in 150 µl 0,1% (v/v) Ameisensäure in partikelfreiem destilliertem Wasser vollständig aufgenommen. Um jegliche, auch unsichtbare PLGA-Reste zu entfernen, die zu Ablagerungen an der stationären Phase der HPLC führen könnten, wird 15 Minuten bei 4°C und 14.000 UpM (20817xg) zentrifugiert und nur der Überstand in ein HPLC-Vial übergeführt.

6.4.3.2. *HPLC-Analyse*

Die HPLC wird mit einem Nexera XR-HPLC-Gerät (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) an einer analytischen RP18e Säule (Acclaim™120, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Der Säulenofen wird auf 30 °C temperiert und eine Flussrate von 0,5 ml/Min eingestellt. Das Probenvolumen beträgt 5 µl. Die Quantifizierung des Trimethoprim erfolgt nach Konzentrierung in einem Gradienten der beiden Fließmittel 0,1% (v/v) Ameisensäure in partikelfreiem destilliertem Wasser (FA/H₂O) und 0,1% (v/v) Ameisensäure in Acetonitril (FA/ACN). Zu Beginn wird ein Verhältnis von 99 Teilen FA/H₂O und einem Teil FA/ACN eingesetzt, wobei Letzteres kontinuierlich über einen Zeitraum von 10 Minuten auf einen relativen Anteil von 95% gesteigert wird. Diese Zusammensetzung wird dann eine Minute lang beibehalten.

Die Retentionszeit von Trimethoprim beträgt circa fünf Minuten. Ein Dioden-Array-Detektor analysiert die Probe bei 280 nm und die Auswertung erfolgt mit der Software LabSolutions (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan).

Um verlässlichere Werte zu erhalten, werden alle Proben dreimal bestimmt.

6.4.3.3. Erstellung einer Eichgeraden für Trimethoprim

Um eine ausreichende Reproduzierbarkeit der Quantifizierung von Trimethoprim zu gewährleisten, wird eine Eichgerade erstellt (siehe Abbildung 20). Dazu wird ausgehend von einer Stammlösung von 1,0 mg/ml Trimethoprim in 0,1% (v/v) Ameisensäure in partikelfreiem Aqua dest. eine Verdünnungsreihe nach folgendem Schema hergestellt:

1:2	1:10	1:25	1:200
1:4	1:12,5	1:50	1:400
1:8	1:16,67	1:100	1:666,67

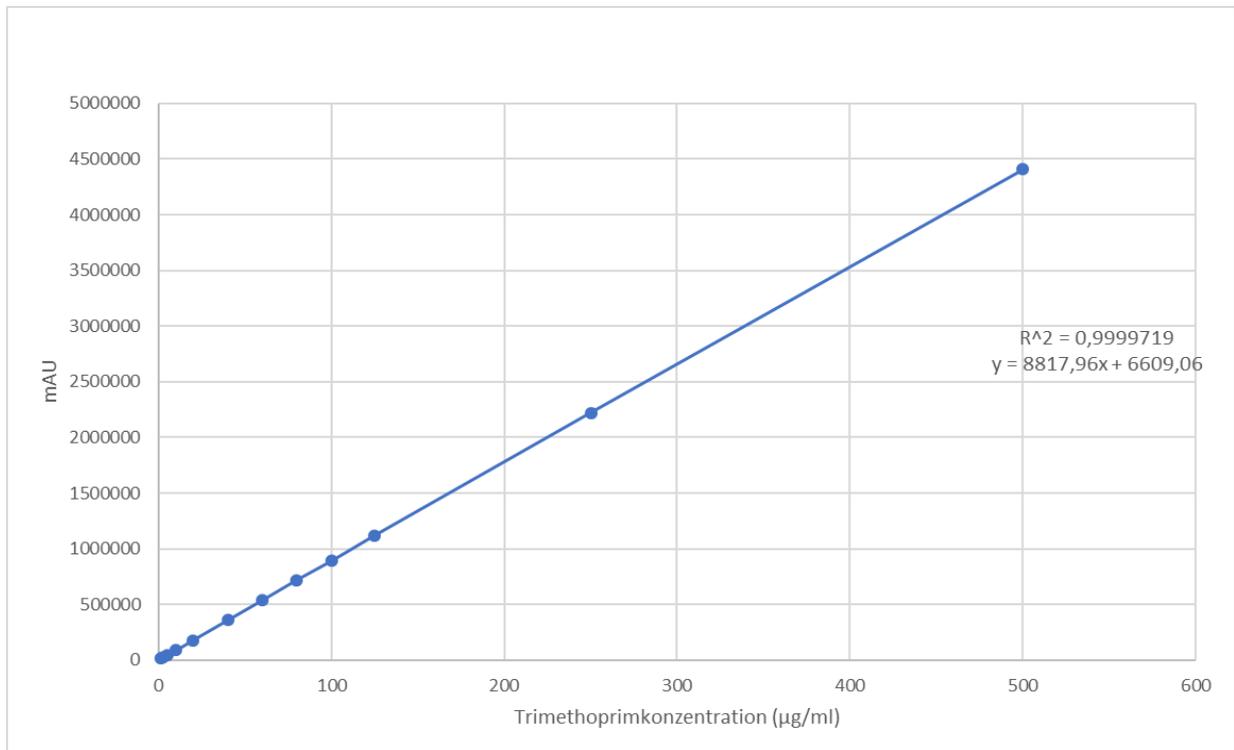


Abbildung 19: Eichgerade zur Quantifizierung von Trimethoprim mittels HPLC. Peakflächen (mAU) als Funktion der Trimethoprimkonzentration (µg/ml).

6.5. Modifikation der Nanopartikeloberfläche mit WGA

6.5.1. Immobilisierung von WGA an der PLGA-Nanopartikel-Oberfläche

Um eine spezifische Bioadhäsion der Nanopartikel an Zuckerstrukturen der Urothelzellen zu ermöglichen, wird die Oberflächen mit WGA funktionalisiert. Das Lektin wird mittels Carbodiimid-Methode kovalent an freie Carboxylgruppen der PLGA-Matrix gebunden.

Dazu werden die in einer HEPES/PLU Suspension gelagerten Nanopartikel bei 14.000 UpM (20817 x g) und 4 °C 15 Minuten zentrifugiert und der Puffer abgehoben. Anschließend werden die Partikel in 0,1 M 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)/HCl-Puffer pH 6 mit 0,5 M NaCl aufgenommen, sodass eine Suspension mit 20 mg Feststoff/ml entsteht. Im nächsten Schritt werden Lösungen von 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDAC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) in demselben Puffer hergestellt, mit der Partikelsuspension vereinigt und 15 Minuten unter Lichtausschluss gerührt, um die freien Carboxylgruppen von PLGA durch Bildung eines semistabilen NHS-Esters zu aktivieren. Die jeweiligen Konzentrationen und Menge pro Eppendorfgefäß sind in Tabelle 5 ersichtlich.

Tabelle 5: Komponenten zur Aktivierung der freien Carboxylgruppen von PLGA.

Bestandteil	Konzentration	Menge pro Eppendorfgefäß
Partikelsuspension	20 mg/ml in MES pH 6	500 µl
EDAC-Lösung	16 mg/ml in MES pH 6	250 µl
NHS-Lösung	24 mg/ml in MES pH 6	250 µl

Im Anschluss wird zweimal mit MES pH 6 und einmal mit 20mM HEPES/NaOH-Puffer pH 8 (HEPES pH 8) gewaschen. Alle Zentrifugationsschritte der WGA-Funktionalisierung der Partikel werden bei 4 °C und 14.000 UpM (20817 x g) 10 Minuten lang durchgeführt. Nach Abheben der letzten Waschflüssigkeit (HEPES pH 8) werden 1000 µl HEPES pH 8 bzw. Lösungen von WGA in HEPES pH 8 in den Konzentrationen 250 µg/ml, 1000 µg/ml oder 3000µg/ml pro Eppendorfgefäß zugesetzt und die Partikel gut resuspendiert. Im Anschluss wird die Suspension zweieinhalb Stunden lang unter Lichtausschluss und bei Raumtemperatur gerührt.

Zur Reinigung wird zentrifugiert, der Überstand abgehoben und das Pellet in 2 ml HEPES pH 8 resuspendiert. Danach werden die Partikel zweimal mit Aqua dest. gewaschen und können dann entweder lyophilisiert oder in einer Suspension in HEPES/PLU gelagert werden.

6.5.2. BCA-Assay zur Quantifizierung von WGA

Die an die Nanopartikel-Oberfläche gebundene Lektinmenge wird mit dem Micro BCA™ Protein Assay von Thermo Scientific bestimmt. Durch Proteine wie WGA wird im Alkalischen Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert, welches mit der Bicinchoninsäure (BCA) unter Bildung eines blauvioletten Komplexes reagiert.

6.5.2.1. Vorbereitung der PLGA-Nanopartikel

Die PLGA-Nanopartikel werden nach der Oberflächenmodifikation mit einer Kryoprotector-Lösung lyophilisiert, die aus 2% Saccharose und 0,1% Pluronic in Aqua dest. Besteht und die Partikelaggregation verhindern soll. Zur Bestimmung der Masse der Partikel nach der Gefriertrocknung ist es notwendig, drei Vergleichsproben der Partikelsuspension desselben Volumens in reinem Aqua dest. zu lyophilisieren, um so auf den Gewichtsanteil der Saccharose rückschließen zu können.

Nun werden 3,0 mg Nanopartikel in 500 μl 1 M NaOH gelöst und eine halbe Stunde gerührt. Anschließend wird mit demselben Volumen an 1 M HCl neutralisiert.

6.5.2.2. Durchführung des BCA-Assay

Pro Messwert werden dreimal jeweils 150 μl Probelösung aus aufgelösten Partikeln in eine 96-wWell-Platte pipettiert und danach werden jeweils 150 μl frisch zubereitetes Arbeitsreagenz zugegeben. Dieses besteht aus 25 Teilen Micro BCA Reagens MA, 24 Teilen Micro BCA Reagens MB und einem Teil Micro BCA Reagens MC, die gut miteinander vermischt werden.

Die 96-Well-Platte wird mit einem sealing tape verschlossen und eine halbe Minute lang im Mikrotiterplattenfluorimeter orbital geschüttelt. Während der darauffolgenden 2-stündigen Inkubation bei 37 °C bildet sich der Farbkomplex, dessen Absorption anschließend bei 562 nm analysiert wird.

6.5.2.3. Erstellung einer Eichgeraden für WGA

Zur Kalibrierung des Micro BCA™ Protein Assay wird eine Verdünnungsreihe erstellt. Ausgehend von einer Stammlösung von 1000 µg/ml WGA in einer äquimolaren Mischung aus 1 M Natronlauge und 1 M Salzsäure werden die nachfolgende Verdünnungen mit demselben Lösungsmittel hergestellt:

1:50	1:400	1:2000
1:100	1:500	1:10000
1:200	1:1000	

Außerdem wird 1:1 Mischung von Natronlauge und Salzsäure mitbestimmt.

Alle Lösungen werden anschließend mit dem frisch bereiteten Arbeitsreagenz versetzt und die Absorption bei 562 nm bestimmt. Jede Probe wird dreimal bestimmt.

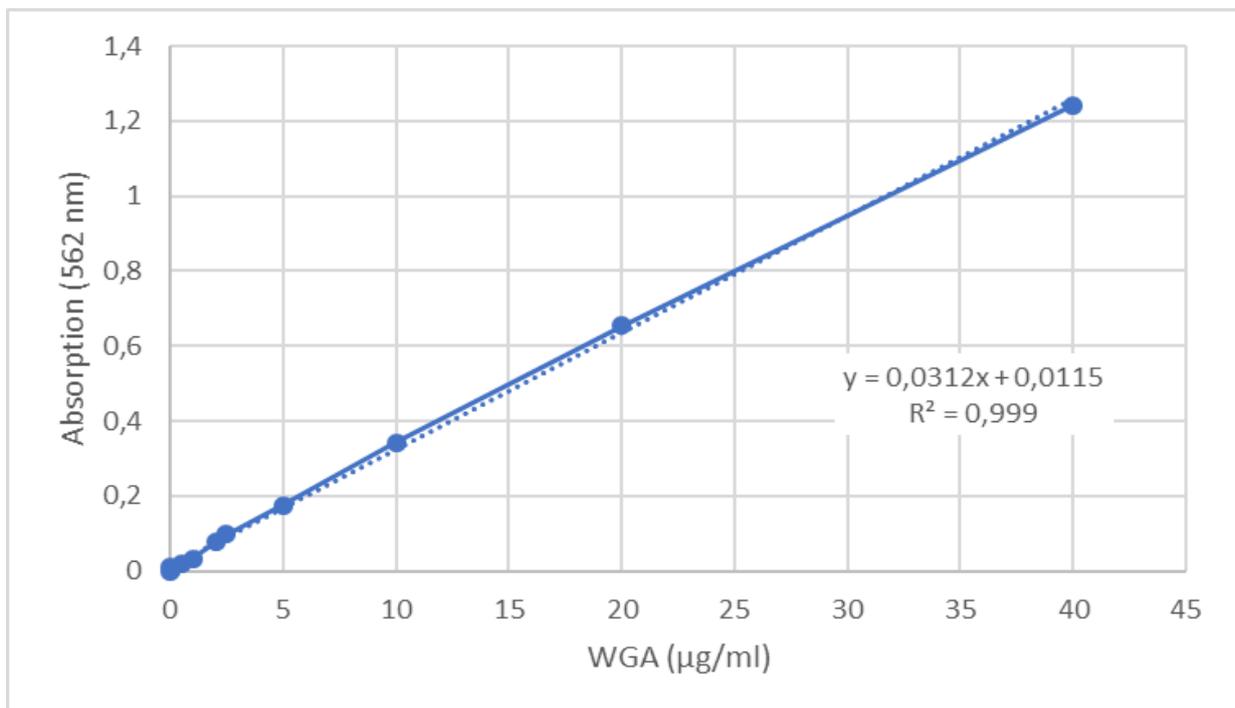


Abbildung 20: Eichgerade von WGA mittels BCA-Assay.

6.6. Zellkultur

Als Modell für gesundes, humanes Blasenepithel wurden SV-HUC-1-Zellen eingesetzt. Diese sind humane, mittels SV-40 Viren immortalisierte Urothelzellen eines gesunden elfjährigen Jungen. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden Zellen der Passagen 75 bis 83 verwendet.

Die Zellen werden bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% feuchtigkeitsgesättigter Luftatmosphäre kultiviert. Beim Arbeiten in der Zellkultur ist durchgehend auf Keimarmut zu achten.

6.6.1. Chemikalien und Medien

- Phosphate-buffered saline mit Ethylendiamintetraessigsäure 0,1% (PBS/EDTA)
- 0,25% (w/v) Trypsin 0,02% (w/v) EDTA•4Na Lösung in „Hanks' Balanced Salt Solution with phenol red“, sterilfiltriert (Trypsin/EDTA)
- Gibco™ Ham's F-12K (Kaighn's) Medium mit Penicillin/Streptomycin (Pen Strep) als Medium

Für die Herstellung des Nährmediums werden 146 mg L-Glutamin in 1000 ml Gibco™ Ham's F-12K Medium gelöst. Anschließend werden 100 ml hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS) und 10 ml Pen Strep zugefügt und homogenisiert. Zur Gewährleistung der Sterilität wird im Anschluss durch eine STERITOP® Filtereinheit filtriert.

6.6.2. Mediumswechsel

Um optimale Wachstumsbedingungen für die Zellen zu ermöglichen muss regelmäßig verbrauchtes Medium durch frisches ersetzt werden. Die Notwendigkeit dafür wird durch den Farbumschlag des im Ham's F-12K Medium enthaltenen pH-Indikators Phenolrot von rot zu gelb angezeigt. Im Rahmen der Kultivierung von SV-HUC-1-Zellen wird das Nährmedium etwa einmal pro Woche gewechselt, allerdings erst nach frühestens 48 Stunden. Dazu wird das Medium vorsichtig abgesaugt und verworfen und anschließend 10 ml frisches, auf 37 °C temperiertes Medium in die Gewebekulturflasche pipettiert.

6.6.3. Subkultivierung von SV-HUC-Zellen

Mit Hilfe eines Lichtmikroskops wird die Konfluenz des Zellrasens in der Gewebekulturflasche überprüft. Bei etwa 80% – 90% Konfluenz können die Zellen passagiert werden. Nach Entfernen des Mediums wird mit 2 ml PBS/EDTA gewaschen, um nicht adhärenente Zellen und Rückstände des Mediums zu entfernen. Zur Ablösung der Zellen vom Boden der Gewebekulturflasche werden 2 ml Trypsin/EDTA zugesetzt und 15 Minuten im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂/ 95% Luftatmosphäre inkubiert. Durch Abklopfen werden die Zellen vom Boden der Gewebekulturflasche auch mechanisch vollständig abgelöst. Es werden 10 ml Nährmedium zugefügt, die Zellen mit der Pipette resuspendiert und bei 1000 U_pM (119,5 x g) 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird abgehoben und das Pellet in 2 ml Nährmedium resuspendiert. In der Gewebekulturflasche werden 10 ml Nährmedium vorgelegt und 1 ml der Zellsuspension eingebracht. Nach der homogenen Verteilung der Zellsuspension erfolgt die weitere Kultivierung 7 bis 10 Tage in einem Brutschrank bei 37 °C unter 5% CO₂/ 95% Luftatmosphäre.

6.6.4. Kultivierung von SV-HUC in 96-Well-Mikrotiterplatten

Für die Bindungsstudien werden die SV-HUC-Zellen in einer 96-well-Mikrotiterplatte bis 90 – 100% Konfluenz kultiviert. 160µL einer Zellsuspension mit 106250 Zellen/ml werden pro well eingebracht und 6 – 7 Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂/ 95% Luftatmosphäre inkubiert.

6.7. Bindungsstudien am Zellmodell

Die Monolayer der SV-HUC-Zellen in der 96-well-Mikrotiterplatte werden vor der Bindungsstudie gewaschen, um verbrauchtes Medium und abgestorbene Zellen als Störfaktoren zu eliminieren. Dazu wird das Medium abgesaugt und 100 µl auf 37°C temperierter Kunstharn zugefügt. Anschließend wird die Mikrotiterplatte 5 Minuten bewegt. Die Flüssigkeit wird abgehoben und durch 100 µl frischen, temperierten Kunstharn ersetzt. Um den Einfluss des Materials der Mikrotiterplatte und den Kunstharn auf die Messwerte auszuschließen, wird die relative Fluoreszenzintensität (RFI) bei einer Excitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionwellenlänge von 525 nm als Leerwert bestimmt.

Untersucht werden WGA-modifizierte Nanopartikel mit unterschiedlichen Belegungsdichte im Vergleich zu Partikeln ohne Lektin. Je Monolayer-well werden 100 µl einer 2 mg/ml Partikelsuspension eingebracht. Ab diesem Arbeitsschritt wird unter Lichtschutz gearbeitet. Während der einstündigen Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂/95% Luftatmosphäre können die Lektine an die Oberfläche der Zellen binden.

Zunächst wird die RFI des Zellrasens samt allen vorhanden Partikeln bestimmt (100%-Wert). Danach werden zwei Quantifizierungswege eingeschlagen: Einerseits wird der Überstand vorsichtig abgehoben und darin die partikuläre Fluoreszenz der ungebundenen Partikel bestimmt. Andererseits wird der Überstand abgehoben und verworfen und die am Monolayer anhaftenden Partikel bestimmt. Dazu werden zunächst 100 µl Kunsturin zugesetzt und danach wird durch Zugabe von 200 µl Acetonitril und 10 - 15 Sekunden Inkubation die Matrix der anhaftenden Partikel und damit der inkorporierte Fluoreszenzfarbstoff gelöst. Um eine Beeinträchtigung der Fluoreszenzbestimmung durch Zellreste oder denaturierte Proteine zu verhindern ist einerseits die Inkubation mit Acetonitril auf wenige Sekunden beschränkt und andererseits wird der in Eppendorfgefäße transferierte Überstand bei 14 000 rpm unter Kühlung auf 4°C 10 Minuten zentrifugiert. 100 µl des Überstands werden in einer anderen 96-well-Mikrotiterplatte am Tecan analysiert.

Die Mikrotiterplatte mit dem SV-HUC-Monolayer wird anschließend insgesamt sechs Waschschritten unterzogen. Nach dem Absaugen der Partikelsuspension bzw. des Kunstharns bei 200 mbar werden 100 µl des auf Körpertemperatur vorgewärmten Kunsturins zugegeben und die Platte 5 Minuten geschüttelt. Im Anschluss wird wieder einerseits die Monolayer-gebundene partikuläre Fluoreszenz und vice versa die im Überstand vorhandene Fluoreszenz von ungebundenen Nanopartikeln wie oben beschrieben quantifiziert.

5.8. Herstellung von Kunsturin

Die Bindungsstudien am Zellmodell werden mit Kunsturin durchgeführt, um ein möglichst realitätsnahes Modell der Blase zu schaffen. Zur Herstellung wurde die Vorschrift des „Artificial urine Siriraj“ nach Chutipongtanate und Thongboonkerd [38] modifiziert. Die Bestandteile des Kunstharns sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Das Calciumchlorid-Dihydrat wird in einem Teil des destillierten Wassers gelöst. Der Harnstoff wird in einer Reibschale verrieben und zusammen mit allen restlichen Bestandteilen (außer Calciumchlorid-Dihydrat) in dem verbleibenden Wasser unter vorsichtigem Erwärmen vollständig gelöst. Die Calciumchlorid-Dihydrat Lösung wird als letzte Komponente beigemischt.

Der pH-Wert wird mit 0,1 N NaOH bzw. 0,1 N HCL eingestellt. Zu beachten ist allerdings, dass der Kunsturin nur bis zum einem pH-Wert von 7 stabil ist, da im Alkalischen Bestandteile ausfallen können.

Zur Erhöhung der Lagerstabilität kann der fertige Kunstharn durch eine STERITOP® Filtereinheit filtriert werden, wodurch er unter Kühlung bis zu etwa 10 Tagen haltbar ist.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Kunstharns "Artificial urine Siriraj".

Inhaltsstoff	Masse pro Liter Aqua dest.
Ammoniumchlorid	805 mg
Calciumchlorid-Dihydrat	445 mg
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	69 mg
Dinatriumoxalat	15 mg
Harnsäure	67,244 mg
Harnstoff	12,135 g
Kaliumchlorid	2,25 g
Kreatinin	450 mg
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	500 mg
Natriumchlorid	3,17 g
Natriumcitrat	1,485 g
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	500 mg
Natriumhydrogencarbonat	170 mg
Natriumsulfat	1,29 g

7. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
0,1% Ameisensäure	0,1% (v/v) Ameisensäure in Aqua dest.
ACN	Acetonitril
AU 5	Kunsturin pH 5 (nach "artificial urine Siriraj")
AU 7	Kunsturin pH 5 (nach "artificial urine Siriraj")
BodiPy	4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen
XenoLight DiR	1,1'-dioctadecyltetramethyl indotricarbocyanin Jodid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDAC	1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid
F12K	Gibco™ Ham's F12K (Kaighn's) Medium
FA/ACN	0,1% (v/v) Ameisensäure in Acetonitril
FA/ H ₂ O	0,1% (v/v) Ameisensäure in partikelfreiem Aqua dest.
FCS	Fetales Kälberserum
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
HEPES/PLU	20 mM HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 mit 0,1 % (w/v) Pluronic (HEPES/PLU7)
HEPES pH 8	20 mM HEPES/NaOH-Puffer pH 8
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie, High Performance Liquid Chromatography
KH	Kunstharn
MES pH 6	0,1 M 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)/HCl Puffer pH 6 mit 0,5 M NaCl
NHS	N-Hydroxysuccinimid
PBS/EDTA	Phosphate-bufferedsaline mit 0,1% (v/v) Ethylendiamintetraessigsäure
PBS	25,93 KH ₂ PO ₄ mM /40,73 Na ₂ HPO ₄ mM in Aqua dest.
PDI	Polydispersitätsindex
Pen Strep	Penicillin/Streptomycin
PLGA	Poly(lactid-co-glycolid)
RFI	Relative Fluoreszenzintensität
SV-HUC	Simian Virus 40-transformed Human Urothelial Cells
TMP	Trimethoprim

Trypsin/EDTA	0,25% (w/v) Trypsin 0,02% (w/v) EDTA•4Na Lösung in „Hanks' Balanced Salt Solution with phenol red“, sterilfiltriert
UPEC	Uropathogene Escherichia coli
WGA	Weizenkeimlektin, wheat germ agglutinin

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Größenverteilung der PLGA-Nanopartikel nach 10- minütiger Zentrifugation bei 5220 x g und 4°C.....	12
Abbildung 2: Größenverteilung der PLGA-Nanopartikel nach 10- minütiger Zentrifugation bei 23446 x g und 4°C.....	13
Abbildung 3: Größenverteilung der PLGA-Nanopartikel nach halbstündiger Zentrifugation bei 38759 x g und 4°C.....	13
Abbildung 4: Größenverteilung der PLGA-Nanopartikel nach 15-minütiger Zentrifugation bei 23000 x g und 4°C.....	14
Abbildung 5: Größenverteilung der Nanopartikel nach Lyophilisation in reinem Aqua dest..	15
Abbildung 6: Größenverteilung der Nanopartikel nach Lyophilisation mit Kryoprotector-Zusatz.....	16
Abbildung 7: Größenverteilung der Nanopartikel nach Lagerung in Suspension.....	16
Abbildung 8: Größenverteilung der Nanopartikel nach Zentrifugation (5520 x g, 1 min).....	17
Abbildung 9: Größenverteilung der Nanopartikel nach Filtration (1 µm Porenweiten).....	17
Abbildung 10: Freisetzung von BodiPy aus den PLGA-Nanopartikeln der Charge NTB 0,10 bei Lagerung in Kunstharz pH 5 und Kunstharz pH 7.....	19
Abbildung 11: Freisetzung von BodiPy aus den PLGA-Nanopartikeln der Chargen NTB 0,10 und NTB 0,87 bei Lagerung in Kunstharz pH 5 und Kunstharz pH 7.	19
Abbildung 12: Abhängigkeit des Zeta-potentials von der Menge der Beladung der Partikel mit Weizenkeimlektin (WGA).	21
Abbildung 13: Absolute RFI-Werte der Bindungsrate von BodiPy-markierten Nanopartikeln mit steigender WGA-Beladung in Kunsturin pH 5 an SV-HUC-Monolayern. Fluorimetrische Analyse der anhaftenden Nanopartikel nach Inkubation bzw. nach 2, 4 und 6 Waschschritten in Lösung (BodiPy, Exzitationswellenlänge: 485 nm, Emissionswellenlänge: 525 nm).	24
Abbildung 14: RFI in Relation zum 100%-Wert nach der Inkubation. Bindungsrate von BodiPy-markierten Nanopartikeln mit steigender WGA-Beladung in Kunsturin pH 5 an SV-HUC-Monolayern. Fluorimetrische Analyse der anhaftenden Nanopartikel nach Inkubation bzw. nach 2, 4 und 6 Waschschritten in Lösung (BodiPy, Exzitationswellenlänge: 485 nm, Emissionswellenlänge: 525 nm).	24
Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von BodiPy-markierten PLGA-Nanopartikeln auf einem SV-HUC-Monolayer nach der Inkubation.... Fehler! Textmarke nicht definiert.	
Abbildung 16: Absolute RFI-Werte der Bindungsrate von BodiPy-markierten Nanopartikeln mit steigender WGA-Beladung in Kunsturin pH 7 an SV-HUC-Monolayern. Fluorimetrische Analyse der anhaftenden Nanopartikel nach Inkubation bzw. nach 2, 4 und 6 Waschschritten in Lösung (BodiPy, Exzitationswellenlänge: 485 nm, Emissionswellenlänge: 525 nm).	26
Abbildung 17: RFI in Relation zum 100%-Wert nach der Inkubation. Bindungsrate von BodiPy-markierten Nanopartikeln mit steigender WGA-Beladung in Kunsturin pH 5 an SV-HUC-	

Monolayern. Fluorimetrische Analyse der anhaftenden Nanopartikel nach Inkubation bzw. nach 2, 4 und 6 Waschschr	27
Abbildung 18: Absolute RFI-Werte der Bindungsrate von BodiPy-markierten Nanopartikeln mit steigender WGA-Beladung bei einer Inkubation in Kunsturin pH 5 und anschließendem Waschen mit Kunsturin pH 7 an SV-HUC-Monolayern. Fluorimetrische Analyse der anhaftenden Nanopartikel nach Inkubation bzw. nach 2, 4 und 6 Waschschr	28
Abbildung 19: RFI in Relation zum 100%-Wert nach der Inkubation. Bindungsrate von BodiPy-markierten Nanopartikeln mit steigender WGA-Beladung bei einer Inkubation in Kunsturin pH 5 und anschließendem Waschen mit Kunsturin pH 7 an SV-HUC-Monolayern. Fluorimetrische Analyse der anhaftenden Nanopartikel nach Inkubation bzw. nach 2, 4 und 6 Waschschr	29
Abbildung 20: Eichgerade zur Quantifizierung von Trimethoprim mittels HPLC. Peakflächen (mAU) als Funktion der Trimethoprimkonzentration ($\mu\text{g/ml}$).	40
Abbildung 21: Eichgerade von WGA mittels BCA-Assay.	43

9. Literaturverzeichnis

1. McLellan, L.K., Hunstad, D.A.: Urinary Tract Infection: Pathogenesis and Outlook. *Trends in molecular medicine* **22**(11), 946–957 (2016). doi: 10.1016/j.molmed.2016.09.003
2. Ursus-Nikolaus Riede, H.-E.s.: *Allgemeine und spezielle Pathologie*, 4th edn. Georg Thieme Verlag Stuttgart (1995)
3. Flores-Mireles, A., Hreha, T.N., Hunstad, D.A.: Pathophysiology, Treatment, and Prevention of Catheter-Associated Urinary Tract Infection. *Topics in Spinal Cord Injury Rehabilitation* **25**(3), 228–240 (2019). doi: 10.1310/sci2503-228
4. Foxman, B.: Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Disease-a-month : DM* **49**(2) (2003). doi: 10.1067/mda.2003.7
5. Flores-Mireles, A.L., Walker, J.N., Caparon, M., Hultgren, S.J.: Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature reviews. Microbiology* **13**(5), 269–284 (2015). doi: 10.1038/nrmicro3432
6. Hahn, H., Vogt, K.: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Mit 155 Tabellen, 5th edn. Springer-Lehrbuch. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg (2005)
7. A. Miernik, Harnwegsinfektionen, Pschyrembel Online. (n.d.). <https://www.pschyrembel.de/Harnwegsinfektion> (2021).
8. Schmiemann, G., Kniehl, E., Gebhardt, K., Matejczyk, M.M., Hummers-Pradier, E.: The diagnosis of urinary tract infection: a systematic review. *Deutsches Arzteblatt international*, 361–367 (2010). doi: 10.3238/arztebl.2010.0361
9. Yamamoto, S., Tsukamoto, T., Terai, A., Kurazono, H., Takeda, Y., Yoshida, O.: Genetic evidence supporting the fecal-perineal-urethral hypothesis in cystitis caused by *Escherichia coli*. *The Journal of urology* **157**(3), 1127–1129 (1997)
10. Dhakal, B.K., Kulesus, R.R., Mulvey, M.A.: Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*. *European journal of clinical investigation* **38 Suppl 2**, 2–11 (2008). doi: 10.1111/j.1365-2362.2008.01986.x
11. Schilling, J.D., Mulvey, M.A., Hultgren, S.J.: Structure and Function of *Escherichia coli* Type 1 Pili: New Insight into the Pathogenesis of Urinary Tract Infections. *J Infect Dis* **183**(Supplement_1), S36-S40 (2001). doi: 10.1086/318855
12. Jorgensen, I., Seed, P.C.: How to make it in the urinary tract: a tutorial by *Escherichia coli*. *PLoS pathogens* **8**(10), e1002907 (2012). doi: 10.1371/journal.ppat.1002907
13. Bonkat, G., Pickard, R., Bartoletti, R., Cai, T., Bruye re, F., Geerlings, S.E., Ko ves, B., Wagenlehner, F., 2018. EAU Guidelines on Urological Infections 2018, in: *European Association of Urology Guidelines. 2018 Edition*. European Association of Urology 52 Guidelines Office, Arnhem, The Netherlands.
14. Kang, C.-I., Kim, J., Park, D.W., Kim, B.-N., Ha, U.-S., Lee, S.-J., Yeo, J.K., Min, S.K., Lee, H., Wie, S.-H.: Clinical Practice Guidelines for the Antibiotic Treatment of Community-Acquired Urinary Tract Infections. *Infection & Chemotherapy* **50**(1), 67–100 (2018). doi: 10.3947/ic.2018.50.1.67

15. Steinhilber, D., Schubert-Zsilavec, M., Roth, H.J.: *Medizinische Chemie. Targets - Arzneistoffe - chemische Biologie*, 2nd edn. Deutscher Apotheker-Verlag, Stuttgart (2010)
16. Amelia Pietropaolo, Patrick Jones, Mike Moors, Brian Birch, Bhaskar K. Somani: Use and Effectiveness of Antimicrobial Intravesical Treatment for Prophylaxis and Treatment of Recurrent Urinary Tract Infections (UTIs): a Systematic Review. *Curr Urol Rep* **19**(10), 1–7 (2018). doi: 10.1007/s11934-018-0834-8
17. GuhaSarkar, S., Banerjee, R.: Intravesical drug delivery: Challenges, current status, opportunities and novel strategies. *Journal of Controlled Release* **148**(2), 147–159 (2010). doi: 10.1016/j.jconrel.2010.08.031
18. Langguth P., Fricker G., Wunderli-Allenspach H.: *Biopharmazie*. Wiley.VCH Verlag GmbH & Co.KGaA
19. Lukas Neutsch, Britta Eggenreich, Ela Herwig, Martina Marchetti-Deschmann, Günter Allmaier, Franz Gabor, Michael Wirth: Biomimetic Delivery Strategies at the Urothelium: Targeted Cytoinvasion in Bladder Cancer Cells via Lectin Bioconjugates. *Pharm Res* **31**(3), 819–832 (2014). doi: 10.1007/s11095-013-1204-3
20. Neutsch, L., Wambacher, M., Wirth, E.-M., Spijker, S., Kählig, H., Wirth, M., Gabor, F.: UPEC biomimicry at the urothelial barrier: Lectin-functionalized PLGA microparticles for improved intravesical chemotherapy. *International Journal of Pharmaceutics* **450**(1), 163–176 (2013). doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.04.058
21. Neutsch, L., Plattner, V.E., Polster-Wildhofen, S., Zidar, A., Chott, A., Borchard, G., Zechner, O., Gabor, F., Wirth, M.: Lectin mediated biorecognition as a novel strategy for targeted delivery to bladder cancer. *The Journal of urology*, 1481–1488 (2011). doi: 10.1016/j.juro.2011.05.040
22. O'Brien, V.P., Hannan, T.J., Schaeffer, A.J., Hultgren, S.J.: Are you experienced? Understanding bladder innate immunity in the context of recurrent urinary tract infection. *Current opinion in infectious diseases* **28**(1), 97–105 (2015). doi: 10.1097/QCO.0000000000000130
23. Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M.F., Di Ilio, C.: *Escherichia coli* in Europe: an overview. *International journal of environmental research and public health* **10**(12), 6235–6254 (2013). doi: 10.3390/ijerph10126235
24. Klingenberg, A., Noll, I., Willrich, N., Feig, M., Emrich, D., Zill, E., Krenz-Weinreich, A., Kalka-Moll, W., Oberdorfer, K., Schmiemann, G., Eckmanns, T.: Antibiotic-Resistant *E. coli* in Uncomplicated Community-Acquired Urinary Tract Infection. *Deutsches Arzteblatt international* **115**(29-30), 494–500 (2018). doi: 10.3238/arztebl.2018.0494
25. Koch-Institut, R.: ARS - Antibiotika Resistenz Surveillance <https://ars.rki.de/Content/Database/ResistanceOverview.aspx> (Access 24.05.2021)
26. Pichl, C.M., Feilhauer, S., Schwaigerlehner, R.-M., Gabor, F., Wirth, M., Neutsch, L.: Glycan-mediated uptake in urothelial primary cells: Perspectives for improved intravesical drug delivery in urinary tract infections. *International Journal of Pharmaceutics* **495**(2), 710–718 (2015). doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.09.017
27. Gao, X., Tao, W., Lu, W., Zhang, Q., Zhang, Y., Jiang, X., Fu, S.: Lectin-conjugated PEG-PLA nanoparticles: preparation and brain delivery after intranasal administration. *Biomaterials* **27**(18) (2006). doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.038

28. Jacobs, C., Kayser, O., Müller, R.H.: Nanosuspensions as a new approach for the formulation for the poorly soluble drug tarazepide. *International Journal of Pharmaceutics* **196**(2), 161–164 (2000). doi: 10.1016/S0378-5173(99)00412-3
29. Bhakay, A., Rahman, M., Dave, R.N., Bilgili, E.: Bioavailability Enhancement of Poorly Water-Soluble Drugs via Nanocomposites: Formulation–Processing Aspects and Challenges. *Pharmaceutics* **10**(3) (2018). doi: 10.3390/pharmaceutics10030086
30. Zhang, X., Guan, J., Ni, R., Li, L.C., Mao, S.: Preparation and solidification of redispersible nanosuspensions. *Journal of pharmaceutical sciences* **103**(7), 2166–2176 (2014). doi: 10.1002/jps.24015
31. Jain, R.A.: The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* **21**(23), 2475–2490 (2000). doi: 10.1016/S0142-9612(00)00115-0
32. Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J.M., Coco, R., Le Breton, A., Préat, V.: PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release* **161**(2), 505–522 (2012). doi: 10.1016/j.jconrel.2012.01.043
33. Makadia, H.K., Siegel, S.J.: Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers* **3**(3), 1377–1397 (2011). doi: 10.3390/polym3031377
34. Conrad, P.B., Pablo, J.J. de: Computer Simulation of the Cryoprotectant Disaccharide α,α -Trehalose in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. A* **103**(20), 4049–4055 (1999). doi: 10.1021/jp984102b
35. Joseph, E., Singhvi, G.: Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: a potential nanocarrier. In: Grumezescu, A.M. (ed.) *Nanomaterials for drug delivery and therapy*, pp. 91–116. William Andrew, Norwich (2019)
36. Clayton, K.N., Salameh, J.W., Wereley, S.T., Kinzer-Ursem, T.L.: Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry. *Biomicrofluidics* **10**(5), 54107 (2016). doi: 10.1063/1.4962992
37. Nall: Healthline: Urine pH Level Test: Purpose, Procedure & Side Effects <https://www.healthline.com/health/urine-ph> (Access 03.06.2021)
38. Chutipongtanate, S., Thongboonkerd, V.: Systematic comparisons of artificial urine formulas for in vitro cellular study. *Analytical biochemistry* **402**(1), 110–112 (2010). doi: 10.1016/j.ab.2010.03.031