



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Wirkstofftransport an der urothelialen Oberfläche:
Freisetzung, Membrantransfer und zelluläre Aufnahme
von lipophilen Stearoyl-Prodrugs aus biorekognitiv
modifizierbaren PLGA-Mikropartikeln“

verfasst von / submitted by

Sylvia Maria Spijker

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2016 / Vienna, 2016

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. Michael Wirth

Danksagung

Ich möchte mich recht herzlich bei a.o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth, sowie bei a.o.Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor für den Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten bedanken.

Weiters gilt mein Dank Mag. Dr. Lukas Neutsch für die Betreuung während der gesamten Arbeit an diesem Projekt.

Bedanken möchte ich mich auch bei Mag. Dr. Clara Pichl für ihre Unterstützung und Hilfe bei der praktischen Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt meiner Mama, meiner Oma und Georg, die immer für mich da sind.

Zu guter Letzt gilt mein Dank allen Freunden und Studienkollegen, sie haben die letzten Jahre unvergesslich gemacht.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
Problemstellung und Zielsetzung	10
Grundlagen	11
1. Harnblase (lat. Vesica urinaria)	11
1.1. Anatomie	11
1.2. Histologie	11
1.3. Glykokalyx der Blasenwand	12
1.4. Physiologie	13
2. Harnblasenkarzinom	13
2.1. Ätiologie und Epidemiologie	13
2.2. Einteilung und Klassifikation.....	14
2.3. Symptomatik und Diagnostik.....	14
2.4. Therapie	15
3. Gemcitabin	16
3.1. Pharmakologie	16
3.2. Gemcitabin-Prodrug	17
4. Drug Targeting	17
4.1. Methoden des Drug Targetings	17
4.2. Drug Targeting in der Harnblase	18
4.2.1. Trägersysteme	18
4.2.2. Physikalisches und chemisches Targeting	20
4.3. Lektine	21
Materialien und Grundlegende Methoden	22
5. Chemikalien	22
6. Puffer und Freisetzungsmedien.....	22
7. Zellkultur.....	23
8. Analysenmethoden.....	24
8.1. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	24
8.2. Methoden der Fluoreszenzmessung	26
8.3. Mastersizer	26
9. Grundlegende Techniken	26
9.1. „Waschen“	26

9.2.	Mikropartikelherstellung mittels Solvent Evaporation [32].....	26
9.3.	Kopplung von Lektinen an die Oberfläche der PLGA-Mikropartikel[33].....	27
Spezielle Methoden, Ergebnisse und Diskussion		29
10.	4-(N)-Stearoyl-Gemcitabin-Prodrug	29
10.1.	Derivatisierung des Gemcitabin-HCl und Optimierung der Synthese.....	29
10.1.1.	Methode der Derivatisierung nach Immordino et al [34].....	29
10.1.2.	Optimierung der Synthese von Gem-C18.....	30
10.1.3.	Ergebnisse und Diskussion	32
10.2.	Bindung von modifizierten PLGA-Mikropartikeln an Blasenellen	32
10.2.1.	Bindung von WGA-, HSA- und nicht-modifizierten PLGA-Mikropartikeln mit Gem-C18 und Bodipy [®] an Blasenellen.....	33
10.2.2.	Bindung von WGA-, HSA-, oder nicht-modifizierten PLGA-Mikropartikeln an Blasenellen nach Zuckerinhibition unter Flussbedingungen.....	35
10.2.3.	Ergebnisse und Diskussion	36
10.3.	Untersuchung der Freisetzung von mikroverkapseltem Gem-C18.....	42
10.3.1.	Voruntersuchungen	42
10.3.1.1.	Analyse des Freisetzungsmittels mittels HPLC	42
10.3.1.2.	Freisetzungsmittels mit 10 % Dimethylsulfoxid	42
10.3.2.	Untersuchung der Freisetzung in verschiedenen Freisetzungsmitteln	43
10.3.3.	Untersuchung der Freisetzung mittels Dialyseschlauch	44
10.3.4.	Ergebnisse und Diskussion	45
11.	5-N-(Oktadecanoyl)aminofluorescein	47
11.1.	Voruntersuchungen mit Fluo-C18	48
11.1.1.	Löslichkeit von Fluo-C18	48
11.1.2.	Verdünnungsreihen zur Ermittlung des linearen Messbereichs in HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 für die Untersuchung an Zellen	49
11.1.2.1.	Ergebnisse und Diskussion	51
11.1.3.	Untersuchung der Freisetzung von Fluo-C18 aus PLGA-Mikropartikeln.....	53
11.1.3.3.	Untersuchung der Freisetzung mittels Dialysemembran	55
11.2.	Zelluläre Aufnahme von Fluo-C18 aus PLGA-Mikropartikeln in Blasenellen	58
11.2.1.	Vergleich der zellulären Aufnahme von Fluo-C18 in die Zelle mittels direktem Kontakt mit Fluo-C18-Mikropartikeln und indirekten Kontakt durch deren Überstände	58
11.2.2.	Vergleich zellulären Aufnahme von Fluo-C18 in die Zelle mittels direktem	

Kontakt mit Fluo-C18-Mikropartikeln und indirekten Kontakt mit Hilfe von Abstandshaltern	59
11.2.3. Vergleich Aufnahme von Fluo-C18 in die Zelle mittels direktem Kontakt mit Fluo-C18-Mikropartikeln und indirekten Kontakt unter Zuhilfenahme einer Dialysemembran	61
11.2.4. Ergebnisse und Diskussion	62
12. PLGA-Mikropartikel mit Gem-C18 und Fluo-C18	68
12.1. Untersuchung der Freisetzung von Gem-C18 und Fluo-C18 aus PLGA-Mikropartikeln.....	68
12.2. Ergebnisse und Diskussion	70
13. Bestimmung der Größe der PLGA-Mikropartikel	72
13.1. Bestimmung der Größe von PLGA-Mikropartikel mittels Mastersizer.....	72
13.2. Mikroskopische Bestimmung	72
13.3. Ergebnisse und Diskussion	72
Zusammenfassung	74
Literaturverzeichnis	77
Curriculum vitae	81

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
Å	Angström
Alexa-WGA	Alexa 594-konjugiertes Wheat germ agglutinin
AU	Artificial Urine Siraja
AUM	asymmetrical unit membrane
BCG	Bacille-Calmette-Guérin
CT	Computertomographie
DAPI	4 ,6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDAC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMDA	Elektro-Motive-Drug-Administration
engl.	Englisch
EPR-Effekt	enhanced permeability and retention effect
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
ex/em	Exzitation / Emission
FCS	Fetales Kälberserum
FIU	Fluoreszenz Intensitäts Einheit, Fluorescence Intensity Units
Fluo-C18	5-N-(Oktadecanoyl)aminofluorescein
Gem-C18	4-(N)-Stearoyl-Gemcitabin-Prodrug
Gemcitabin	D-Desoxy-2,2-difluorocytidin
HCl	Salzsäure
hCNT	human sodium-gradient-coupled nucleosid transporter
hENT	human equilibrative nucleosid transporter
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, high performance liquid chromatography
HSA	Humanes Serum Albumin
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
lat.	lateinisch
M	Molar
MeOH	Methanol
Mg/Ca	Kalzium und Magnesium
min	Minuten
ml	Milliliter
mmol	Millimol
MRT	Magnetresonanztomographie
MVAC	Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin, Cisplatin
NaOH	Natronlauge
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
NMP	nukleares Matrixprotein
NMR	Kernresonanzspektroskopie
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, phosphate buffered saline
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid)
pTis	Carcinoma in situ
RNA	Ribonucleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Natriumlaurylsulfat
sek	Sekunden
std	Stunden
TBA	Tributylamin
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
TNM-System	Classification of Malignant Tumors, gemäß WHO 2004
U/min	Umdrehungen pro Minute
UP	Uroplakine
WGA	Wheat germ agglutinin
Z/ml	Zellen pro Milliliter

Problemstellung und Zielsetzung

Das Harnblasenkarzinom zählt zu den zehn häufigsten Karzinomen des Mannes und der Frau. Dabei stellt vor allem die hohe Rezidivrate von 70 Prozent, die meist mit einer Progression einhergeht, ein Problem dar [1]. Bei diesem Karzinom unterscheidet man zwischen dem muskelinvasiven Karzinom (pT2-, pT3- und pT4-Stadium nach dem TNM-System), das durch Zystektomie behandelt wird, und dem nicht muskelinvasiven Karzinom (pTa-, pT1- und pTis-Stadium nach dem TNM-System), das mittels einer transurethralen Resektion mit anschließender Zytostatika-Therapie behandelt wird [1, 2, 3]. Die Schwierigkeiten bei der intravesikalen Therapie beruhen einerseits auf dem mehrschichtigen Urothel, das als Schutzschicht von harnpflchtigen Substanzen dient und somit auch für Arzneistoffe schwer zu durchdringen ist. Andererseits ist das Zeitintervall, in dem der Arzneistoff in der Blase verweilt, aus Gründen der Compliance, auf einen maximalen Rahmen von einer Stunde begrenzt [4].

Im Zentrum dieser Arbeit steht die postoperative Zytostatikatherapie des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms. Dazu wird ein innovativer Ansatz zur Verbesserung der derzeitigen Therapie überprüft, insbesondere werden die folgenden Kernfragen behandelt:

Erstens: Ist eine verstärkte Bindung eines Arzneistoffträgers an die Blasenwand mit Hilfe von Lektinen möglich [5]? Die damit einhergehende längere Verweildauer am pathologischen Gewebe sollte die Bioverfügbarkeit erhöhen und die Dauer der intravesikalen Arzneistoffapplikation senken.

Zweitens: Stellt eine Mikroverkapselung des Arzneistoffes einen Vorteil dar? Damit könnten größere Mengen Wirkstoff innerhalb eines Partikels direkt an das pathologische Gewebe gebracht werden, sodass die Wirkstoffkonzentration am Zielgewebe erhöht ist. Dies sollte wiederum die Gesamtresorptionsrate steigern.

Drittens: Ist die Freisetzung eines lipophilen Arzneistoffes aus der Partikelmatrix innerhalb der Zelle oder in Kontakt zur Zellmembran möglich? Ohne die Freisetzung wäre keine Wirkung zu erwarten.

Die Klärung dieser drei Kernpunkte könnte einen vielversprechenden Weg eröffnen in Hinsicht auf die Effektivitätssteigerung der Therapie, sowie zur Reduktion der Rezidivrate und der Progression.

Grundlagen

1. Harnblase (lat. Vesica urinaria)

„Die Harnblase ist ein muskulöses Hohlorgan, das den Harn sammelt und durch die Harnröhre entleert“ [8].

1.1. Anatomie

Die Harnblase liegt im kleinen Becken und wird ventral durch das Schambein, dorsal durch das Rektum beim Mann bzw. durch die Vagina bei der Frau und lateral durch den Beckenboden begrenzt. Die anatomische Feineinteilung erfolgt in Blasengrund (lat. Fundus), Blasenkörper (lat. Corpus vesicae), Blasenscheitel (lat. Vertex) und Blasen Hals (lat. Cervix). Im Fundus befindet sich das dreieckige Trigonum vesicae, an dessen äußeren oberen Enden die paarigen Harnleiter (lat. Ureteren) in die Blase einmünden. Am Blasen Hals beginnt die Harnröhre (lat. Urethra), welche im Bereich des Beckenbodens durch die inneren und äußeren Schließmuskeln (lat. Sphincter internus et externus) umgeben wird [8].

1.2. Histologie

Die Wand der Harnblase besteht aus der Schleimschicht (lat. Tunica mucosa), der Muskelschicht (lat. Tunica muscularis) und der äußeren Bindegewebsschicht (lat. Tunica adventitia).

Die Schleimschicht wird weiter in das Urothel und das subepitheliale Bindegewebe (lat. Tunica propria) eingeteilt. Das Urothel besteht aus drei Zellschichten, den Deckzellen (engl. umbrella cells), den Intermediärzellen und den Basalzellen, welche sich alle drei bis sechs Monate komplett erneuern. Bei Beschädigung des Urothels kann es sich schnell regenerieren und seinen Schutzmechanismus rasch wieder herstellen. Die Basalzellen bestehen aus einer Schicht kleiner (10 µm) kubischer Zellen, welche direkt auf der Tunica propria aufliegen. Auf den Basalzellen liegen die Intermediärzellen, diese birnenförmigen Zellen (10 bis 25 µm) bilden mehrere Schichten. Deckzellen haben eine polygonale Form. Sie sind die größten Epithelzellen des menschlichen Körpers (25 bis 250 µm) und vergrößern ihre Oberfläche bei Dehnung. Durch Tight-Junctions werden die Deckzellen in einen basolateralen und einen verdickten apikalen Abschnitt unterteilt. Der apikale Bereich besteht zu 70 bis 90 Prozent (%) aus einer einzigartigen Lipid- und Proteinstruktur, die als asymmetrical unit membrane (AUM) bezeichnet wird und primär von Uroplakin-Plaques gebildet wird. Diese Plaques bestehen aus paarweise angeordneten Uroplakinen (UPIa mit UPIb, UPII mit UPIII),

die Schutz gegen sauren, hypertonen Harn, pathogene Substanzen, Infektionen und Irritationen bieten [8, 9, 10].

Die glatte netzartige Muskelschicht wird in den Detrusormuskel (lat. Musculus detrusor vesicae) und die Trigonalmuskeln (lat. Musculi. trigoni vesicae) eingeteilt. Der Detrusormuskel ist für die Entleerung der Harnblase verantwortlich. Die Trigonalmuskeln verankern die Harnröhre an der Wand der Blase. Über eine Muskelschlinge kommt es zum unwillkürlichen Verschluss der Harnblase bis zum Zeitpunkt der Miktion [8].

Die Bindegewebsschicht stellt die Verbindung zur Umgebung her. Sie besteht aus Bindegewebe mit Kollagen und Elastin, Blutgefäßen und Nerven. Das Nervengeflecht (lat. Plexus vesicalis) aktiviert über den Sympathikus den Schließmuskel, desweiteren wird über den Parasympathikus die Blasenentleerung (lat. Miktion) eingeleitet [8].

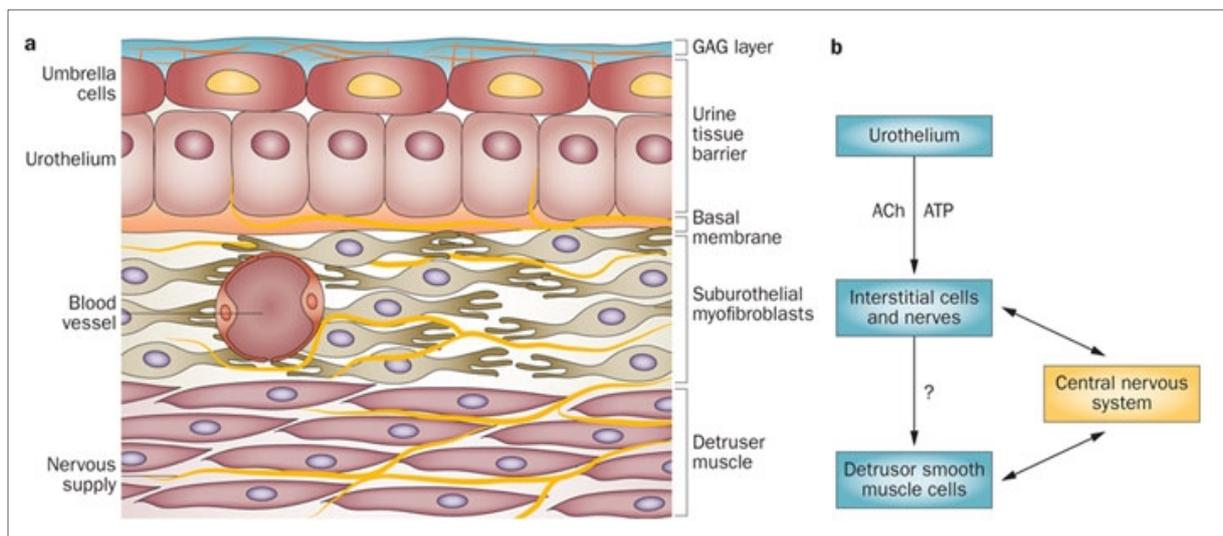


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Blasenwand [11]

1.3. Glykokalyx der Blasenwand

Die Glykokalyx (lat. calyx, Kelch) ist die extrazelluläre Schicht der Zelle [12], welche aus Glykolipiden und Glykoproteinen (Glykosaminoglykane und Proteoglykane) besteht [13]. Diese bilden eine zellspezifische Oberfläche, die z.B. für die Interaktionen mit den Zellen bestimmter Proteine verantwortlich ist [12].

Die Glykosaminoglykane sind Polysaccharide, welche aus linearen Disacchariden aufgebaut sind. Diese sind für wichtige biologische Funktionen wie die Undurchlässigkeit und den antibakteriellen Effekt des Urothels, sowie die Interaktion mit Proteinen verantwortlich. Durch die negativen Carboxyl- und Sulfat-Reste werden Kationen angezogen, welche wiederum Wassermoleküle mit sich ziehen und somit die Glykokalyx hydrophilisieren [13]. Sie werden nach Struktur und Funktion in vier Familien eingeteilt: Heparin- und

Heparansulfate (-D-N-Acetylglucosamin-6-Sulfat, -D-2-Sulfaminoglycose-6-Sulfat), Chondroitin- (β-D-N-Acetylgalactosamin-4-Sulfat) und Dermatansulfate (β-D-N-Acetylgalactosamin-4-Sulfat), Hyaluronate (β-D-N-Acetyl-glucosamin) und Keratansulfate (β-D-N-Acetyl-glucosamin-6-Sulfat) [13]. Die Proteoglykane sind Oligosaccharide, die hauptsächlich für Wachstum, Differenzierung und Erhalt des Epithels, sowie zelluläre-mesenchymale Interaktionen verantwortlich sind [13]. Durch kanzerogene Erkrankungen ändert sich die Zusammensetzung und Verteilung der Glykoproteine in der Glykokalyx. Unter anderem verringert sich die Anzahl der Hyaluronate und der Dermatansulfate, die Chondroitin- und die Heparansulfate kommen vermehrt vor [14].

1.4. Physiologie

Die Harnblase stellt das Reservoir für den von der Niere produzierten Harn dar. Ihr maximales Fassungsvermögen beträgt bis zu zwei Liter, jedoch wird bereits ab einem Füllungszustand von 250 – 400 ml das Gefühl des Harndrangs bemerkbar [9, 15].

Die Miktion wird willkürlich ausgelöst und geht in einen reflektorischen Vorgang über. Dabei registrieren Dehnungsrezeptoren in der Harnblasenwand den Füllungszustand. Ab einem bestimmten Druck wird über afferente Nervenfasern das mediale Miktionszentrum in der Brückenregion aktiviert, welches die Miktion einleitet. Durch die Kontraktion des Detrusormuskels wird die Harnröhre im Bereich des inneren Sphinkters erweitert, der äußere Sphinkter erschlafft. Durch die Kombination der Fixierung des Zwerchfells und der Kontraktion der Bauchmuskeln kommt es zur Miktion [15].

Das Harnzurückhalten (lat. Kontinenz) unterliegt einer zentralen Kontrolle im Kontinenzzentrum. Über sympathische Nervenfasern wird der Detrusormuskel erschlafft und es kommt zur Kontraktion des inneren Sphinkters, welcher die Harnröhre verengt [15].

2. Harnblasenkarzinom

2.1. Ätiologie und Epidemiologie

Der Harnblasentumor ist das vierthäufigste Karzinom beim Mann und das zehnthäufigste Karzinom bei der Frau und stellt mit einer Rezidivrate von bis zu 70 % ein großes Problem in der Gesundheitsfürsorge dar. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt zwischen dem 50. und 80. Lebensjahr, wobei etwa dreimal so viele Männer wie Frauen betroffen sind. In den letzten fünf Jahrzehnten ist die Zahl der Neuerkrankungen um 50 % gestiegen, das entspricht einer Inzidenz von 30 Fällen pro Jahr pro 100.000 Einwohner beim Mann und 8 Fällen pro Jahr pro 100.000 Einwohner bei der Frau [1].

Es gibt exogene und endogene Faktoren, die das Risiko eines Harnblasenkarzinoms erhöhen. Dazu zählen Erkrankungen (chronische Harnwegsinfektionen, Steine, Urinstase u.a.), exogene Noxen (Zigarettenrauch, o-Toluidin u.a.), Medikamente (Cyclophosphamid, Chlornaphazin, Phenacetin) und aromatische Amine wie sie in der Gummi-, Farb-, Leder-, und Textilindustrie zu finden sind [1, 2, 3].

2.2. Einteilung und Klassifikation

Die Einteilung erfolgt nach dem TNM-System (Classification of Malignant Tumors, gemäß WHO 2004) in unterschiedliche T-Stadien. Zu den oberflächlichen nicht muskelinvasiven Harnblasentumoren zählen die pTa- und pT1-Stadien, sowie das Carcinoma in situ (pTis), zu den muskelinvasiven Tumoren gehören pT2- und pT3-Stadien. Ab Stadium-pT4 besteht eine Infiltration in das umliegende Gewebe. Weiters kann noch nach der regionalen Lymphknotenmetastasierung (N-Stadien) und der Fernmetastasierung (M-Stadien) eingeteilt werden [1, 2].

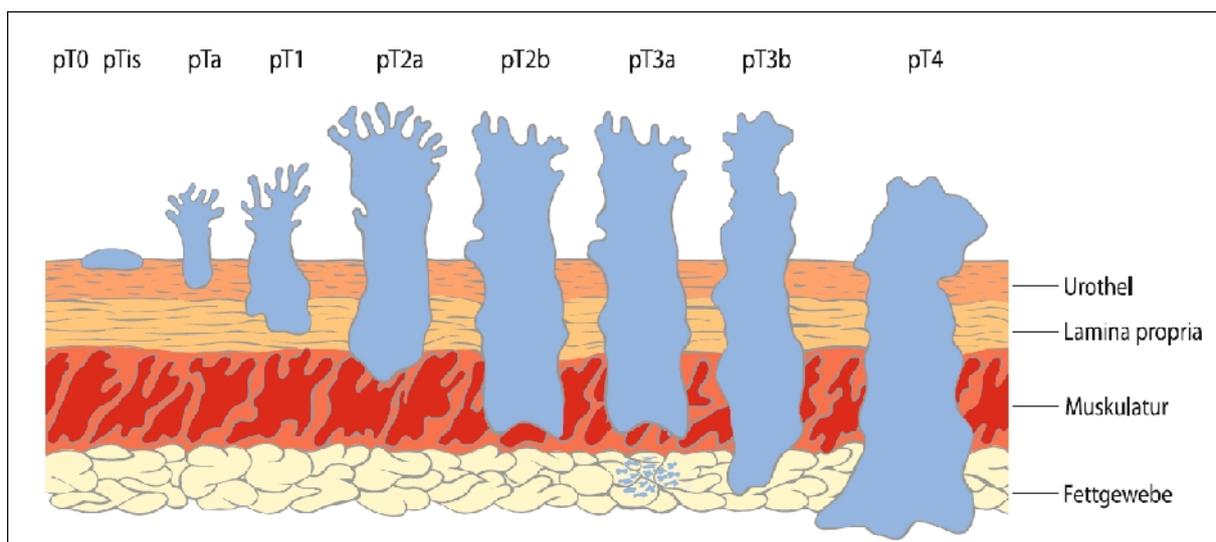


Abbildung 2: Klassifikation des Harnblasentumors nach dem TNM-System [1]

2.3. Symptomatik und Diagnostik

Im Frühstadium ist das Harnblasenkarzinom meist symptomlos. Durch Routineuntersuchungen werden Makro- und Mikrohämaturie, Leukozyturie und unklare Miktionsbeschwerden festgestellt, die auf einen Tumor hinweisen können.

Zur Abklärung dieser Symptome stehen viele bildgebende Verfahren wie Urographie, Sonographie und Zystoskopie, sowie Markersysteme wie Blasen tumorantigentest, nukleares Matrixprotein NMP, UroVysion™, ImmunoCyt™ und Urinuntersuchungen auf abgeschieferte Karzinomzellen zu Verfügung. Mittels CT und MRT kann zusätzlich noch die

Lokalisation und die Infiltration des Karzinoms festgestellt werden, was für eine optimale Abstimmung der Therapie notwendig ist [1, 2, 3].

2.4. Therapie

Bei der Therapie muss das TNM-Stadium, der Malignitätsgrad und der histologische Typ des Tumors berücksichtigt werden [3].

Beim **nicht muskelinvasiven Harnblasenkarzinom** stehen eine transurethrale Resektion und eine postoperative intravesikale Chemotherapie im Vordergrund. Bei der Resektion wird mittels einer Elektroschlinge schichtweise das Gewebe bis hin zum Muskel entfernt. Bereits 24 Stunden (std) postoperativ werden Zytostatika intravesikal gegeben, vor allem, um während der Operation abgeschieferte und anschließend reimplantierte Tumorzellen abzutöten. Als Prophylaxe und zur Nachbehandlung dienen Chemotherapeutika und Immunsuppressiva, die mittels Einmalkatheter in die Blase verabreicht werden. Die besten Therapieerfolge werden mit einer Bacille-Calmette-Guérin-Therapie (BCG-Therapie) und Zytostatika (Doxorubicin, Mitomycin, Thiotepa, Gemcitabin u.a.) erreicht. Um das Risiko eines Rezidivs und einer Krankheitsprogression in ein höheres Tumorstadium zu verhindern, wird eine Nachsorge in regelmäßigen Abständen zwingend empfohlen. Trotz dieser Prophylaxe kommt es im ersten Jahr nach der Therapie in 60 bis 80 % der Fälle zu einem erneuten Tumorwachstum mit einer signifikanten Verschlechterung der Überlebensrate auf Grund der erhöhten Wahrscheinlichkeit einer Progression [1, 2].

Goldstandard beim **muskelinvasiven Harnblasenkarzinom** ist die radikale Zystektomie mit pelviner Lymphadenektomie und eine Kombination mehrerer systematisch applizierter Chemotherapeutika. Bei dieser Operation werden nicht nur die Harnblase, sondern auch die Prostata und die Samenblase beim Mann, sowie die Vagina und der Uterus bei der Frau entfernt. Die Nerven des Plexus pelvinus werden dabei erhalten um eine Impotenz und eine Inkontinenz zu verhindern. Als Ersatz für die Blase dient eine Neoblase, die aus Darm hergestellt wird, oder ein Ileumconduit mit Auffangbeutel. Als Chemotherapie wurde jahrelang die MVAC-Kombination (Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin, Cisplatin) als Mittel der Wahl eingesetzt, doch wird seit neuestem eine Therapie mit Cisplatin und Gemcitabin empfohlen [3].

3. Gemcitabin

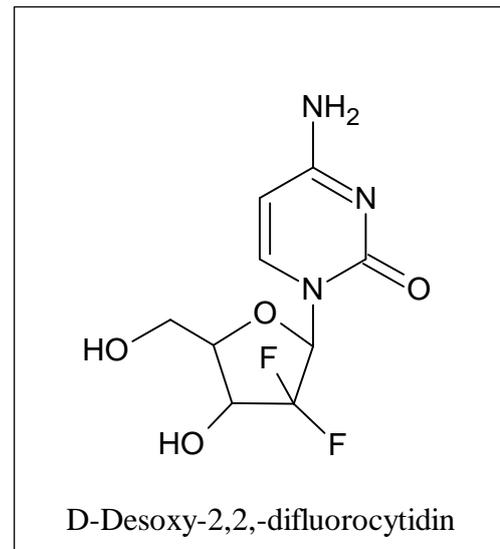
3.1. Pharmakologie

Gemcitabin (D-Desoxy-2,2-difluorocytidin) ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Pyrimidinanaloga. Auf Grund der zytotoxischen Wirkung wird es bei vielen kanzerogenen Erkrankungen wie Harnblasen-, Adeno-, Bronchial-, Mamma- und Ovarialkarzinomen und deren Rezidiven eingesetzt [16, 17].

Gemcitabin kann durch seine hydrophilen Eigenschaften nicht passiv durch die Plasmamembran diffundieren und ist deshalb auf

Membrantransporter wie den *humane equilibrative nucleosid transporter* (hENT) und den sogenannten *human sodium-gradient-coupled nucleosid transporter* (hCNT) angewiesen [7]. Nach der Aufnahme ins Zytoplasma wird Gemcitabin durch die Desoxynucleosidkinase, über die Zwischenstufen eines Monophosphat- und eines Diphosphatmetaboliten, in das aktive Gemcitabintriphosphat phosphoryliert, welches für die zytotoxische Aktivität verantwortlich ist [18]. Die Hauptwirkung besteht im Einbau des aktiven Triphosphatmetaboliten in die DNA und der Inhibition der DNA-Polymerase, welche zum Einzelstrangbruch und somit zur Apoptose der Tumorzelle führt. Die Vorteile liegen in der Ineffektivität der DNA-Reparaturenzyme gegenüber des in die DNA eingebauten Zytostatikums und der Wirksamkeit bei konfluenten Zellen, Zellen in der S-Phase, sowie Zellen in der log-Phase. Ein Nachteil liegt in der möglichen Entwicklung einer Resistenz, welche durch Mangel oder Hemmung der Nucleotidtransportaktivität, sowie der Überexpression von der Ribonucleotidreduktase zustande kommen kann [7].

Die zytotoxische Eigenschaft geht mit vielen unerwünschten Wirkungen einher. Zu den am häufigsten auftretenden Nebenwirkungen zählen Übelkeit, Erbrechen, Dyspnoe, Ödeme, Anstieg der alkalischen Phosphatase und Transaminasen, Knochenmarkssuppression, Blutbildveränderungen wie Leukopenie, Thrombozytopenie und Anämie, sowie allergische Hautausschläge mit Juckreiz, Haarausfall, Hämaturie, Proteinurie, grippeähnliche Symptome und Infertilität [16, 19]. Dies führt zu einer Kontraindikation für eine Therapie mit Gemcitabin bei eingeschränkter Leber- und Nierenfunktion, Stillzeit, Schwangerschaft und bei Kindern und Jugendlichen [19]. Daneben sollte darauf geachtet werden, dass Gemcitabin nicht innerhalb von sieben Tagen vor oder nach einer Strahlentherapie, sowie bei einer



Immunisierung mittels Lebendimpfstoffen verabreicht wird, da dies zu systemischen Wechselwirkungen führen kann [16, 19].

3.2. Gemcitabin-Prodrug

Konjugate von Gemcitabin gekoppelt an Squalen, Stearoyl, C20-Amiden oder C20-Ester haben sich als effektive Prodrugs erwiesen. Durch die amphiphile Struktur des Prodrugs können die Membrantransporter umgangen werden, das Biokonjugat kann passiv die Plasmamembran passieren und sich in Membranen, vor allem im Endoplasmatischen Retikulum, anreichern und somit ein intrazelluläres Reservoir bilden. Weitere Vorteile im Gegensatz zu normalem Gemcitabin sind die stärkere zytotoxische Wirkung und die Verminderung der Resistenzausbildung.

Als Anwendung in einem Targeting-System kann das Prodrug zusätzlich in Mikropartikeln, vesikuläre Phospholipidgele (VPG) oder Liposomen verpackt werden, wodurch sich ein Schutz gegen intrazellulären Abbau oder Cathepsin-Verdauung ergeben könnte, sowie die Stabilität in stark sauren und stark basischen Umgebungen erhöht wird [18, 20].

4. Drug Targeting

4.1. Methoden des Drug Targetings

Unter Drug Targeting versteht man einen gezielten Wirkstofftransport. Beispielsweise durch inerte molekulare Träger soll der Wirkstoff möglichst selektiv an die Zielzelle gelangen, wodurch toxische und unerwünschte Wirkungen verhindert werden sollen.

Es wird gemeinhin zwischen vier Prinzipien unterschieden: aktives Targeting, passives Targeting, physikalisches Targeting und zelluläre Trägersysteme [6].

Aktives Targeting

Auf der Zelloberfläche jedes Zelltyps sind charakteristische Merkmale ausgeprägt wie beispielsweise bestimmte Rezeptoren, Proteine und Membrantransportsysteme, die bei Erkrankungen verändert sein können. Das aktive Targeting nutzt diese Charakteristika der Zelle aus, indem der Wirkstoffträger mit sogenannten Vektoren gekoppelt wird, die spezifisch an diese Zellstrukturen andocken können. Vektoren können Antikörper, Proteine oder Lektine sein, die immunologisch inert sind und eine ausreichende Stabilität und eine gute Kopplungseffizienz aufweisen [6].

Passives Targeting

Das passive Targeting beruht auf der erhöhten Gewebspermeabilität durch pathologische Einflüsse, wie sie manchmal bei Tumoren oder hypoxischen Arealen zu finden sind. Dadurch können Wirkstoffträger mit einer Größe von 10 bis 500 nm leichter durch die Gefäßwand hindurchtreten und im Intrazellularraum akkumulieren. Dieser Effekt wird auch als EPR-Effekt (enhanced permeability and retention effect) bezeichnet [6].

Physikalisches Targeting

Es wurde beobachtet, dass neoplastische Gewebe einen niedrigeren pH-Wert und eine höhere Temperatur aufweisen als gesundes Gewebe. Beim physikalischen Targeting kommt es durch Temperatur- und pH-empfindliche Trägermoleküle zu einer vermehrten Akkumulation am Zielgewebe [6].

Zelluläre Trägersysteme

Bei zellulären Trägersystemen werden bakterielle oder eukaryotische Zellen, oder auch nur deren Zellhüllen mit einem Wirkstoff beladen. Diese Methode bringt jedoch Nachteile mit sich, wie beispielsweise eine schlechte endo- und epitheliale Durchgängigkeit, sowie das Risiko für Immunreaktionen [6].

4.2. Drug Targeting in der Harnblase

Das Urothel stellt eine robuste Barriere für harnpflichtige Substanzen, aber auch für Arzneistoffe dar, welche die Therapie von intravesikalen Erkrankungen erschwert [6]. Um den Arzneistofftransport in der Harnblase zu erleichtern wurden spezielle Methoden mit folgenden Zielen entwickelt [6, 21]:

- der verbesserten Aufnahme in die Zelle
- der längeren Verweildauer am Zielgewebe
- dem gezielten Erreichen des pathogenen Gewebes und somit einer Minimierung des Effekts auf das gesunde Gewebe

4.2.1. Trägersysteme

Liposomen sind Vesikel aus synthetischen oder natürlichen Phospholipiden, die sich im wässrigen Milieu zu Doppelschichten zusammenlagern. Durch Endozytose sollen diese Vesikel in die Zelle aufgenommen werden und somit einen optimalen Carrier für Arzneistoffe

darstellen. Durch Anlagerung der Liposomen an das Urothel bildet sich angeblich ein protektiver Lipidfilm, der auch ohne Wirkstoff einen Schutz gegen Reizstoffe, Irritationen und Übererregbarkeit geschädigter Neuronen bietet [22].

Polymer Nanopartikel sind partikuläre Trägersysteme mit variabler Wirkstoffbeladung, die das Eindringen von Arzneistoffen in das Urothel und somit die Wirksamkeit verbessern sollen, ohne dass das Urothel beschädigt wird [22].

PLGA als Wirkstoffträger

Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) ist ein synthetisches bioabbaubares Polymer, das bereits seit über dreißig Jahren in klinischer Verwendung ist. Es kann durch verschiedene Verfahren (z.B. Solvent-Evaporation, Koazervation, Sprühtrocknung, Einbettungsverfahren und mizellare Herstellungsverfahren) als Hüllmaterial für Arzneistoffe dienen, wobei die Freisetzungsdauer, die biologische Verteilung und die Konzentration des Wirkstoffes am Wirkungsort gesteuert werden kann. Dadurch kann die Toxizität des Arzneistoffes und das Behandlungsrisiko gesenkt, sowie eine gezielte Wirkstofffreisetzung ermöglicht werden. Die Wirkstoffabgabe kann durch physikalische und chemische Eigenschaften, wie Molekulargewicht, Verhältnis von Milchsäure und Glycolsäure, Verhältnis der amorphen und der kristallinen Form, Art und Beladung des Wirkstoffs, Größe und Form der Matrix, pH-Wert der Umgebung und die enzymatische Aktivität im Körper variiert werden. Dabei erfolgt die Freisetzung in zwei Phasen. Als erstes kommt es zur Freisetzung des Wirkstoffes auf der Polymeroberfläche, danach kommt die Freisetzung durch Diffusion aus der Polymermatrix [23].

Magnetische Nanopartikel haben eine organische oder anorganische Hülle, die zur Arzneistoffabsorption oder einer Ligandenbindung dient und eine magnetische Komponente, die aus einer Eisenverbindung besteht. Durch Anlegung eines äußeren Magnetfelds im richtigen Winkel sollen sich solche Partikel verstärkt in das erkrankte Gewebe einlagern [22].

Mukoadhäsive Nanopartikel haben die Eigenschaft, schnell eine reversible, kovalente Bindung mit der Blasenwand einzugehen, sodass das Eindringen des Wirkstoffs in das Urothel erhöht wird [22]. Die Stärke dieser Bindung wird durch die im Urin vorkommenden Kationen, v.a. durch Magnesium und Calcium, abgeschwächt und vermindert somit die Verweildauer und die Bioverfügbarkeit [24].

Aptamere sind kleine, einzelsträngige RNA- oder DNA-Oligonukleotide mit einem Molekulargewicht von zehn bis fünfzehn kDa. Durch die hohe Affinität und Spezifität, das hohe inhibitorische Potential, die Unterscheidung der Konformationen von Isoformen, sowie die toxikologische Unbedenklichkeit stellen Aptamere optimale Liganden dar, müssen jedoch in breit angelegten Screenings für die jeweilige Anwendung ausfindig gemacht und optimiert werden [25].

Dendrimere sind runde Kern-Schalen-Makromoleküle aus hochorganisierten Schichten von Monomeren, die von einem zentralen Kern aus wie eine Baumkrone verästelt in die Umgebung ziehen. Durch die Vielzahl funktioneller Gruppen stellen sie eine optimale Befestigung für Liganden und Wirkstoffe dar [22].

Polymere Hydrogele bestehen aus biokompatiblen und bioaktiven Polymeren, sowie einem oder mehreren Wirkstoffen. Das Gel lagert sich an die Blasenwand an, wird jedoch nicht während der Entleerung der Blase ausgewaschen und verlängert somit den Kontakt des Wirkstoffes mit der Blasenwand [22]. Zu den Sonderformen der polymeren Hydrogele gehören beispielsweise das sogenannte *Smart-Gel* mit kontinuierlicher Wirkstofffreisetzung und das Thermogel, das bei Raumtemperatur flüssig ist und erst durch Erwärmung auf Körpertemperatur eine gelartige Konsistenz erlangt [25].

4.2.2. Physikalisches und chemisches Targeting

Bei der **Elektro-Motive-Drug-Administration** (EMDA) wird an die Blasenwand ein elektrisches Feld angelegt, dass die urodynamischen Parameter erhöht [22] und somit die Penetration von wasserlöslichen Wirkstoffen, vor allem ionisierten Arzneistoffen, durch biologische Membranen in das Gewebe erhöht [26].

Dimethylsulfoxid (DMSO) ist eine oberflächenaktive Substanz, die eine Mizellenbildung von Wirkstoffen verhindert und somit die Resorption durch das Urothel erhöht [25]. Zusätzlich wirkt es analgetisch, antiinflammatorisch und muskelrelaxierend durch Beeinflussung der Erregungsübertragung sensorischer Nerven, ohne eine systemische Toxizität oder eine Schädigung des Urothels aufzuweisen [25]. DMSO steht im Verdacht, eine disruptierende Wirkung auf die interzellulären Tight-Junctions auszuüben, und so den Transport von Wirkstoffen zu verbessern. Dies würde jedoch zugleich die Anfälligkeit für unerwünschte, entzündliche Nebenreaktionen erhöhen [22].

4.3. Lektine

Lektine (lat. lectus, ausgewählt) sind Proteine oder Glykoproteine, die über Wasserstoffbrücken nicht kovalent an spezifische Kohlenhydratstrukturen binden können. Sie kommen in allen Organismen vor und dienen z.B. der natürlichen Abwehr von Schädlingen [27]. In der Medizin werden Lektine für therapeutische Zwecke gegen Erkrankungen wie virale und bakterielle Infektionen, Diabetes Mellitus und maligne Tumore, sowie als Antithrombolytika eingesetzt [28].

Lektine können an spezifische Strukturen der Zellmembran binden, erleichtern bei Körpertemperatur die Aufnahme in die Zelle mittels Endozytose und reichern sich in sauren interzellulären Kompartimenten an. Dadurch haben sie ein hohes Potential im Bereich des Drug-Targeting, indem sie an Trägersysteme wie Liposomen oder Nanopartikel gekoppelt werden. Dabei spielt die Größe des Trägersystems, welches ein Optimum bei 500 nm hat, und die Dichte der Lektine auf der Oberfläche eine Rolle. Durch eine Co-Inkubation von Zucker-Oligomeren (z.B. von N-Acetylglucosamin) kann die Bindung von Lektinen inhibiert werden. Diese Hemmung beweist, dass es sich dabei um eine Lektin-Zucker-Interaktion und nicht um eine Protein-Protein-Interaktion handelt [29].

Wheat germ agglutinin (WGA) ist ein dimeres pflanzliches Lektin aus dem Weizenkeim (lat. *Triticum vulgare*) mit zwei identischen Untereinheiten und einer atomaren Masse von 35 kDa. Über zwei unabhängige Zuckerbindungsstellen an jeder Untereinheit kann WGA spezifisch Mono- und Oligosaccharide von N-Acetylglucosamin und N-Acetylneuraminsäure binden [28, 30].

Materialien und Grundlegende Methoden

5. Chemikalien

Für die Herstellung von 4-(N)-Stearoyl-Gemcitabin (Gem-C18) wurde als Ausgangssubstanz Gemcitabin-Hydrochlorid (2 deoxy-2,2 -difluorocytidine hydrochlorid; Carbosynth Limited, Compton/Berkshire, UK) verwendet. Die weitere Synthese und die anschließende Aufreinigung wurden mit den Lösungsmitteln Aceton, Dichlormethan (DCM), Ethanol (EtOH) und Ethylacetat (EtOAc) von der Firma Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Isobutylchlorformiat, Ethylchlorformiat, Stearinsäure, Triethylamin (TEA), Tetrahydrofuran (THF) und Tributylamin (TBA) von der Firma Sigma Aldrich (Wien, Österreich), sowie Dimethylformamid (DMF) von der Firma J.T. Baker (Deventer, Niederlande) durchgeführt. Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel (60Å F₂₅₄) von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Die Mikroverkapselung des Gem-C18 bzw. des 5-N-(Oktadecanoyl)aminofluorescein (Fluo-C18) von der Firma Chemos GmbH (Regenstauf, Deutschland) erfolgte mit Hilfe von Pluronic[®]-F68 von der Firma Sigma Aldrich (Wien, Österreich), PLGA Resomer[®] RG503H [(poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA, lactide/glycolide ratio 50:50] von der Firma Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Deutschland), sowie Difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (Bodipy[®] 493/503) von der Firma Invitrogen Corp. (Carlsbad, California, USA). Das dafür verwendete destillierte Wasser wurde im Labor mit Hilfe einer Destillierapparatur hergestellt.

Für die anschließende Kopplung mit Lektinen wurden eine Glycinlösung, N-Hydroxysuccinimid (NHS), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDAC) und Humanes Serum Albumin (HSA, Humanalbumin) von der Firma Sigma Aldrich (Wien, Österreich), sowie Wheat Germ Agglutinin (WGA, Weizenlektine) von der Firma Vector laboratories (Burlingham, USA) herangezogen.

Weiters wurden Alexa 594-konjugiertes WGA (Alexa-WGA) von der Firma Invitrogen Corp. (Carlsbad, California, USA), 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) von der Firma Invitrogen (Paisley, UK), sowie N-Acetyl-D-Glucosamin und N,N,N-Triacetylchitotriose von der Firma Sigma Aldrich (Wien, Österreich) für die Versuche verwendet.

6. Puffer und Freisetzungsmethoden

Für die Untersuchung der Freisetzung wurden verschiedene Medien hergestellt:

Der **Kunsturin „Artificial Urine Siriraj“** [31] mit pH 5 bzw. pH 7 wurde wie folgt hergestellt: 12,135 g Harnstoff (Fulka Chemie, Buchs, Schweiz), 1,485 g

Natriumcitratdihydrat (Sigma Aldrich, Wien, Österreich), 3,17 g Natriumchlorid (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 2,25 g Kaliumchlorid (Riedel de Haen – Honeywell, Seelze, Deutschland), 0,805 g Ammoniumchlorid (Wilhelm Neuber`s, Wien, Österreich), 0,445 g Calciumchlorid (Merck, Wien, Österreich), 0,5 g Magnesiumsulfat (Merck, Wien, Österreich), 0,17 g Natriumhydrogencarbonat (Merck, Wien, Österreich), 1,29 g Natriumsulfat (Sigma Aldrich, Wien, Österreich), 0,5 g Natriumdihydrogenphosphat (Merck, Wien, Österreich), 0,055 g Dinatriumhydrogenphosphat (Merck, Wien, Österreich), 0,17 g Harnsäure (AppiChem, Darmstadt, Deutschland), 0,45 g Kreatinin (Sigma Aldrich, Wien, Österreich) und 0,015 g Natriumoxalat (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 1000 ml bidestilliertem Wasser.

Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit 4 M Natronlauge (NaOH) oder mit 0,1 M Salzsäure (HCl).

Weiters wurde ein **Freisetzungsmedium mit 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)/NaOH 20 mM pH 7,4** und Roswell Park-Memorial Institut 1640 Zellkulturmedium (**RPMI**) hergestellt: Dazu wurden 2,385 g HEPES (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 500 ml bidestilliertes Wasser gelöst und mit 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Dazu kamen 500 ml RPMI (farblos, ohne Indikator, Gibco®, ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) und 50 ml Fetales Kälberserum (FCS).

Das dritte **Freisetzungsmedium** war phosphatgepufferte Salzlösung (**PBS**) **pH 7,4 mit Natriumlaurylsulfat (SDS), Calcium und Magnesium**: Dazu wurde 0,2 g Kaliumchlorid (Riedel de Haen – Honeywell, Seelze, Deutschland), 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Wien, Österreich), 0,1 g Magnesiumchloridhexahydrat (Sigma Aldrich, Wien, Österreich) und 8,0 g Natriumchlorid (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 950 ml bidestilliertem Wasser gelöst und mit 50 ml Calciumchlorid (Merck, Wien, Österreich), sowie 5 % bzw. 10 % SDS (Sigma Aldrich, Wien, Österreich) versetzt. Mit 4 M NaOH wurde auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

7. Zellkultur

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden insgesamt 6 Blasenzelllinien verwendet, die in einem Brutschrank mit 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit bei 37 °C kultiviert wurden.

Die Zelllinie **SV-HUC** (American Type Culture Collection, Rockville, USA) stammte aus gesunden humanen Blasenzellen, die immortalisiert wurden. Die Kultivierung erfolgte in

HAM's-F12-Liquid-Medium (Gibco[®], ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA), diesem wurden noch zusätzlich 10 % FCS, 1 % Penicillin mit Streptomycin (10 µg/ml; PAA Laboratories, Pasching, Österreich), sowie 0,5 mM L-Glutamin zugesetzt.

Alle weiteren Zelllinien wurden von der German Collection of Microorganisms and Cell Culture (Braunschweig, Deutschland) bezogen. Von einem humanen Tumor 2. Grades stammen die Zelllinie **5637**, sowie die Zelllinie **RT112**. Diese Zellen wurden im RPMI Zellkulturmedium mit 10 % FCS, sowie 400 µl L-Glutamin und 2 ml Gentamycin kultiviert.

Weiters wurden die Zelllinien **647V**, **T24**, die von einem humanen Tumor 2. Grades stammen, sowie der Zelllinie **HT1376** von einem humanen Tumors 3. Grades, verwendet. Diese 3 Zelllinien wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco[®], ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) mit 15 % (647V) bzw. 10 % (T24, HT1376) FCS kultiviert.

Für das Anzüchten von den Blasenzelllinien in den Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurde, bei jeder Zelllinie, eine Zellzahl von 17000 Z/Well bzw. bei einer 12-Well-Mikrotiterplatte eine Zellzahl 60000 Z/Well verwendet. Für die Mikrotiterplatte mit 24 Wells wurde, je nach Zelllinie, eine Zellzahl von 20000 Z/Well (HT1376) über 30000 Z/Well (5637) bis 40000 Z/Well (SV-HUC) verwendet.

8. Analysenmethoden

8.1. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Für die Analyse von Gem-C18 und Fluo-C18 wurde eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, high performance liquid chromatography) von der Firma Agilent Technologies Serie 1100 (Santa Clara, CA) verwendet. Die stationäre Phase bestand aus einer LiChrosphere[®]100 RP-18eQ2 Column Säule (Merck, Wien, Österreich) mit einer Partikelgröße von 5 µm, einer Länge von 25 cm und einem Innendurchmesser von 0,46 cm. Als Fließmittel diente MeOH/Natriumhydrogenphosphat-Puffer pH 3 (85 + 15). Das verwendete Protokoll gab eine Flussrate von 1 ml/min und ein Injektionsvolumen von 100 µl vor.

Vorbereitungen zur Analyse

Zuerst wurden die Proben lyophilisiert. Dazu wurde je 1 ml Probe in ein 2 ml Mikroreaktionsgefäß gegeben und mit einem Parafilm verschlossen, der mit einer Nadel mehrfach durchstochen worden war. Die Proben wurden bei - 80 °C eingefroren, danach in

den Gefriertrockner (Lyophilisator) gestellt und bei - 30 °C und 0,370 mbar getrocknet. Eine Nachtrocknung erfolgte bei - 55 °C und 0,021 mbar für mindestens 30 min. Dann wurden die trockenen Proben zuerst in je 500 µl EtOAc am Ultraschallbad (100 %, 20 °C, 3 min) gelöst. Dadurch wurden die PLGA-Partikel zerstört und der Wirkstoff freigesetzt. Anschließend wurden je 500 µl MeOH zugesetzt und nochmals beschallt. Nach dem Zentrifugieren (14000 U/min, 4 °C, 3 min) wurden 125 µl der oberen flüssigen Phase mit 375 µl einer Mischung aus EtOAc und MeOH (1 + 1) in ein HPLC-Vial überführt. Durch diesen Verdünnungsschritt wurde der Analysenbereich der Eichgerade erreicht.

Eichgeraden zur Berechnung der Konzentrationen

Zur Auswertung der HPLC-Diagramme wurde für jeden Wirkstoff eine Eichgerade erstellt, durch die der Gehalt an Wirkstoff (µg/ml) berechnet werden konnte.

Es wurden genau eingewogene Konzentrationen mittels HPLC (Agilent Technologies 1100) analysiert und die Flächen (Area) der entsprechenden Signale mit den Konzentrationen in ein Verhältnis gesetzt.

Gemcitabin-HCl Eichgerade:

$$\text{Eichgerade: } y = 102,28 x + 43,8137$$

$$\text{Berechnung: } x(\mu\text{g/ml}) = \frac{y(\text{Area}) - 43,813}{102,28}$$

$$R^2 = 1$$

Gem-C18 Eichgerade:

$$\text{Eichgerade: } y = 10,118 x + 25,238$$

$$\text{Berechnung: } x(\mu\text{g/ml}) = \frac{y(\text{Area}) - 25,238}{10,118}$$

$$R^2 = 0,9995$$

Gem-C18 Eichgerade durch den Nullpunkt:

$$\text{Eichgerade: } y = 10,351 x$$

$$\text{Berechnung: } x(\mu\text{g/ml}) = \frac{y(\text{Area})}{10,351}$$

$$R^2 = 0,9984$$

Fluo-C18 Eichgerade:

$$\text{Eichgerade: } y = 11,909 x + 71,179$$

$$\text{Berechnung: } x(\mu\text{g/ml}) = \frac{y(\text{Area}) - 71,179}{11,909}$$

$$R^2 = 0,999$$

8.2. Methoden der Fluoreszenzmessung

Für die Messung von Fluoreszenzintensitäten (Fluorescence Intensity Units, FIU) am Monolayer wurde ein **Fluoreszenzplattenleser** [Tecan[®] microplate fluorimeter, Infinite[®] M200, Grödig, Austria) verwendet.

Für die Analyse der relativen Fluoreszenzintensität (FIU) an der Einzelzelle wurde ein **Durchflusszytometer** (Gallios[™] flow cytometer; Beckman Coulter, Brea, California) verwendet.

Bei beiden Analysenmethoden wurde eine Exzitation von 485 nm und eine Emission von 525 nm gewählt.

8.3. Mastersizer

Für die Messung der Partikelgrößen wurde der Mastersizer 3000 Hydro Malvern, (Malvern, UK) verwendet. Dieses Gerät ermöglicht die Messung von nasdispersen Systemen, wie z.B. W/O/W-Partikelsuspensionen.

9. Grundlegende Techniken

9.1. „Waschen“

Im Folgenden wird oft von „waschen“ gesprochen. Dies impliziert den Reinigungsvorgang einer Suspension von Zellen und/oder Partikeln, bei dem nicht gebundene Stoffe, wie Lösungsmittel, Katalysatoren, Lektine und zu kleine Partikel, entfernt werden.

Dabei wurde zuerst zentrifugiert, wobei Umdrehungszahl (U/min), Temperatur (°C) und Zeit (min) variieren. Der Überstand wurde vorsichtig mittels einer Pipette abgehoben, sodass das durch das Zentrifugieren entstandene Pellet nicht aufgewirbelt wurde. Das Pellet wurde in einem neuen Medium resuspendiert und anschließend am Ultraschallbad (100 %, 20 °C, 3 min) beschallt.

9.2. Mikropartikelherstellung mittels Solvent Evaporation [32]

Es wurden verschiedene Arten von PLGA-Mikropartikel für unsere Versuche hergestellt:

- PLGA-Partikel ohne Gem-C18 und ohne Fluoreszenzfarbstoff (Bodipy[®])
- PLGA-Partikel mit Gem-C18 und ohne Bodipy[®]
- PLGA-Partikel ohne Gem-C18 und mit Bodipy[®]
- PLGA-Partikel mit Gem-C18 und mit Bodipy[®]
- PLGA-Partikel mit Fluo-C18
- PLGA-Partikel mit Gem-C18, Fluo-C18 und Bodipy[®]
- PLGA-Partikel mit Stearinsäure
- PLGA-Partikel mit Stearinsäure und Isobutanol

Zuerst wurde eine PLGA-Lösung bei 4 °C hergestellt, wobei diese noch andere Substanzen enthalten konnte:

- 200 mg PLGA + 45,02 mg Gem-C18 + 1,34 ml EtOAc
- 200 mg PLGA + 40,82 mg Gem-C18 + 0,125 mg Bodipy[®] + 1,34 ml EtOAc
- 200 mg PLGA + 0,125 mg Bodipy[®] + 1,34 ml EtOAc
- 200 mg PLGA + 30,02 Fluo-C18 + 1,34 ml EtOAc
- 200 mg PLGA + 26,22 mg Gem-C18 + 22,22 mg Fluo-C18 + 1,34 ml EtOAc

Gem-C18 und Bodipy[®] lösten sich bei Raumtemperatur sehr gut in EtOAc, bei Fluo-C18 war eine Erwärmung auf 50 °C nötig.

Zu der PLGA-Lösung kamen 4 ml einer 1 %-igen Lösung von Pluronic[®]-F68 in destilliertem Wasser. Die Mischung der 2 Lösungen wurde für 40 sek bei 20 % mit einem Ultraschallstab (Bandeline electronic, UW 70, Berlin, Deutschland) emulgiert. Die dabei freiwerdende Wärme wurde mittels eines kalten Wasserbads abgeführt.

Die entstandene Emulsion wurde zu 50 ml einer 0,25 %-igen Pluronic[®]-F68-Lösung in destilliertem Wasser gegeben und 1 std lang mittels Magnetprüher zu einer W/O/W-Emulsion dispergiert.

EtOAc wurde mittels eines Rotationsverdampfers aus der Emulsion entfernt, sodass das Polymer mit dem eingebetteten Derivat zu einer Suspension ausfallen konnte.

Vor der Verwendung wurde die Suspension zweimal mit HEPES/NaOH Puffer 20 mM pH 7,4 + 0,1 % Pluronic[®]-F68 gewaschen (Zentrifuge: 4000 U/min, 4 °C, 10 min).

Diese PLGA-Mikropartikel waren nur über einen Zeitraum von zirka 1 Monat stabil, jedoch konnte die Haltbarkeit durch Einfrieren und späteres Auftauen verlängert werden, ohne dass es zu einer Beeinträchtigung kam.

9.3. Kopplung von Lektinen an die Oberfläche der PLGA-Mikropartikel [33]

Damit sich die PLGA-Mikropartikel an die Blasenwand anheften können und die Aufnahme des verkapselten Wirkstoffes in die Zelle erhöht wird, wurden Lektine mittels der Carbodiimidmethode an die Oberfläche der PLGA-Mikropartikel gekoppelt. Dazu wurde bevorzugt WGA verwendet, da dieses Lektin ein hohes Bindungsvermögen an Blazenzellen zeigt [5]. Als Vergleichsproben wurden HSA-modifizierte PLGA-Mikropartikel, sowie PLGA-Mikropartikel ohne Lektine (Plain Partikel) verwendet.

Die Kopplung erfolgte mit je 1 ml Partikelsuspension, die einmal mit 500 µl HEPES/NaOH 20 mM pH 7,0 gewaschen wurde (Zentrifuge: 14000 U/min, 4 °C, 5 min).

Im nächsten Schritt fand die Aktivierung der Carboxylgruppen statt. Dazu wurden 500 µl einer Lösung von 281 mg EDAC und 11,74 mg NHS in 500 µl HEPES/NaOH 20 mM pH 7,0 zu der Partikelsuspension hinzugegeben, am Ultraschallbad (100 %, 20 °C, 3 min) resuspendiert und 30 min lang bei Raumtemperatur auf einen Umlaufschüttler gegeben.

Ergänzend kamen 500 µl HEPES/NaOH 20 mM pH 8 hinzu um überschüssige Kupplungsreagenzien zu entfernen. Danach folgten 3 Waschschrte: Einmal mit 1,5 ml HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4, einmal mit 1,5 ml HEPES/NaOH 20 mM pH 8 und einmal mit 1 ml HEPES/NaOH 20 mM pH 8 (Zentrifuge: 14000 U/min, 4 °C, 5 min).

Für die Kopplung mit den Lektinen kamen in je 1 ml Partikelsuspension 50 µl einer WGA-Lösung (5 mg/ml HEPES/NaOH 20 mM pH 8) bzw. für die Vergleichsproben wurden je 1 ml Partikelsuspension 48,8 µl einer HSA-Lösung (10 mg/ml HEPES/NaOH 20 mM pH 8) hinzugefügt. Zusätzlich wurden nicht-modifizierte Partikel hergestellt, indem je 1 ml Partikelsuspension 50 µl HEPES/NaOH 20 mM pH 8 hinzugesetzt wurden. In den nächsten 15 std am Umlaufschüttler fand die Kopplung statt.

Für die Absättigung der noch freien, nicht gekoppelten Carboxylgruppen wurden 241,9 µl einer Glycinlösung (100 mg/ml HEPES/NaOH 20 mM pH 8) hinzugefügt und für 5 std auf den Umlaufschüttler gegeben.

Nach Zugabe von 300 µl HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 erfolgten die letzten 3 Waschschrte: 2 Waschschrte mit je 1,5 ml HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 und 1 Waschschrte mit 1 ml HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit 0,1 % Pluronic®-F68.

Spezielle Methoden, Ergebnisse und Diskussion

10. 4-(N)-Stearoyl-Gemcitabin-Prodrug

10.1. Derivatisierung des Gemcitabin-

HCl und Optimierung der Synthese

Um die Lipophilie des Gemcitabins zu erhöhen wurde mittels einer Derivatisierung eine C18-Kette angehängt. Hierbei lief die Synthese in 2 Schritten ab: erstens, die Bildung eines gemischtes Anhydrids aus Stearinsäure und Isobutylchlorformiat bzw. Ethylchlorformiat und zweitens, die Kopplung des lipophilen Stearoyl-Restes an das Gemcitabin über die 4-Aminogruppe des Pyrimidinringes (Abbildung 5).

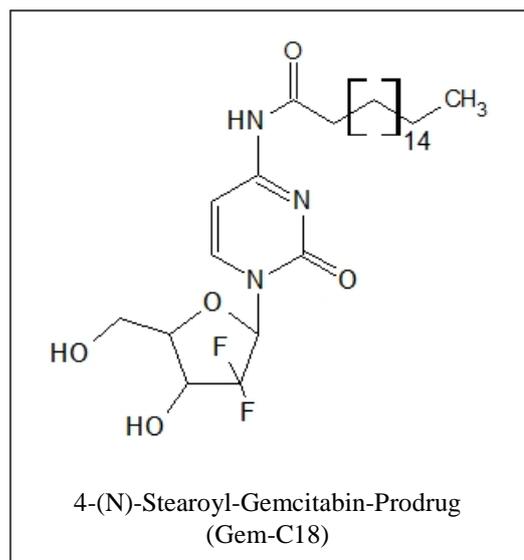


Abbildung 5: Die Struktur des 4-(N)-Stearoyl-Gemcitabine-Prodrugs (Gem-C18)

10.1.1. Methode der Derivatisierung nach Immordino et al [34]

Im ersten Schritt wurden 200 mg Stearinsäure in einem Gemisch von 3 ml DMF und 77 μ l TBA unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur gelöst. Anschließend fand die reaktive Anhydridbildung statt, dabei wurde zuerst für Sauerstoffausschluss mittels Stickstoffgas und einer Abkühlung auf - 15 °C mittels Natriumchlorid gesättigtem Eiswasser gesorgt. Danach wurden 52 μ l Isobutylchlorformiat in 3 ml THF tropfenweise hinzugefügt. Diese Reaktion war nach 15 min beendet.

Zu dem entstandenen gemischten Anhydrid wurde, im zweiten Schritt, bei Raumtemperatur eine Lösung von 148 mg Gemcitabin in 5 ml DMF und 77 μ l TBA hinzugefügt. In den nächsten 72 std fand die Reaktion zum Derivat statt. Dabei sollte auf Sauerstoffausschluss und Nachfüllen von verdunstetem Lösungsmittel (5 ml DMF und 6 ml THF) geachtet werden. Als letzter Schritt wurden die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Zur Kontrolle, ob die Reaktion wie gewünscht verläuft, wurde alle 24 std eine Probe für eine Dünnschichtchromatographie (DC) gezogen. Nach der Entwicklung der DC mittels eines Gemischs aus Aceton und DCM (1 + 1) wurde unter UV-Licht bei 245 nm der Erfolg der Umsetzung kontrolliert. Dabei waren mehrere Banden erkennbar, diese stammten von Gem-C18, Verunreinigungen, sowie kleinen Mengen der Ausgangssubstanz.

Aufreinigung des Derivats

Zur Aufreinigung des Derivats diente eine Kieselgelsäule (6 g Silicagel 60 Å) mit DCM und EtOH (94 + 6) als Fließmittel.

Das trockene Gem-C18 wurde in 6 ml Fließmittel aufgenommen und zentrifugiert (14000 U/min, 20 °C, 15 min). Je 2 ml der oberen flüssigen Phase wurden, in zwei getrennten Läufen, mittels der Säulenchromatographie (Laufgeschwindigkeit: ca. 1 ml/min) aufgetrennt. Dafür wurden 48 Fraktionen mit je 1 ml gesammelt. Von jeder Fraktion wurde eine Probe für eine DC gezogen, aufgetragen, entwickelt (Fließmittel: DCM + Aceton: 1 + 1) und unter UV-Licht (245 nm) analysiert. Dabei sollte nur mehr die Bande des Derivats erkennbar sein. Jene Fraktionen, die eine Bande von Gem-C18 unter UV-Licht aufwiesen, wurden in einem Kolben vereinigt und eingedampft.

10.1.2. Optimierung der Synthese von Gem-C18

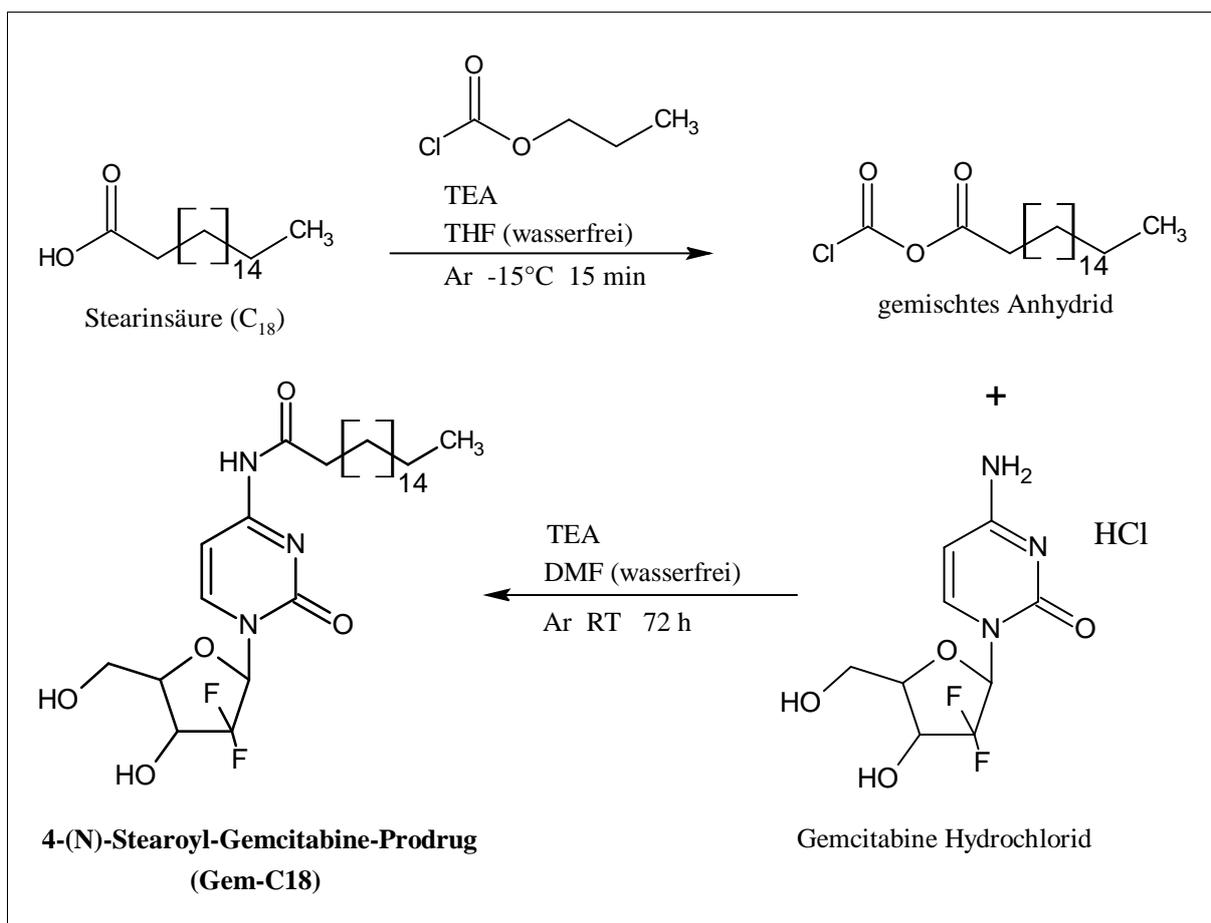


Abbildung 6: Die optimierte Synthese von 4-(N)-Stearoyl-Gemcitabine-Prodrug (Gem-C18)

Bei der Analyse der Identität und Reinheit des Gem-C18 mittels Kernresonanzspektroskopie (NMR) wurden Verunreinigungen festgestellt, die das Spektrum überlagerten.

Bei der Optimierung der Synthese des Derivats wurde die Methode nicht grundsätzlich geändert, jedoch wurden Substanzen ausgewechselt und Lösungsmittel in höherer Reinheit verwendet. Zusätzlich wurden die Mengenverhältnisse geändert, sodass die Stoffmenge von Gemcitabin 0,5 mmol (148 mg) und die Stoffmenge von TEA (97 µl), Isobutylchlorformiat (90,8 µl), Ethylchlorformiat (66,6 µl), sowie Stearinsäure (200 mg) 0,7 mmol betrug.

Im **ersten Ansatz** der Optimierung wurde TBA durch TEA ersetzt. Zusätzlich wurde, nach dem Zentrifugieren und vor der Aufreinigung des Derivats mittels der Kieselgelsäule, das Produkt mit Wasser ausgeschüttelt. Dabei fiel ein weißer Niederschlag aus. Aus diesem Grund wurde die Synthese bei diesem Schritt beendet.

Im **zweiten Ansatz** der Optimierung wurde TEA statt TBA und Ethylchlorformiat statt Isobutylchlorformiat verwendet. Bei der Aufreinigung entstand beim Zentrifugieren ein weißer fester Überstand. Nach einer DC war ersichtlich, dass der Großteil des Derivats in der flüssigen unteren Phase vorhanden war und in der darüber liegenden Phase nur ein geringer Anteil vorlag. Für die weitere Aufreinigung wurde der fest Überstand verworfen und mit der flüssigen unteren Phase weiter gearbeitet. Am Ende der Synthese mit anschließender Aufreinigung lag das Gem-C18 noch immer verunreinigt vor.

Im **dritten Ansatz** der Optimierung wurde kein Stickstoff verwendet, die Reaktion lief mit Luftsauerstoff ab. Dabei ergab sich ein Problem in Bezug auf die Löslichkeit. Zu Beginn der Aufreinigung ließ sich das Derivat nicht lösen, weder in DCM noch in DCM mit EtOH. Nach Zugabe von EtOAc, DCM und EtOH war ein Lösen nur nach Beschallung am Ultraschallbad möglich. An dieser Stelle wurde die Synthese abgebrochen, da für die Mikropartikelherstellung eine Löslichkeit in EtOAc erforderlich ist.

Im **vierten Ansatz** der Optimierung wurde Stickstoffgas durch Argongas, zum Ausschluss von Sauerstoff, ersetzt. Dies bot 3 Vorteile; erstens ist Argongas inert, zweitens ist es schwerer als Stickstoff und muss nur einmal in den Kolben geleitet und nicht ständig zugeführt werden und dadurch kann, drittens, der Kolben verschlossen werden und somit das Lösungsmittel nicht entweichen. Am Ende der Reaktion war ein Niederschlag im Kolben, der verworfen wurde. Für die weitere Synthese wurde nur der klare Überstand verwendet.

Nach diesem Schritt wurde eine weitere NMR durchgeführt, bei der wieder Verunreinigungen festgestellt wurden, welche wahrscheinlich von Weichmachern stammten.

Im **letzten Ansatz** der Optimierung wurden alle Kunststoffgefäße, aus denen durch starke Lösungsmittel wie DCM Weichmacher herausgelöst werden konnten, durch Glas ersetzt. Dazu gehörten in diesem Versuch alle Gefäße von Substanzen und Lösungsmitteln, Gefäße für Zwischenschritte wie Mikroreaktionsgefäße, die Säule und deren Schläuche, sowie

Kunststoffprouvetten. Außerdem wurden alle Substanzen und Lösungsmittel in höchster Reinheit verwendet.

In diesem Schritt waren alle vorher beschriebenen Probleme nicht mehr vorhanden: kein weißer, fester Überstand, sowie eine gute Löslichkeit in DCM, EtOAc, DCM + EtOH, sowie EtOH + MeOH.

10.1.3. Ergebnisse und Diskussion

Die Derivatisierung des Gemcitabins erfolgte nach der Methode von Immordino et al 2004 [34], durch die ein Stearoyl-Rest an die 4-Aminogruppe des Pyrimidinringes des Gemcitabins gekoppelt wurde [34]. Die Vorteile des entstandenen Gem-C18, gegenüber Gemcitabin, liegen im amphiphilen Charakter, in der verminderten Resistenzausbildung und der erhöhten zytotoxischen Aktivität [18].

Bei der Analyse mittels NMR wurde festgestellt, dass Verunreinigungen das gewünschte Spektrum überlagerten, die von den verwendeten Lösungsmitteln und aus Kunststoffgefäßen herausgelösten Weichmachern stammten. Nach der Beseitigung dieser Störelemente konnte die Identität und eine ausreichende Reinheit nachgewiesen werden. Diese Reinheit ist Voraussetzung für weitere Entwicklungsschritte in Hinsicht auf die Therapie des Harnblasenkarzinoms am Menschen und die Reduktion von unerwünschten Wirkungen.

Die Löslichkeit des Wirkstoffes in EtOH, DCM, EtOAc, sowie in den verwendeten wässrigen Freisetzungsmitteln wurde bei dem optimierten Derivat nicht beeinflusst. Dies war für die folgenden Prozesse sehr wichtig: für die Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (EtOH, DCM), für die Mikroverkapselung (EtOAc), für die Freisetzung aus den PLGA-Mikropartikeln (HEPES/NaOH, PBS mit SDS, AU) und die Analyse mittels HPLC (Agilent Technologies 1100, MeOH, EtOAc).

Bezogen auf die theoretische Ausbeute reduzierte sich, durch die Optimierung, das Ergebnis von vormalig 64,59 % auf 51,42 %. Dies war zum Teil auf den im Kolben verbliebenen Rückstand vor der Aufreinigung und die nun fehlenden Verunreinigungen zurückzuführen, jedoch war die Quantität hier nicht von vorrangiger Bedeutung.

10.2. Bindung von modifizierten PLGA-Mikropartikeln an Blasenellen

Bei diesem Versuch wurde evaluiert, ob PLGA-Mikropartikel, die mit Lektinen modifiziert wurden, besser an Blasenzelllinien binden, als HSA- oder nicht-modifizierte Partikel.

10.2.1. Bindung von WGA-, HSA- und nicht-modifizierten PLGA-Mikropartikeln mit Gem-C18 und Bodipy® an Blasenzellen

Für diesen Versuch wurden PLGA-Mikropartikel mit Gem-C18 und Bodipy® und anschließender Modifikation (WGA, HSA, Plain) hergestellt. Die Bindung am Monolayer erfolgte an den Blasenzelllinien SV-HUC, 5637 und HT1376. An den Einzelzellen wurden die Versuche zusätzlich noch mit den Zelllinien RT112, 647V und T24 jedoch nicht mit HT1376 durchgeführt.

Vorbereitung

Damit die Suspensionen untereinander vergleichbar waren, wurden die verwendeten PLGA-Mikropartikel, nach Resuspendieren mit Hilfe des Ultraschallbads, auf einen Wert von zirka 1000 FIU eingestellt. Dies geschah durch Verdünnen mit isotonem HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Magnesium und Calcium (Mg/Ca) und anschließender Messung am Fluoreszenzplattenleser [Tecan®, 100 µl, Gain 80, 484/525 nm (ex/em), Bottom]. Anschließend wurde unter dem Mikroskop (Epifluorescence Axio Observer.Z1 deconvolution microscopy system; Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) auf unerwünschte Aggregation geprüft.

Die PLGA-Mikropartikel mit HSA und ohne Lektin wurden nur in einer Konzentration verwendet; mit den WGA-modifizierten PLGA-Mikropartikeln wurde eine Verdünnungsreihe (1 + 4 mit HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca) hergestellt. Am Schluss lagen eine konzentrierte Suspension WGA C1 und die 4 Verdünnungen WGA C2 (1 + 4), WGA C3 (1 + 24) WGA C4 (1 + 24) und WGA C5 (1 + 624) vor.

Zellversuch Einzelzellen

Diese Untersuchung wurde mit Einzelzellen durchgeführt. Dafür wurden konfluent angezüchtete Zellen gespalten, gezählt und auf eine Zellzahl von 6 Mio Zellen pro ml (Z/ml) eingestellt.

Die Zellen und alle benötigten Reagenzien wurden für 15 min in den Kühlschrank (4 °C) gestellt.

Der Zellversuch fand als Dreifachbestimmung statt. Dazu kamen in jedes Mikroreaktionsgefäß 50 µl Zellsuspension und 50 µl der eingestellten und gut resuspendierten Mikropartikelsuspensionen mit HSA, Plain oder WGA in unterschiedlichen Konzentrationen. Zusätzlich wurde eine Dreifachbestimmung mit 50 µl Zellsuspension und 50 µl isotonem

HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca durchgeführt. Anschließend kamen die Reaktionsgefäße für 30 min in den Kühlschrank (4 °C).

Nach Zusatz von 100 µl isotonem HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca wurde resuspendiert und anschließend 5 min zentrifugiert (1000 U/min, 4 °C). 150 µl des Überstandes wurden vorsichtig abgehoben und durch 1 ml partikelfreien PBS mit Ca/Mg ersetzt, resuspendiert und in 5 ml Tubes überführt. Die Analyse der Probe erfolgte mittels des Durchflusszytometer (Gallios™ flow Cytometer), der die Fluoreszenz der anhaftenden modifizierten PLGA-Mikropartikeln auf den Zellen ermittelte.

Zellversuch Monolayer

Für diesen Versuch wurden Blaszellen in einer Mikrotiterplatte (96 Well, 17000 Z/Well) angesetzt und bis zur Konfluenz gezüchtet.

Die Zellen wurden zweimal mit 150 µl isotonem HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca gewaschen. Dazu wurde das Medium über den Zellen im Well mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt und durch Puffer ersetzt. Danach kamen die Zellen für 15 min in den Kühlschrank (4 °C).

Die Untersuchung wurde in einer achtfachen Bestimmung, das heißt je 8 Wells pro Mikropartikelsuspension, durchgeführt. Pro Well wurden nun je 50 µl der vorbereiteten Mikropartikelsuspensionen in der HSA-, Plain- oder WGA-Variante eingesetzt. Als Kontrolle dienten 8 Wells mit je 50 µl HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca, um auch die Eigenfluoreszenz der Zellen zu bestimmen. Dann wurde die Mikrotiterplatte 30 min lang im Kühlschrank (4° C) inkubiert.

Die Messung der Fluoreszenz erfolgte mittels Fluoreszenzplattenleser [Tecan®, Gain 80 und Gain 120, 485/525 nm (ex/em), Bottom]. Die erste Messung erfolgte direkt nach der Inkubation (100 %-Wert). Danach wurde dreimal mit je 150 µl HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Ca/Mg gewaschen, wobei zwischen den Waschsritten je 5 min inkubiert (4 °C) und danach die Fluoreszenz bestimmt wurde.

Nach der letzten Messung wurde die Mikrotiterplatte für 60 min in den Kühlschrank (4 °C) gestellt. Anschließend wurden von jedem Well 100 µl Überstand abgehoben, in leere Wells überführt und die gesamte Mikrotiterplatte am Fluoreszenzplattenleser [Tecan®, Gain 80 und Gain 120, 485/525 nm (ex/em), Bottom] analysiert.

Danach wurde dreimal mit 150 µl N-Acetyl-D-Glucosamin-Lösung (11 mg/ml in HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4) gewaschen, mit je 10 min Inkubation (4 °C) zwischen den Waschsritten und anschließender Messung am Fluoreszenzplattenleser [Tecan®, Gain 80

und Gain 120, 485/525 nm (ex/em), Bottom]. Zum Schluss wurden alle Wells mit 150 µl HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 befüllt und die Fluoreszenz ermittelt.

10.2.2. Bindung von WGA-, HSA-, oder nicht-modifizierten PLGA-Mikropartikeln an Blasenellen nach Zuckerinhibition unter Flussbedingungen

Für diese Untersuchung wurden die Blasenzelllinien SV-HUC, 5637, HT1376, RT112, 647V und T24 verwendet. Weiters wurden PLGA-Mikropartikel mit Bodipy[®] aber ohne Gem-C18 hergestellt, die anschließend mit WGA-, HSA- oder nicht-modifiziert wurden.

Vorbereitung

Die am Ultraschallbad resuspendierten PLGA-Mikropartikel wurden mit dem Fluoreszenzplattenleser [Tecan[®], 100 µl, Gain 80 und Gain 120, 485/525 nm (ex/em), Bottom] auf einen Wert von zirka 1000 FIU eingestellt, indem diese mit HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca verdünnt wurden. Unter dem Mikroskop (Epifluorescence Axio Observer Z1 deconvolution microscopy system, Carl Zeiss) wurde geprüft, ob die PLGA-Mikropartikel nicht zu sehr aggregieren.

Für die Zuckerinhibition wurden Verdünnungsstufen von N,N,N-Triacetylchitotriose hergestellt, wobei die höchste Konzentration 20 µg/ml (Z1) beträgt. Von dieser ausgehend wurden neun Verdünnungsstufen Z2 - Z10 (10 µg/ml; 7,5 µg/ml; 5 µg/ml; 3,75 µg/ml; 2,25 µg/ml; 1,875 µg/ml; 1,25 µg/ml; 0,9375 µg/ml; 0,625 µg/ml) hergestellt.

Zellversuch

Bei dieser Untersuchung wurden Einzelzellen verwendet. Dafür wurden die konfluent angezüchteten Zellen gespalten, gezählt und auf eine Zellzahl von 6 Mio Z/ml eingestellt.

Es wurden 2 leere Mikrotiterplatten (96 Well) benötigt. Zur Vorbereitung wurden bei der ersten Platte 9 Wells und bei der zweiten Platte 42 Wells mit je 50 µl Zellsuspension befüllt. Die Wellplatten und die benötigten Reagenzien wurden für 10 min in den Kühlschrank (4 °C) gestellt.

Die erste Mikrotiterplatte wurde für eine Dreifachbestimmung unter stationären Bedingungen verwendet. Dazu kamen zu der Zellsuspension je 50 µl Mikropartikelsuspension (Plain, HSA oder WGA), sowie 50 µl isotoner HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca. Die Ansätze wurden für 30 min im Kühlschrank (4 °C) inkubiert.

Die zweite Mikrotiterplatte diente für die Untersuchung unter Flussbedingung, die ebenfalls mittels Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. Hierfür kamen in die ersten 3 Wells mit Zellsuspension je 100 µl isotoner HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca, um die Eigenfluoreszenz der Zellen zu bestimmen. In dreimal 3 Wells mit Zellsuspension kamen je 50 µl Mikropartikelsuspension (Plain, HSA oder WGA), sowie 50 µl isotoner HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca. In die restlichen Wells mit Zellsuspension kamen zuerst je 50 µl einer Zuckerlösung (Z1-Z10) und danach je 50 µl WGA-Mikropartikel. Diese Platte wurde für 30 min auf einem akustischen Oberflächenwellenmischer (acoustic mixing system, Booster-Plate, Advalytix[®], Geschwindigkeitsstufe 1) im Kühlschrank (4 °C) inkubiert.

Der Inhalt jedes Wells wurde in ein 2 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und 5 min lang zentrifugiert (1000 U/min, 4 °C). Von dem Überstand wurden je 100 µl abgehoben, durch 1 ml partikelfreien PBS mit Mg/Ca ersetzt und resuspendiert. Der Inhalt jedes Reaktionsgefäßes wurde in ein 5 ml Tube überführt und mittels Durchflusszytometrie (Gallios[™] Flow Cytometer) analysiert.

10.2.3. Ergebnisse und Diskussion

Das Urothel stellt eine Barriere für harnpflichtige Substanzen dar. Dadurch ist die Aufnahme von Arzneistoffen in die Harnblasenwand und somit die Therapie des Blasenkarzinoms erschwert. Durch die Bindung der modifizierten PLGA-Mikropartikel an die Blasenzellen wird die Verweildauer in der Blase erhöht und die Aufnahme des Arzneistoffes in die Zelle wird wahrscheinlicher [21].

Bei diesem Versuch wurde die Bindung von PLGA-Mikropartikeln, die mit WGA-Lektinen, HSA- oder nicht-modifiziert (Plain) waren, verglichen. Dabei wurde eine Inkubationszeit von 30 min bei 4 °C gewählt. Die Zeit beschränkte sich auf die typischerweise verwendete intravesikale Verweildauer von Gemcitabin bei der Standardtherapie [16]. Bei 4 °C befinden sich die Zellen in einem inaktiven Ruhezustand, in dem die PLGA-Mikropartikel ausschließlich an die Oberfläche binden und weitere Zellaktivitäten (z.B. Internalisation) ausbleiben.

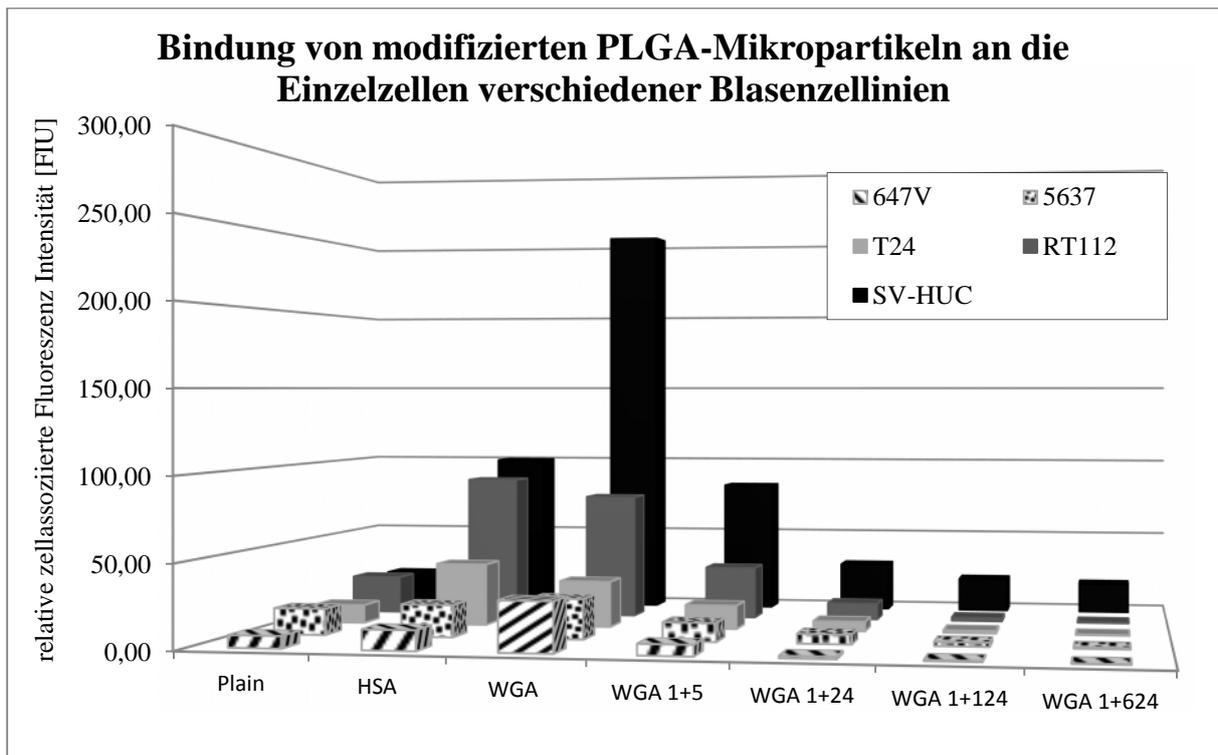


Diagramm 1.: Die Analyse der Bindung von modifizierten (WGA, HSA) und nicht-modifizierten (Plain) PLGA-Mikropartikeln an Einzelzellen verschiedener Blasenzelllinien nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 4 °C

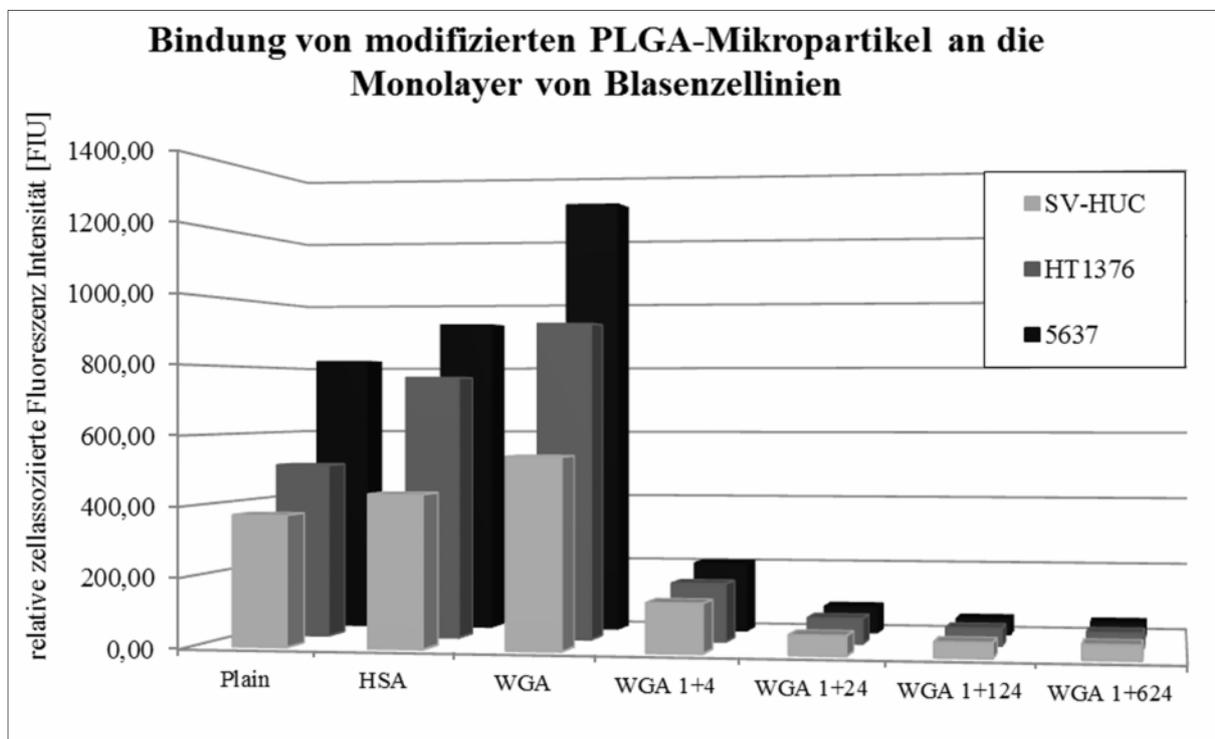
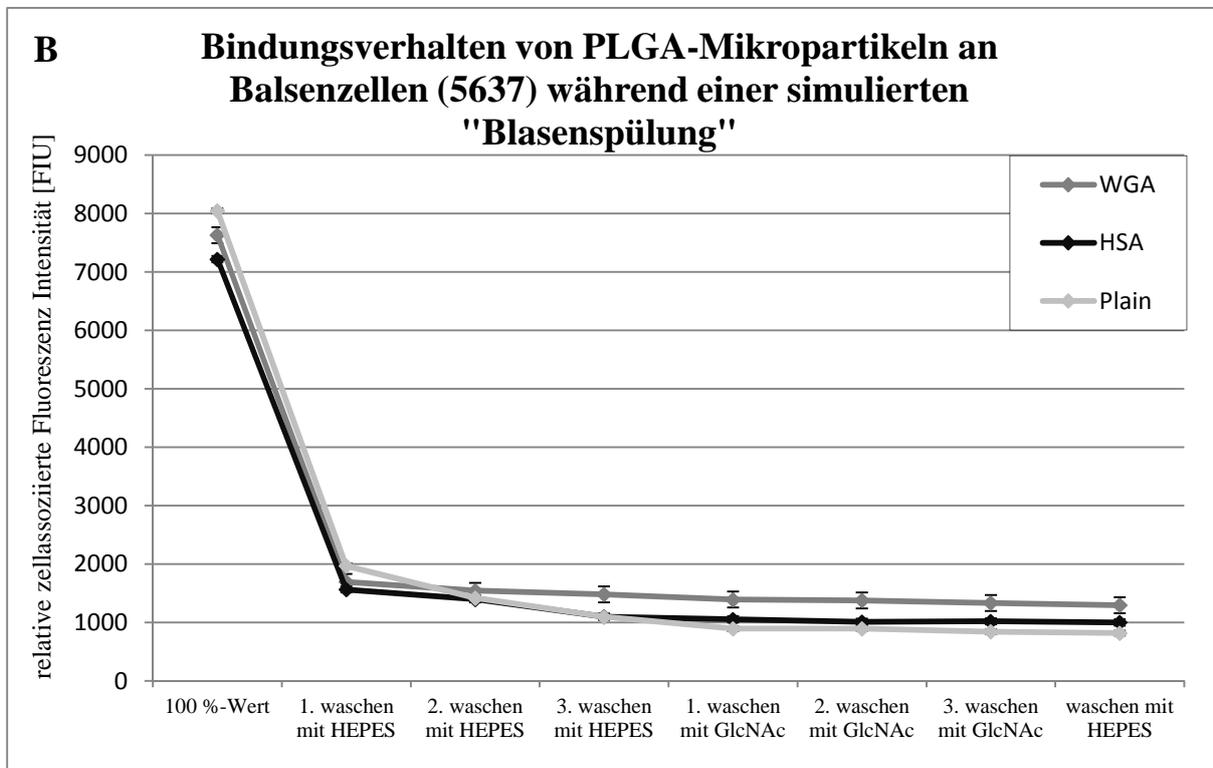
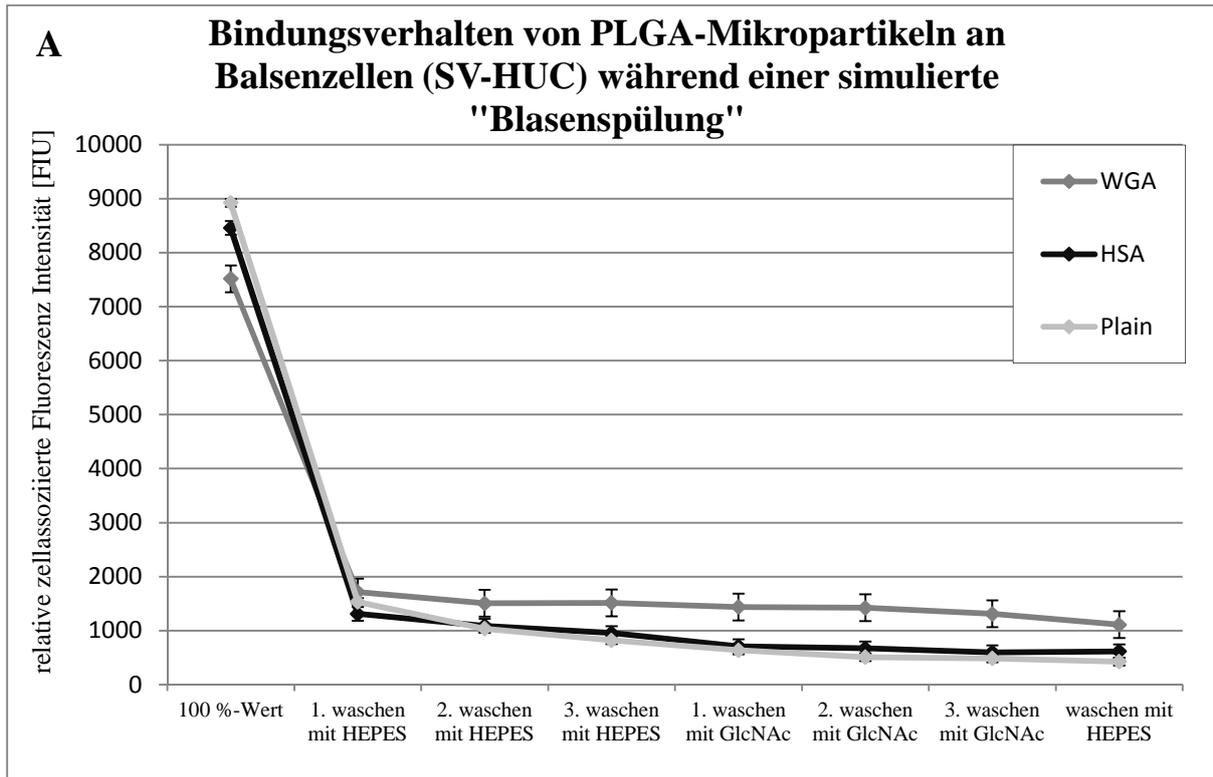


Diagramm 2: Die Analyse der Bindung von modifizierten (WGA, HSA) und nicht-modifizierten (Plain) PLGA-Mikropartikeln an Monolayern verschiedener Blasenzelllinien nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 4 °C

Es gab sowohl bei den Einzelzellen, als auch bei den Monolayern eine signifikant höhere Bindung von PLGA-Mikropartikeln, die mit WGA gekoppelt wurden, im Vergleich zu den anderen PLGA-Mikropartikeln, da WGA spezifisch an die Oberflächenmoleküle N-Acetylglucosamin und N-Acetylneuraminsäure bindet [30]. Die HSA- bzw. die nicht-modifizierten PLGA-Mikropartikel zeigten ebenfalls eine gewisse Bindung an die Blasen Zellen, diese fiel jedoch deutlich geringer aus, als jene von WGA-modifizierten PLGA-Partikeln. Diese Adhäsion ist vermutlich auf eine ionische Wechselwirkung zwischen den geladenen Gruppen des PLGA-Polymers der Mikropartikel und der Gewebeoberfläche zurückzuführen [32]. Ebenso ist eine gewisse Affinität des HSA an die Blasen Zellenwand nicht auszuschließen. Obwohl die Bindungswerte von WGA-modifizierten Mikropartikeln an den meisten Blasen Zellenlinien deutlich höher waren, wiesen die Karzinomzellen RT112 und T24 eine erhöhte Interaktion mit HSA-modifizierten PLGA-Mikropartikeln auf. Diese war sogar geringfügig höher als jene mit WGA-Lektinen. Dabei lagen die HSA-Bindungswerte bei der T24-Zelllinie bei 135 % (Plain 40 %) und die Werte bei der RT112-Zelllinie bei 118 % (Plain 30 %) bezogen auf die FIU von WGA (100 %). Die weiteren Zelllinien ergaben bezogen auf die FIU von WGA (100 %) folgende Werte: SV-HUC: Plain 20 %, HSA 39 %; 5637: Plain 66 %, HSA 80 %; 647V: Plain 25 %, HSA 40 % an den Einzelzellen (Diagramm 1) bzw. SV-HUC: Plain 69 %, HSA 80 %; HT1376: Plain 55 %, HSA 83 %; 5637: Plain 63 %, HSA 72 % am Monolayer (Diagramm 2).

Durch mehrfaches Waschen (viermal mit HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4, dreimal mit N-Acetyl-D-Glucosamin) wurde nachgewiesen, dass die PLGA-Mikropartikel selbst nach mehrfacher, dadurch simulierter „Blasenspülung“ noch an den Zellen haften. Die Zahl der PLGA-Mikropartikel reduzierte sich beim ersten Waschvorgang zwar drastisch, da nun nur mehr jene PLGA-Mikropartikel vorhanden waren, die wirklich an die Zellen banden. Dabei kam es zu einer Minderung der Messwerte bei SV-HUC auf 23 % WGA, 16 % HSA, sowie 17 % Plain, bei 5637 auf 22 % WGA, 22 % HSA, sowie 24 % Plain und bei HT1376 auf 18 % WGA, 18 % HSA, sowie 15 % Plain bezogen auf die FIU vor den Waschschritten. Bei den weiteren 6 Spülungen erfolgte nur mehr eine geringe Reduktion. Am Schluss lagen bei SV-HUC 14 % WGA, 7 % HSA, sowie 5% Plain, bei 5637 17 % WGA, 14 % HSA, sowie 10 % Plain und bei HT1376 15 % WGA, 12 % HSA, sowie 8 % Plain gebunden vor (Diagramm 3 A - C).



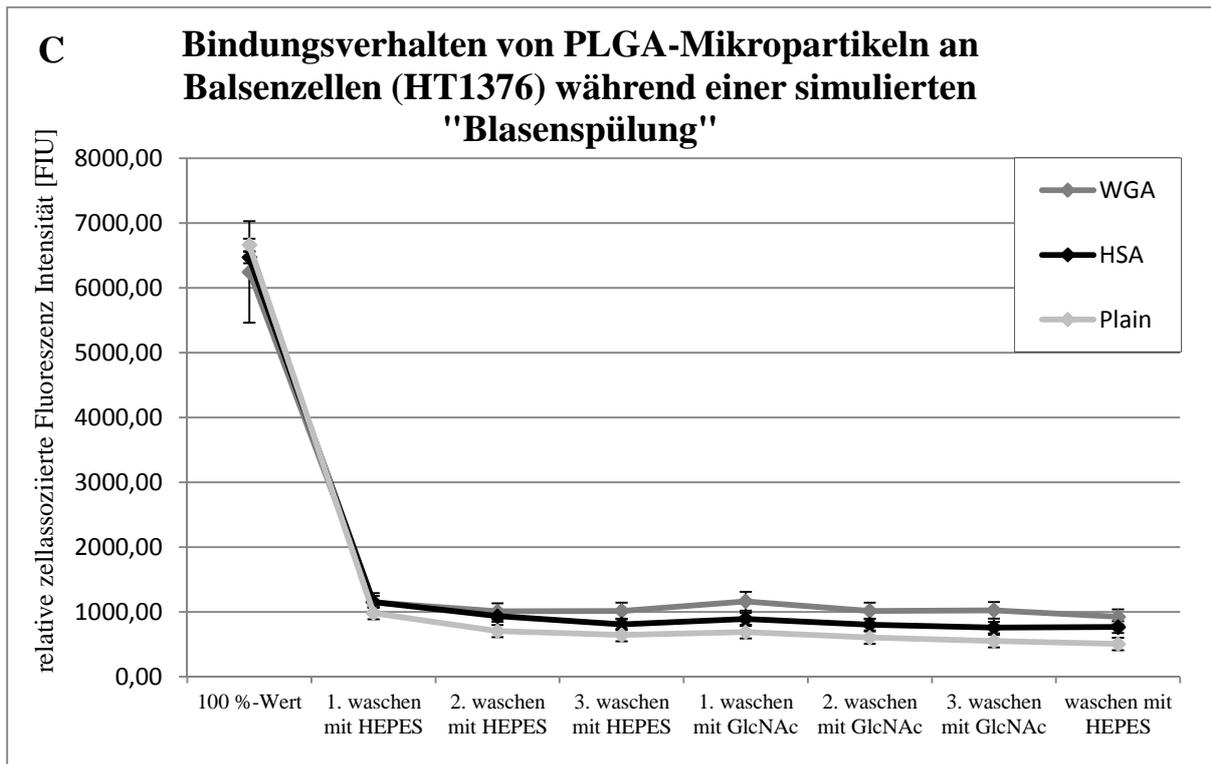


Diagramm 3 A - C: Die Analyse der Bindung von modifizierten (WGA, HSA) und nicht-modifizierten (Plain) PLGA-Mikropartikeln am Monolayer nach 30 min Inkubationszeit bei 4 °C und anschließendem mehrfachen Waschen der Zellen.

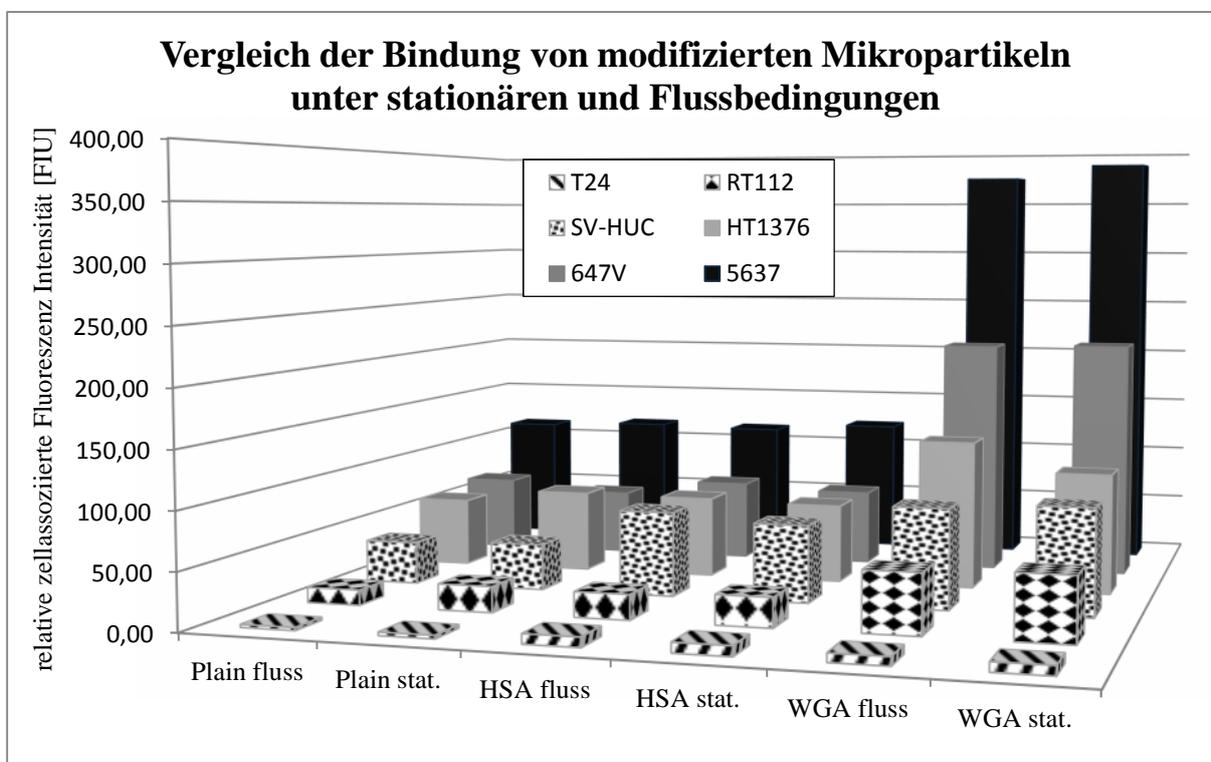


Diagramm 4: Die Analyse der Bindung von modifizierten (WGA, HSA) und nicht-modifizierten (Plain) PLGA-Mikropartikeln an Einzelzellen nach 30 min Inkubation bei 4 °C unter stationären und flow Bedingungen

Überdies wurde der Einfluss von fluid-dynamischen Scherkräften, wie sie in der menschlichen Harnblase vorkommen, auf die Bindungsfähigkeit überprüft. Sowohl bei den 2 Modifikationen, als auch bei den nicht-modifizierten PLGA-Mikropartikeln wurden keine nennenswerte Veränderung unter Flussbedingungen festgestellt (Diagramm 4). Um jedoch genauere Aussagen darüber treffen zu können, müssten mehrere Flussgeschwindigkeiten im Vergleich analysiert werden.

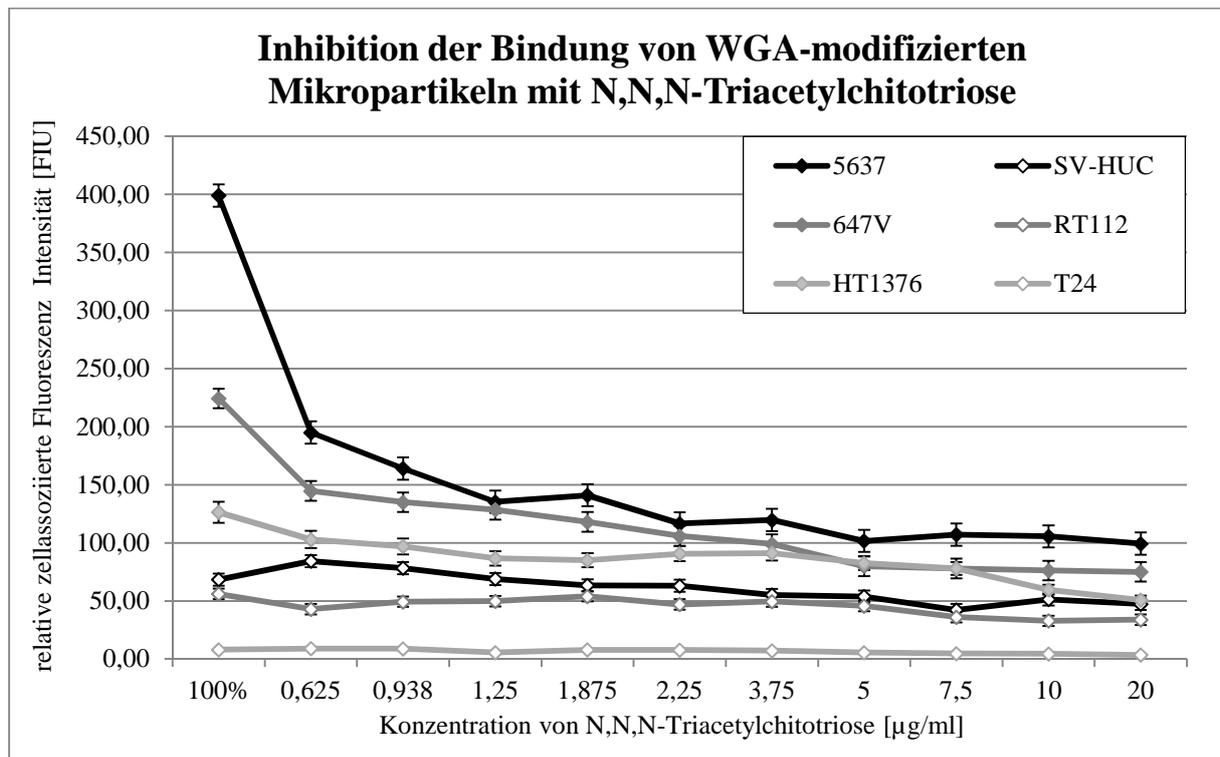


Diagramm 5: Die Analyse der Bindung von modifizierten (WGA, HSA) und nicht-modifizierten (Plain) PLGA-Mikropartikeln an Einzelzellen unter Einfluss von N,N,N-Triacetylchitotriose in verschiedenen Konzentrationen nach 30 min Inkubation bei 4 °C

Durch die Co-Inkubation von N,N,N-Triacetylchitotriose konnte die Bindung von WGA-modifizierten Mikropartikeln an die Mono- und Oligosaccharide von N-Acetylglucosamin und N-Acetylneuraminsäure der Zelloberfläche inhibiert werden, da beide Zucker um die Bindungsstelle am WGA konkurrieren [29, 35]. Bei Zugabe von 0,625 µg/ml Chitotriose war eine Inhibition von bis zu 47 % (5637), bezogen auf die Bindungswerte (FIU) ohne Zugabe von N,N,N-Triacetylchitotriose, zu beobachten. Diese stieg auf 73 % (5637) bei einer Konzentration von 20 µg/ml. Bei den anderen Zelllinien lagen folgende maximale Inhibitionswerte vor: 37 % (RT112), 38 % (SV-HUC), 53 % (T24), 55 % (HT1376) und 60 % (647V), (Diagramm 5). Damit war der Nachweis einer weitgehend

selektiven Bindung von WGA-Lektinen an die Kohlenhydratoberfläche der Blaszellen erbracht.

10.3. Untersuchung der Freisetzung von mikroverkapseltem Gem-C18

Für die Untersuchung der Freisetzung wurden 4 verschiedene Freisetzungsmidien hergestellt: AU [31] mit pH 5 und pH 7,4; HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit RPMI mit 10 % FCS und ohne Indikator, sowie PBS pH 7,4 mit Mg/Ca und SDS (0,05 % bzw. 5 %).

Die verwendeten PLGA-Mikropartikel enthielten Gem-C18 und wurden nicht mit Lektinen modifiziert.

10.3.1. Voruntersuchungen

10.3.1.1. Analyse des Freisetzungsmidiums mittels HPLC

In den Voruntersuchungen wurde überprüft, ob sich durch die verwendeten Freisetzungsmidien eventuell Störungen oder Überlagerungen bei der Analyse mittels HPLC (Agilent Technologies 1100) ergeben könnten.

Dazu wurden 0,08 mg Gemcitabin-HCl bzw. 0,15 mg Gem-C18 mit je 1 ml jedes Freisetzungsmidiums versetzt. Diese Proben wurden lyophilisiert und anschließend in 500 µl EtOAc und 500 µl MeOH aufgenommen. Das anschließende Zentrifugieren (14000 U/min, 4 °C, 3 min) diente der Abtrennung unlöslicher Salze im Medium. Mit der flüssigen oberen Phase wurde eine Analyse mittels HPLC (Agilent Technologies 1100) durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Das Chromatogramm der HPLC (Agilent Technologies 1100) zeigte keine Überlagerungen der Freisetzungsmidien mit Gemcitabin-HCl oder Gem-C18. Es gab auch keine Verschiebung der Substanzpeaks, diese lagen bei den erwarteten Retentionszeiten.

10.3.1.2. Freisetzungsmidium mit 10 % Dimethylsulfoxid

Vor der Herstellung eines Freisetzungsmidiums mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde der Einfluss auf die Stabilität der PLGA-Mikropartikel überprüft.

Es wurden 2 Ansätze untersucht. Dazu wurden 900 µl Partikelsuspension mit 100 µl DMSO 72 std lang bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Der erste Ansatz bestand aus einem Tropfen einer Partikelsuspension, der zweite aus einem Tropfen der inkubierten Partikelsuspension mit DMSO.

Ergebnisse und Diskussion

DMSO ist ein dipolares Lösungsmittel, das potentiell die Freisetzung in das umgebende Medium erhöht und die Mizellenbildung reduziert [25]. In dieser Untersuchung wurde festgestellt, dass DMSO die Partikeloberfläche anlösen kann und somit die PLGA-Mikropartikel zerstört. Folglich war dieses Medium für die Versuche ungeeignet.

10.3.2. Untersuchung der Freisetzung in verschiedenen Freisetzungsmedien

Methode 1:

15 Mikroreaktionsgefäße wurden mit je 1 ml Partikelsuspension befüllt und zweimal mit je 1 ml HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit 0,1 % Pluronic[®]-F68 gewaschen (Zentrifuge: 4000 U/min, 20 °C, 10 min). Beim letzten Waschschrift wurden die Überstände von jeweils 3 Mikroreaktionsgefäßen durch 1 ml desselben Freisetzungsmediums [HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit RPMI (+ 10 % FCS und ohne Indikator) oder PBS mit 0,05 % SDS oder AU pH 5 oder AU pH 7 oder HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit 0,1 % Pluronic[®]-F68] ersetzt. 3 Mikroreaktionsgefäße mit gewaschener Partikelsuspension dienten als 100 %-Wert. Alle Proben wurden unter Schütteln im Brutschrank (37 °C) inkubiert.

Nach 5 Tagen wurden die Proben zentrifugiert (14000 U/min, 4 °C, 10 min) und 800 µl jedes Überstandes in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Überstände (800 µl), die Pellets (200 µl), sowie die 100 %-Werte wurden lyophilisiert, danach in EtOAc und MeOH (500 µl + 500 µl) gelöst, nochmals zentrifugiert (14000 U/min, 4 °C, 10 min) und 500 µl der oberen flüssigen Phase in ein HPLC-Vial überführt. Die Analyse von freigesetztem Derivat erfolgte mittels HPLC (Agilent Technologies 1100).

Methode 2:

Es wurden 32 Mikroreaktionsgefäße mit je 1 ml Partikelsuspension befüllt und zweimal mit HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit 0,1 % Pluronic[®]-F68 gewaschen (Zentrifuge: 4000 U/min, 20 °C, 10 min). Beim zweiten Waschvorgang wurden die Überstände von 9 Mikroreaktionsgefäßen durch AU pH 5, von 15 Mikroreaktionsgefäßen durch PBS mit 0,05 % SDS und von 8 Mikroreaktionsgefäßen durch PBS mit 5 % SDS ersetzt und unter Schütteln im Brutschrank (37 °C) inkubiert. An den Tagen 1, 3, 6, 13, und 24 wurden Proben gezogen (Tabelle 1). Dabei wurden die Mikroreaktionsgefäße zentrifugiert (14000 U/min, 4 °C, 3 min) und von den Überständen je 800 µl Probe entnommen. Sowohl die Proben (800 µl), als auch die Pellets (200 µl) wurden bis zur Analyse wieder unter Schütteln im Brutschrank (37 °C) inkubiert.

Freisetzungs- medium	Anzahl der Gefäße (insgesamt)	Anzahl der gezogenen Proben an den Tagen				
		1	3	6	13	24
AU pH5	9	3x800µl	3x800µl		3x800µl	
PBS mit 0,05 % SDS	15	3x800µl	3x800µl	3x800µl	3x800µl	3x800µl
PBS mit 5 % SDS	8	2x800µl	2x800µl	2x800µl	2x800µl	

Tabelle 1: Untersuchung der Freisetzung - Übersichtstabelle der gezogenen Proben an allen Tagen

Alle gezogenen Proben, sowie die am Schluss übrig gebliebenen Pellets wurden lyophilisiert, mit 250 µl EtOAc und 250 µl MeOH versetzt, zentrifugiert (14000 U/min, 20 °C, 10 min) und die flüssigen oberen Phasen mittels HPLC (Agilent Technologies 1100) analysiert (Diagramm 7).

10.3.3. Untersuchung der Freisetzung mittels Dialyseschlauch

Bei dieser Untersuchung wurde die Freisetzung des Gem-C18 aus den PLGA-Mikropartikeln mittels eines Dialyseschlauches bestimmt.

Zu Beginn wurden Dialyseschläuche (*Molecular Weight Cut Off 12 kDa*) für 30 min in einer 0.5 M EDTA-Lösung und anschließend viermal 30 min lang mit destilliertem Wasser ausgekocht.

4 Dialyseschläuche wurden mit je 0,5 ml Mikropartikelsuspension befüllt. Jeweils 1 Schlauch kam in 150 ml Freisetzungsmittel HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit RPMI (10 % FCS) oder PBS pH 7,4 mit Ca/Mg und 0,05 % SDS oder PBS pH 7,4 mit Ca/Mg und 5 % SDS oder AU pH 5. Ein Magnetrührer hielt das Medium in Bewegung. Das Ziehen der Proben erfolgte nach 4 std, 1 Tag, 4 Tagen und 8 Tagen. Dabei wurde das gesamte Freisetzungsmittel erneuert. Von diesen Medien wurden je zweimal 1 ml in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben und bis zur Analyse eingefroren (- 80 °C), der Rest wurde im Kühlschrank (4 °C) aufbewahrt. Am Schluss wurden die Partikelsuspensionen aus den Dialyseschläuchen in je ein Mikroreaktionsgefäß überführt und zusammen mit den 1ml-Freisetzungsmittels-Proben lyophilisiert, in 500 µl MeOH mit EtOAc (1 + 1) gelöst, zentrifugiert (14000 U/min, 4 °C, 10 min) und die flüssigen oberen Phasen mittels HPLC (Agilent Technologies 1100) analysiert.

Die Freisetzungsmittel, welche nach 4 std erneuert wurden, wurden in 50 ml Kolben überführt und am Rotovapor mit Zuhilfenahme einer Anti-Schaum-Emulsion langsam eingedampft. Die trockenen Proben in den Kolben wurden mit je 30 ml EtOAc mit MeOH (1 + 1) versetzt und am Ultraschallbad für 5 min beschallt (20 °C, 100 %). Da die Löslichkeit

in diesen Medien sehr schlecht war, kamen die Kolben für 12 std bei Raumtemperatur auf einen Schüttler. Nachdem sich der Wirkstoff gelöst hatte, wurden die Kolben stehen gelassen, sodass sich die unlöslichen Salze am Boden absetzen konnten. Vom klaren Überstand wurden je 1 ml Probe in ein Mikroreaktionsgefäß überführt, zentrifugiert (14000 U/min, 4 °C, 10 min) und die flüssigen oberen Phasen mittels HPLC (Agilent Technologies 1100) analysiert.

Von den Medien von Tag 1 wurden je 40 ml entnommen und lyophilisiert. Nach der Trocknung kamen je 2 ml EtOAc und 2 ml MeOH hinzu und die Proben wurden beschallt (Ultraschallbad: 100 %, 5 min, 20 °C). Von diesen Proben wurde je 1 ml entnommen, in einem Mikroreaktionsgefäß zentrifugiert (14000 U/min, 4 °C, 10 min) und die flüssigen oberen Phasen mittels HPLC (Agilent Technologies 1100) analysiert.

10.3.4. Ergebnisse und Diskussion

Die PLGA-Mikroverkapselung dient dem Transport des Wirkstoffes an die Zellmembran und ermöglicht, durch die erhöhte Wirkstoffkonzentration am Zielgewebe, eine erhöhte passive Aufnahme von Gem-C18 in die Zelle. Grundvoraussetzung für eine effektive Therapie ist jedoch die Freisetzung des lipophilen Arzneistoffes aus der Verkapselung.

Bei der ersten Methode ergab sich nach fünf Tagen im Freisetzungsmedium HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit RPMI (+ 10 % FCS und ohne Indikator) eine kumulative Freisetzung von 6,52 %, bezogen auf die verkapselte Menge Gem-C18 in der Partikelsuspension. Diese war mehr als doppelt so hoch wie bei den anderen Medien (PBS/ 0,05 % SDS: 2,46 %; AU pH 5: 1,68 %; AU pH 7: 1,81 %; HEPES/NaOH 0,1 % Pluronic: 1,06 %; Diagramm 6). Jedoch konnte mit diesem Medium nicht weiter gearbeitet werden, da sich das FCS über mehrere Tage bei Raumtemperatur zersetzte und eine starke Geruchsbelästigung entstand.

Auch wurde das Medium mit HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit 0,1 % Pluronic®-F68 nicht weiter verwendet, da dieses die geringste Gem-C18 Konzentrationen aufwies.

AU pH 5 (1,68 %) und AU pH 7 (1,81 %) unterschieden sich in Hinsicht auf die Freisetzungsraten nicht signifikant. Um den Einfluss eines sauren Mediums mit einzubeziehen wurde mit AU pH 5 weitergearbeitet.

Das Akzeptormedium mit PBS und 0,05 % SDS, einem Tensid, ergab sehr gute Ergebnisse. Aus diesem Grund wurde bei der zweiten Methode zusätzlich ein Medium, bestehend aus PBS mit 5 % SDS, verwendet (Diagramm 7). Durch die hohe Tensidkonzentration konnten hier die höchsten Freisetzungswerte (2,11 %, bezogen auf die verkapselte Menge Gem-C18 in der Partikelsuspension) erzielt werden, die sich aber über die Zeit auf 1,18 % reduzierten. Dies könnte womöglich auf eine erhöhte Adsorption des Gem-C18 an die

PLGA-Mikropartikel durch SDS zurückzuführen zu sein. Dadurch würden das Gem-C18 beim Zentrifugieren der Suspension mit den Partikeln abgetrennt werden. Weiters wäre der Abbau des Gem-C18 durch hohe Mengen an SDS eine mögliche Erklärung. Diese zwei Hypothesen müssten aber noch genauer untersucht werden.

Sowohl PBS mit 0,05 % SDS (0,16 %) als auch AU pH 5 (0,13 %) setzten am Tag 1 deutlich weniger Derivat aus den PLGA-Mikropartikel frei, dafür stiegen die Werte bis Tag 3 (PBS mit 0,05 % SDS: 0,40 %; AU pH 5: 0,62 %) an und blieben dann weitgehend konstant. Angesichts dessen, dass sich in dieser Untersuchung das lipophile Gem-C18 in ein hydrophiles Medium freisetzen musste, waren die erzielten Werte in einem akzeptablen Bereich. Durch die hohe Zytotoxizität des Gem-C18 [7] wären diese kleinen Dosen für eine effektive Therapie höchstwahrscheinlich ausreichend.

Bei der Untersuchung der Freisetzung unter Verwendung einer Dialysemembran ergab die HPLC-Analyse (Agilent Technologies 1100) keine Peaks. Dies war wahrscheinlich auf die starke Verdünnung des Gem-C18 in den großen Mengen an FreisetzungsmEDIUM zurückzuführen.

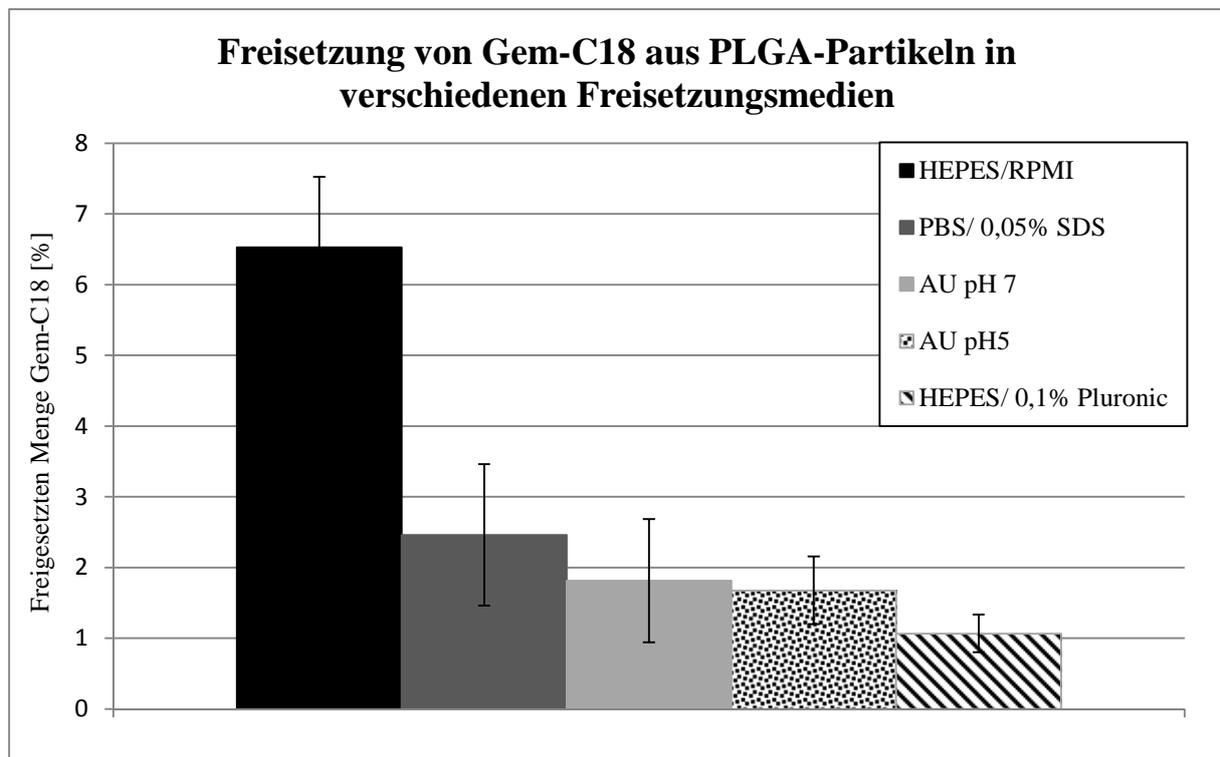


Diagramm 6: Die kumulative Freisetzung von Gem-C18 aus PLGA-Mikropartikeln nach 5 Tagen Inkubation in verschiedenen Freisetzungsmedien

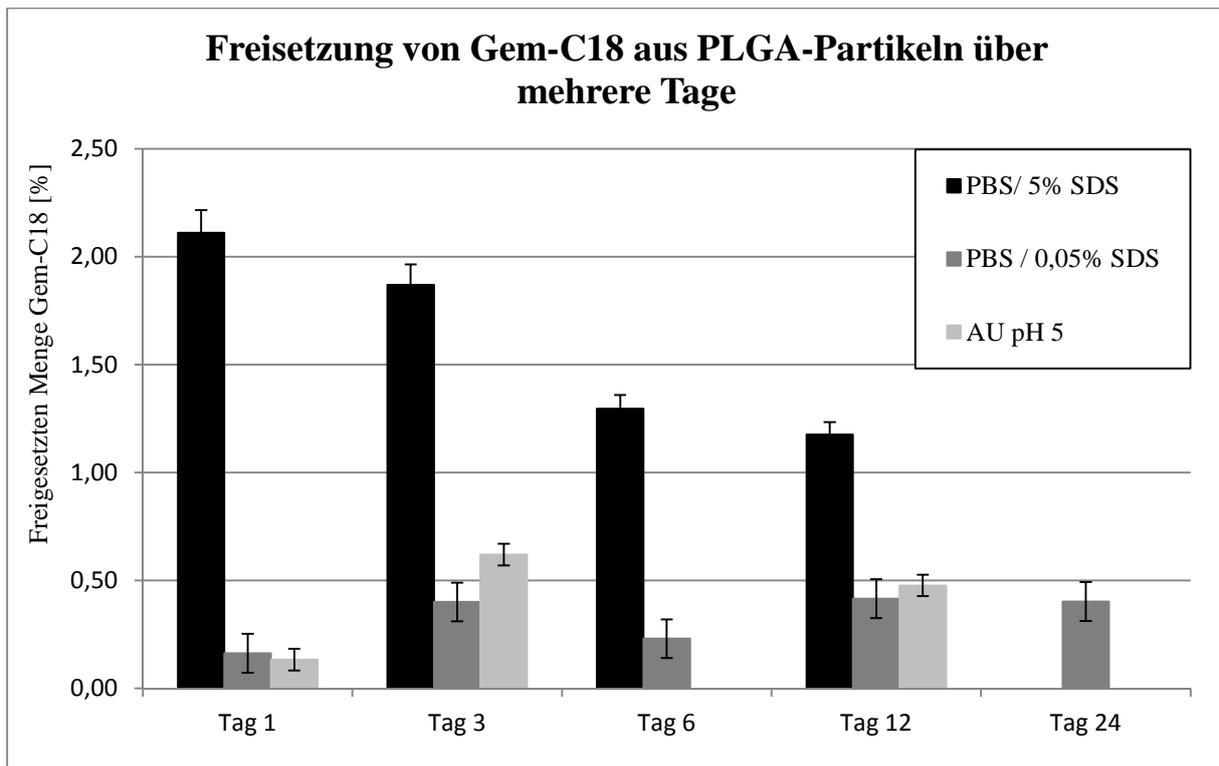


Diagramm 7: Die Freisetzung von Gem-C18 aus PLGA-Mikropartikeln über 24 Tagen in verschiedenen Freisetzungsmitteln. An den Messtagen wurde das jeweilige Medium erneuert

11. 5-N-(Oktadecanoyl)aminofluorescein

Das lipophile Fluo-C18 hat durch seine strukturelle Ähnlichkeit mit dem Gem-C18 vermutlich auch ähnliche Eigenschaften in Hinsicht auf die Freisetzung in ein hydrophiles Medium, sowie Aufnahme und Verteilung in der Zelle. Zusätzlich ist es fluoreszierend, somit kann die Aufnahme in die Zelle einfacher erfasst werden. Die Analytik wäre also nicht auf zusätzliche Hilfsmittel wie Bodipy[®] angewiesen. Bei der Analyse mittels HPLC (Agilent Technologies 1100) gab es keine Überlagerungen mit den Signalpeaks von Gemcitabin und Gem-C18.

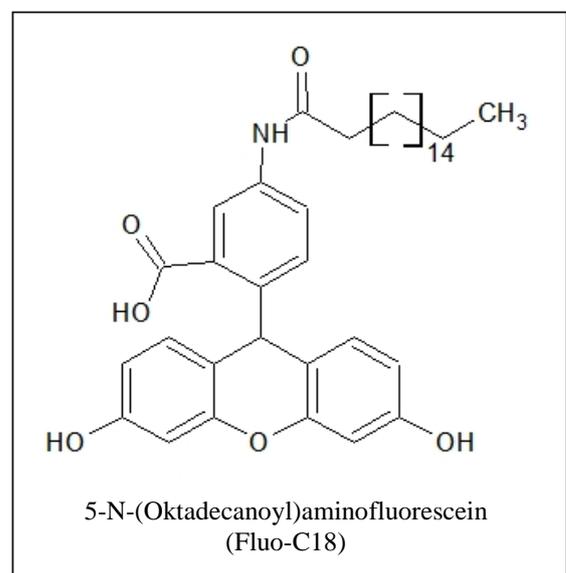


Abbildung 6: Strukturformel des 5-N-(Oktadecanoyl)aminofluoresceins

11.1. Voruntersuchungen mit Fluo-C18

Die Charakteristika von Fluo-C18 sind größtenteils noch unbekannt. Um an die benötigten Informationen über die Eigenschaften von Fluo-C18 zu gelangen, wurde hier die Löslichkeit für die Mikroverkapselung in PLGA-Mikropartikel, sowie für die Freisetzung in hydrophile Medien analysiert. Weiters wurde ein linearer Messbereich für die nachfolgenden Zelluntersuchungen bestimmt, der keine Störungen (wie z.B. Quenching) bei der fluorimetrischen Analyse aufwies.

11.1.1. Löslichkeit von Fluo-C18

Löslichkeit in Ethylacetat:

Eine Einwaage von 10,27 mg Fluo-C18 wurde mit 0,447 µl EtOAc versetzt und für 20 min am Ultraschallbad (20 °C, 100 %) beschallt. Nachdem es sich nur geringfügig gelöst hatte, wurden 6,25 µl Isobutanol hinzugefügt. Dies führte zu einem vollständigen Lösen von Fluo-C18. Nach kurzer Zeit war jedoch bei Raumtemperatur eine Trübung sichtbar, die auf ein Ausfallen des Fluo-C18 hindeutete. Daraufhin wurde für 5 min bei 40 °C erneut beschallt und anschließend 6,3 µl Isobutanol hinzugefügt. Beides hatte keinen Einfluss auf die Löslichkeit. Nun wurden 446 µl EtOAc dazu gegeben und nochmals für 5 min bei 20 °C beschallt. Erst nach einer Beschallung bei 50 °C über 5 min ergab sich eine klare Lösung, die länger als eine Std stabil blieb.

Löslichkeit in HEPES/NaOH:

Es wurde 1 mg Fluo-C18 mit 1 ml isotonem HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca versetzt und mittels eines Vortexmischers vermischt. Nachdem keine Löslichkeit sichtbar war wurde für 2 min am Ultraschallbad (20 °C, 100 %) beschallt. Daraus ergab sich ein sichtbares Anlösen, welches nach Abzentrifugieren (14000 U/min, 20 °C, 10 min) des nicht gelösten Fluo-C18 und anschließender Messung des Überstandes mittels Fluoreszenzplattenleser [100 µl; Tecan[®], Gain 120, 484/525 nm (ex/em), Bottom] bestätigt wurde. Es entstand jedoch keine klare Lösung.

Nach 3 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur unter Schütteln hatte sich noch immer nicht das gesamte Fluo-C18 gelöst. Daraufhin wurde mittels eines Ultraschallstabes (20 sek, 20 %, Kühlung mittels Wasserbad; Bandeline electronic, UW 70, Berlin, Deutschland) beschallt. Nach dem Zentrifugieren (14000 U/min, 20 °C, 15 min) wurde die Probe erneut fluorimetrisch [Tecan[®], 100 µl, Gain 120, 484/525 nm (ex/em), Bottom] analysiert. Der Messwert der Probe stieg von 1497 FIU an Tag 1 auf 2083 FIU an Tag 3.

Löslichkeit in DMSO

Es wurden 1,15 mg Fluo-C18 mit 100 µl DMSO und 900 µl isotonem HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca versetzt, am Vortexmischer vermenget, 5 min am Ultraschallbad (100 %, 20 °C) beschallt und zentrifugiert (14000 U/min, 4 °C, 5 min). Nach dem Zentrifugieren war ein Pellet sichtbar. Selbst nach Zugabe von insgesamt 100 µl DMSO und 17,4 ml isotonem HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca war noch immer ein Rückstand erkennbar.

Bei einer zweiten Voruntersuchung lösten sich 1,04 mg Fluo-C18 in 200 µl DMSO nach einer Beschallung am Ultraschallbad (100 %, 20 °C, 3 min).

11.1.1.1. Ergebnisse und Diskussion

Die Löslichkeit von Fluo-C18 ist einerseits für die Verkapselung in PLGA-Mikropartikel, andererseits für die Freisetzung aus den Partikeln maßgebend.

Bei der Herstellung von PLGA-Mikropartikeln wurde Fluo-C18 in EtOAc gelöst. Dies war jedoch nur durch Erwärmung auf 50 °C am Ultraschallbad oder durch Zugabe von Isobutanol, welches aber zu Verunreinigungen führte, möglich. Verunreinigungen werden oft mit Nebenwirkungen in Verbindung gebracht, aus diesem Grund wurde für die Fluo-C18-Mikropartikelherstellung die Methode der Erwärmung auf 50 °C verwendet.

Für die Untersuchung der Freisetzung sollte Fluo-C18 in den jeweiligen hydrophilen Medien löslich sein. In HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca ließ sich Fluo-C18 nicht vollständig lösen. Es sollte aber berücksichtigt werden, dass hier weitaus höhere Mengen von Fluo-C18 in 1 ml HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca analysiert wurden, als später in den PLGA-Partikeln vorlagen. Eventuell könnte hier auch eine Sättigung des Mediums stattgefunden haben, somit wäre natürlich ein vollständiges Lösen des Fluo-C18 nicht möglich. Durch Zugabe von 200 µl DMSO in 17,4 ml HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca entstand eine klare Lösung, jedoch wurde in einer früheren Untersuchung festgestellt, dass DMSO die PLGA-Partikel zerstört und somit für die Untersuchungen der Freisetzung nicht verwendet werden konnte. Für die nachfolgenden Untersuchungen der Freisetzung von Fluo-C18 wurde HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca verwendet.

11.1.2. Verdünnungsreihen zur Ermittlung des linearen Messbereichs in HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 für die Untersuchung an Zellen

Die Verdünnungsreihen dienten einerseits zur Feststellung, ob und in welchem Bereich das Fluo-C18 eine Proportionalität zwischen den Verdünnungen und den fluorimetrisch

gemessenen Werten aufwies, andererseits auch zur Ermittlung einer optimalen Verdünnung für die nachfolgenden Untersuchungen an Zellen.

Verdünnungsreihe einer PLGA-Partikelsuspension in HEPES/NaOH 20mM pH 7,4

Eine PLGA-Partikelsuspension mit Fluo-C18 wurde fünfmal mit isotonem HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca gewaschen (Zentrifuge: 4000 U/min, 4 °C, 5 min). Der fünfte Überstand wurde auf 2 Mikroreaktionsgefäße aufgeteilt, wovon eines mit 14000 U/min das andere bei 4000 U/min bei 4 °C für 10 min zentrifugiert wurde. Dabei sollte festgestellt werden, ob bei einer Umdrehungszahl von 4000 U/min bereits alle PLGA-Mikropartikel entfernt wurden, oder ob eine höhere Drehzahl (14000 U/min) benötigt wird. Von diesen 2 Proben wurden je 8 Verdünnungen (1 + 1) hergestellt. Mit allen Überständen vom Waschen, sowie von den Verdünnungsreihen wurde die Fluoreszenz [Tecan[®], 100 µl, Gain 120, 484/525 nm (ex/em), Bottom] ermittelt. Die entstandenen Pellets wurden verworfen. (Diagramm 8).

Verdünnungsreihe von Fluo-C18 in HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 ohne Ultraschallbeschallung

1,01 mg Fluo-C18 (zerkleinert mit einem Spatel, ohne Beschallung) wurde mit 1 ml isotonem HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca versetzt und gelöst. Nach jeweils einer Gesamtkubationsdauer von 50 min, 6 std, 22 std bzw. 23 std bei Raumtemperatur unter Schütteln wurde zentrifugiert (14000 U/min, 4 °C, 10 min) und die Fluoreszenz der Überstände analysiert [Tecan[®], 100 µl, Gain 120, 484/525 nm (ex/em), Bottom]. Vom Überstand des 22 std-Wertes, sowie vom Überstand des 23 std-Wertes wurde zwölfmal eine 1 + 1-Verdünnungsreihe mit isotonem HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca angefertigt. Da sich bereits ab der neunten Verdünnung die Werte nicht mehr signifikant änderten, wurde die Untersuchung nach der zwölften Verdünnung beendet. Zusätzlich wurde zum Vergleich eine Verdünnungsreihe (1 + 1) mit Natriumfluorescein (4 µg/ml in isotonem HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca) hergestellt (Diagramm 8). Natriumfluorescein ist, im Gegensatz zu Fluo-C18, eine vielfach untersuchte Substanz, deren Eigenschaften größtenteils bekannt sind.

Verdünnungsreihe von Fluo-C18 in DMSO

1,06 mg Fluo-C18 wurden in 200 µl DMSO gelöst und 3 min am Ultraschallbad beschallt. Nach dem Zentrifugieren (14000 U/min, 20 °C, 10 min) wurde die Probe fluorimetrisch [Tecan[®], 100 µl, Gain 120, 484/525 nm (ex/em), Bottom] analysiert. Danach wurde eine

Verdünnungsreihe mit siebzehn 1 + 1-Verdünnungsstufen mit isotonem HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca hergestellt. Bei diesen Verdünnungen wurde ebenfalls die Fluoreszenz gemessen.

Verdünnungsreihe einer ungewaschenen PLGA-Mikropartikelsuspension

Von einer ungewaschenen PLGA-Partikelsuspension mit Fluo-C18 wurde eine Verdünnungsreihe von siebenmal 1 + 1-Verdünnungen in HEPES/NaOH pH 7,4 hergestellt. Diese wurden zuerst lyophilisiert, in 500µl MeOH und EtOAc (1 + 1) gelöst und mittels HPLC (Agilent Technologies 1100) analysiert.

11.1.2.1. Ergebnisse und Diskussion

Diese Untersuchungen dienten zur Ermittlung einer geeigneten Verdünnung einer Fluo-C18-Partikelsuspension, die für die „Untersuchung der Freisetzung mit Aufnahme von Fluo-C18 in die Zelle“ verwendet werden konnte.

Bei Fluo-C18 gab es, wie bei vielen Fluoreszenzfarbstoffen, durch Verdünnung nicht immer ein lineares Ergebnis, da es in hohen Konzentrationsbereichen, auf Grund hoher Anregungsintensitäten, zu einer reversiblen Fluoreszenzlöschung (Quenching) durch innere Konversionen kommen kann. Dadurch entsprechen die gemessenen Werte der Fluoreszenzintensität nicht der tatsächlichen Konzentration in der Probe. In diesem Fall wäre eine HPLC-Analyse vorteilhaft.

Bei der fluorimetrischen Analyse der Verdünnungen der Überstände der Partikelsuspensionen ergaben sich größere Schwankungen (Diagramm 8), vor allem bei dem Überstand nach 22 std, sowie dem Überstand nach 23 std Inkubation. Der leichte Anstieg bei der Messung im Bereich der Verdünnungen von 1 + 3 und 1 + 7 war auf das zuvor erwähnte reversible Quenching zurückzuführen. Bestätigt wurde dies durch die HPLC-Analyse (Agilent Technologies 1100, Diagramm 9).

In den nachfolgenden Versuchen wurde eine Verdünnung der Suspension von 1 + 49 angewendet. Dieser Wert befand sich in unserem Diagramm zwischen 1 + 31 und 1 + 63 und somit in einem akzeptablen Bereich der entstandenen Kurve. Weiters wurden die Proben immer doppelt bestimmt, einmal durch die Messung der Fluoreszenz und einmal durch die Analyse mittels HPLC (Agilent Technologies 1100), um genaue Ergebnisse zu erzielen.

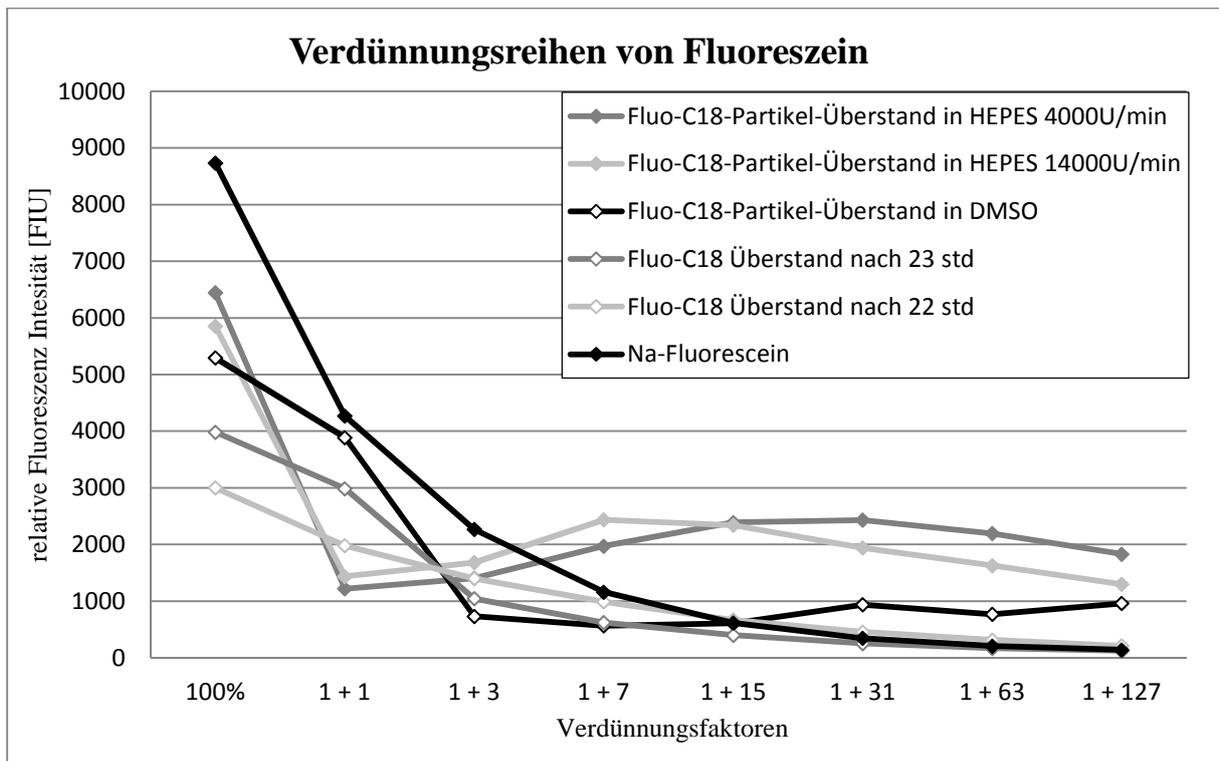


Diagramm 8: Die fluorimetrische Analyse einer Verdünnungsreihe von Fluo-C18 PLGA-Mikropartikeln und dessen Überständen

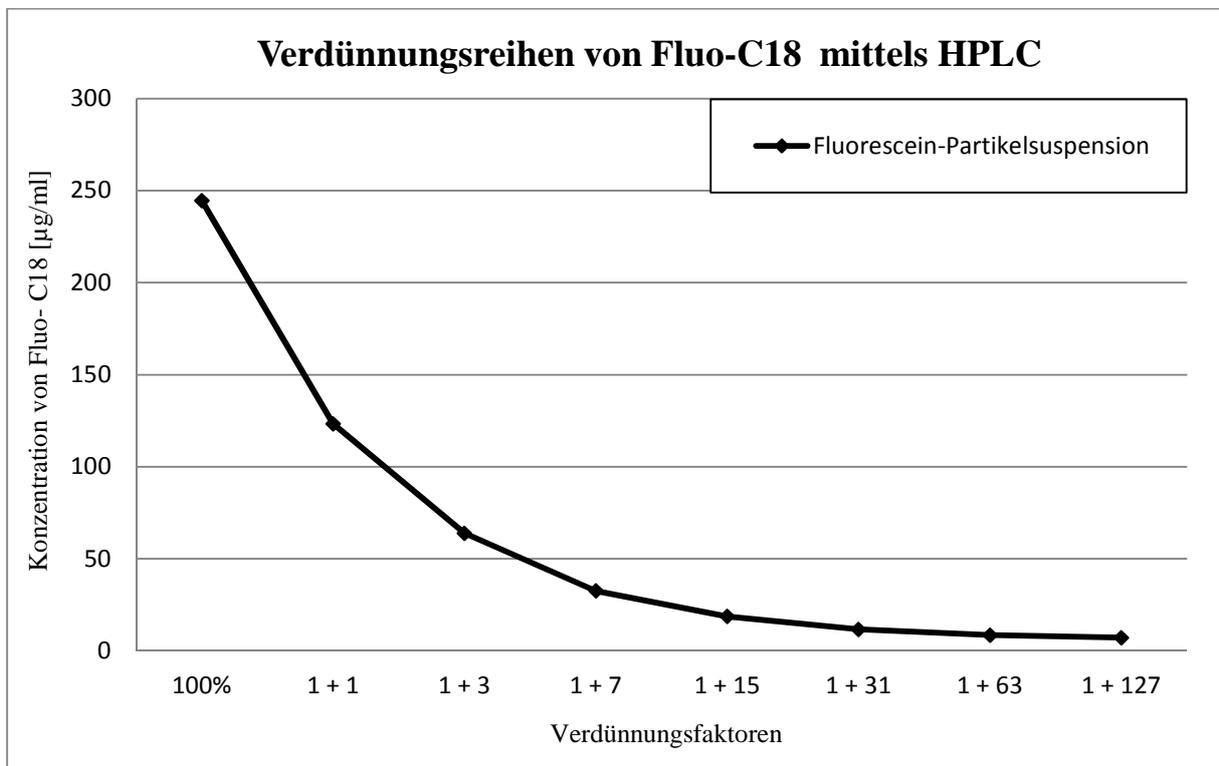


Diagramm 9: Die HPLC-Analyse einer Verdünnungsreihe von mikroverkapseltem Fluo-C18

11.1.3. Untersuchung der Freisetzung von Fluo-C18 aus PLGA-Mikropartikeln

Bei der Untersuchung der Freisetzung wurde überprüft, ob sich das lipophile Fluo-C18 aus den Mikropartikeln in ein hydrophiles Medium freisetzen konnte und ob diese freigesetzte Menge an Fluo-C18 über mehrere Tage kumulativ anstieg.

Da bei der Lagerung bereits eine gewisse Freisetzung stattfand, wurde überprüft, ob sich durch mehrfaches Erneuern des Freisetzungsmediums das bereits aus den PLGA-Mikropartikeln freigesetzte Fluo-C18 aus dem Medium entfernen ließ.

11.1.3.1. Untersuchung der freigesetzten Menge an Fluo-C18 aus PLGA-Mikropartikeln über einen Zeitraum von 5 Tagen

In ein Mikroreaktionsgefäß wurden 1,5 ml der Partikelsuspension gefüllt (Probe: 100 %-Wert). Aus dieser Probe wurde eine 1 + 9-Verdünnung der Partikelsuspension in HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit 0,1 % Pluronic[®]-F68 hergestellt. Diese Probe diente als Vergleich einer Fluo-C18 Partikelsuspension, da der 100 %-Wert auf Grund von Quenching nicht genau detektierbar war. 3 weitere Mikroreaktionsgefäße wurden ebenfalls mit 1,5 ml Partikelsuspension befüllt und zentrifugiert (14000 U/min, 20 °C, 10 min). Jeweils 1 ml Überstand wurde abgehoben und in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt (Proben 1 bis 3). In diesen Überständen befanden sich noch kleine PLGA-Mikropartikel, die nicht durch das Zentrifugieren abgetrennt werden konnten. In den folgenden fünf Tagen wurde analysiert, ob die Freisetzung aus diesen kleinen Partikeln die Messwerte der Überstände noch signifikant beeinflussen könnten.

Aus jedem Mikroreaktionsgefäß wurden 100 µl des Überstandes entnommen, mittels Fluoreszenzplattenleser [Tecan[®], Gian 120, 484/525 nm (ex/em), Bottom] analysiert (Messwert Tag 1) und wieder in die Probengefäße rückgeführt. Die Ansätze wurden mit Alufolie vor Licht geschützt und bei 33 °C unter Schütteln inkubiert. An Tag 1, Tag 2 morgens und abends, Tag 3, Tag 4 und Tag 5 wurden erneut 100 µl des Überstandes jeder Probe mit dem Fluoreszenzplattenleser [Tecan[®], Gian 120, 484/525 nm (ex/em), Bottom] analysiert, (Diagramm 10).

11.1.3.2. Untersuchung der freigesetzten Menge an Fluo-C18 aus einer PLGA-Mikropartikelsuspension durch wiederholte Erneuerung des Freisetzungsmediums

Bei der **ersten Untersuchung** wurde eine Partikelsuspension viermal hintereinander mit 1 ml isotonem HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca gewaschen (Zentrifuge: 4000 U/min, 20 °C, 5 min), am Ultraschallbad (100 %, 20 °C, 3 min) beschallt und die Fluoreszenz der jeweiligen Überstände des Waschvorganges wurden mittels Fluoreszenzplattenleser [Tecan[®], 100 µl, Gian 120, 484/525 nm (ex/em), Bottom] bestimmt, (Überstand 1 bis 4). Die Partikelsuspension wurde für 3 std bei Raumtemperatur stehen gelassen, fünfmal wie oben beschrieben gewaschen und die Fluoreszenz gemessen, (Überstand 5 - 9). Nach 1 std bei Raumtemperatur wurde dreimal ohne Beschallung am Ultraschallbad gewaschen und erneut analysiert, (Überstand 10 - 12).

Nach 3 Tagen wurde die Partikelsuspension erneut fünfmal gewaschen, beschallt und die Fluoreszenz gemessen, (Überstand 13 - 17).

Bei der **zweiten Untersuchung** wurde eine Partikelsuspension fünfmal mit 1 ml isotonem HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca gewaschen (Zentrifuge: 4000 U/min, 20 °C, 5 min). Die Fluoreszenz der Überstände wurde mittels Fluoreszenzplattenleser [Tecan[®], 100 µl, Gian 120, 484/525 nm (ex/em), Bottom] analysiert. Bis zum nächsten Waschschrift wurde die Partikelsuspension in den Brutschrank gestellt (37 °C). Am Tag 2, 3, 7 und 8 wurde erneut fünfmal gewaschen und analysiert, (siehe Tag 1).

Alle entstandenen Überstände, sowie die am Schluss vorliegende Partikelsuspension wurden zur Vorbereitung für die HPLC-Analyse (Agilent Technologies 1100) in den Lyophilisator gestellt, anschließend in 500 µl EtOAc und MeOH (1 + 1) aufgenommen und analysiert (Diagramm 11).

Bei der **dritten Untersuchung** wurde eine Partikelsuspension fünfmal mit 900 µl isotonem HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca gewaschen (Zentrifuge: 4000 U/min, 20 °C, 5 min). Die Überstände, sowie die restliche Partikelsuspension wurden lyophilisiert, in 500 µl EtOAc und MeOH (1 + 1) gelöst und mittels HPLC (Agilent Technologies 1100) analysiert.

11.1.3.3. Untersuchung der Freisetzung mittels Dialysemembran

Vorbereitung

Eine PLGA-Partikelsuspension mit Fluo-C18 (1 ml) wurde fünfmal mit 1 ml isotonomem HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca gewaschen (Zentrifuge: 4000 U/min 20 °C, 5 min). Die verwendete Dialysemembran wurde durch Auskochen (einmal 30 min mit 0,5 M EDTA-Lösung, viermal 30 min mit destilliertes Wasser) vorbereitet.

Versuch

Von der gewaschenen Fluo-C18-Partikelsuspension (1 ml) wurden 50 µl in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben, die restlichen 950 µl wurden luftblasenfrei in einen Dialyseschlauch gefüllt, der an beiden Enden zweimal umgeschlagen und mit einer kleinen Büroklammer verschlossen wurde. Als Freisetzungsmittel dienten 1,8 Liter (l) isotoner HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca.

An den Tagen 0, 1, 2, 3, 6 und 14 wurden je 500 µl Freisetzungsmittel entnommen und je 100 µl davon wurden mittels Fluoreszenzplattenleser [Tecan[®], Gain 120, 484/525 nm (ex/em), Bottom] analysiert. Nach Ende des Versuches wurde das restliche Freisetzungsmittel mittels Rotationsverdampfer auf 23,023 g eingedunstet, 1 ml davon wurde für die HPLC (Agilent Technologies 1100) entnommen und das restliche Medium in ein Tube überführt, zentrifugiert (4000 U/min, 20 °C, 10 min) und 100 µl davon fluorimetrisch [100 µl; Tecan[®], Gain 120, 484/525 nm (ex/em), Bottom] analysiert.

Am Tag 14 wurden einmal 50 µl und einmal 100 µl Partikelsuspension aus dem Dialyseschlauch entnommen und die Fluoreszenz [Tecan[®], Gain 120, 484/525 nm (ex/em), Bottom] bestimmt. Danach wurde die gesamte Partikelsuspension, bestmöglich, in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (14000 U/min, 4 °C, 10 min). Von dem entstandenen Überstand wurden ebenfalls eine 50 µl und eine 100 µl Probe fluorimetrisch [Tecan[®], Gain 120, 484/525 nm (ex/em), Bottom] analysiert. Die Reste im Dialyseschlauch wurden mit destilliertem Wasser in ein neues Mikroreaktionsgefäß gespült.

Für die HPLC-Analyse (Agilent Technologies 1100) wurden folgende Proben zuvor lyophilisiert:

- Die Proben des Dialysemittels von Tag 1, 2, 3, 6, und 14 (je 500 µl)
- 50 µl PLGA-Partikelsuspension, die vor dem Versuch entnommen wurden
- 150 µl des Überstandes der zentrifugierten PLGA-Partikelsuspension aus dem Dialyseschlauch

- 500 µl des Überstandes der zentrifugierten PLGA-Partikelsuspension aus dem Dialyseschlauch
- 1,5 ml destilliertes Wasser mit dem der Dialyseschlauch gespült wurde
- 1 ml des eingeeengten Freisetzungsmediums von Tag 14
- 1 ml HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca.
- 1 ml frische, gewaschene PLGA-Partikelsuspension (100 %-Wert)
- Die Überstände, die beim Waschen der PLGA-Partikelsuspension entstanden sind

11.1.3.4. Ergebnisse und Diskussion

Die hergestellten PLGA-Mikropartikel sollten möglichst über einen längeren Zeitraum an der Blasenwand anhaften und dort den Wirkstoff freisetzen.

Mit der „Untersuchung der freigesetzten Menge an Fluo-C18 aus PLGA-Mikropartikeln über einen Zeitraum von 5 Tagen“ konnte gezeigt werden, dass selbst kleinste PLGA-Mikropartikel, welche durch Zentrifugieren nicht abgetrennt werden konnten, eine deutlich erkennbare Freisetzung von Fluo-C18 aufweisen. Auf Grund der Erosion der PLGA-Partikel wurde am ersten Tag bereits die größte Menge Fluo-C18 freigesetzt [23]. Die freigesetzten Mengen der 3 parallel analysierten Proben betragen bei Probe 1 zwischen 52 % (Tag 1) und 88 % (Tag 5), bei Probe 2 zwischen 57 % (Tag 1) und 83 % (Tag 5) und bei Probe 3 zwischen 40 % (Tag 1) und 87 % (Tag 4), bezogen auf die FIU eines Überstandes einer Partikelsuspension (Zentrifuge: 14000 U/min, 20 °C, 10 min) (Diagramm 10).

Die für die Untersuchung der Freisetzung benötigten Partikelsuspensionen konnten aus zeitlichen Gründen nicht direkt vor dem Versuch hergestellt werden. Dadurch war natürlich eine gewisse Freisetzung bei der Lagerung gegeben. Bei der „Untersuchung der freigesetzten Menge an Fluo-C18 aus einer PLGA-Mikropartikelsuspension durch wiederholte Erneuerung des Freisetzungsmediums“ wurde versucht, das bereits freigesetzte Fluo-C18 zu entfernen. In den ersten erneuerten Überständen war jeweils der Großteil des freigesetzten Fluo-C18 enthalten. Durch den ersten Waschschrift wurde der Wert auf 25 % reduziert, bezogen auf eine ungewaschene Partikelsuspension. Dies war vermutlich auf Fluo-C18, das sich durch den Herstellungsprozess noch an der Oberfläche befand, sowie auf die Erosion der PLGA-Partikel zurückzuführen. Ab dem dritten Waschvorgang lag der Gehalt an freigesetztem Fluo-C18 bei unter 2 % (Diagramm 11).

Weiters war aus diesem Diagramm ersichtlich, dass die freigesetzten aliquoten Mengen Fluo-C18 über die Tage leicht abfielen und sich ab Tag 5 eine relativ konstante Diffusion von Fluo-C18 aus den PLGA-Partikeln ergab.

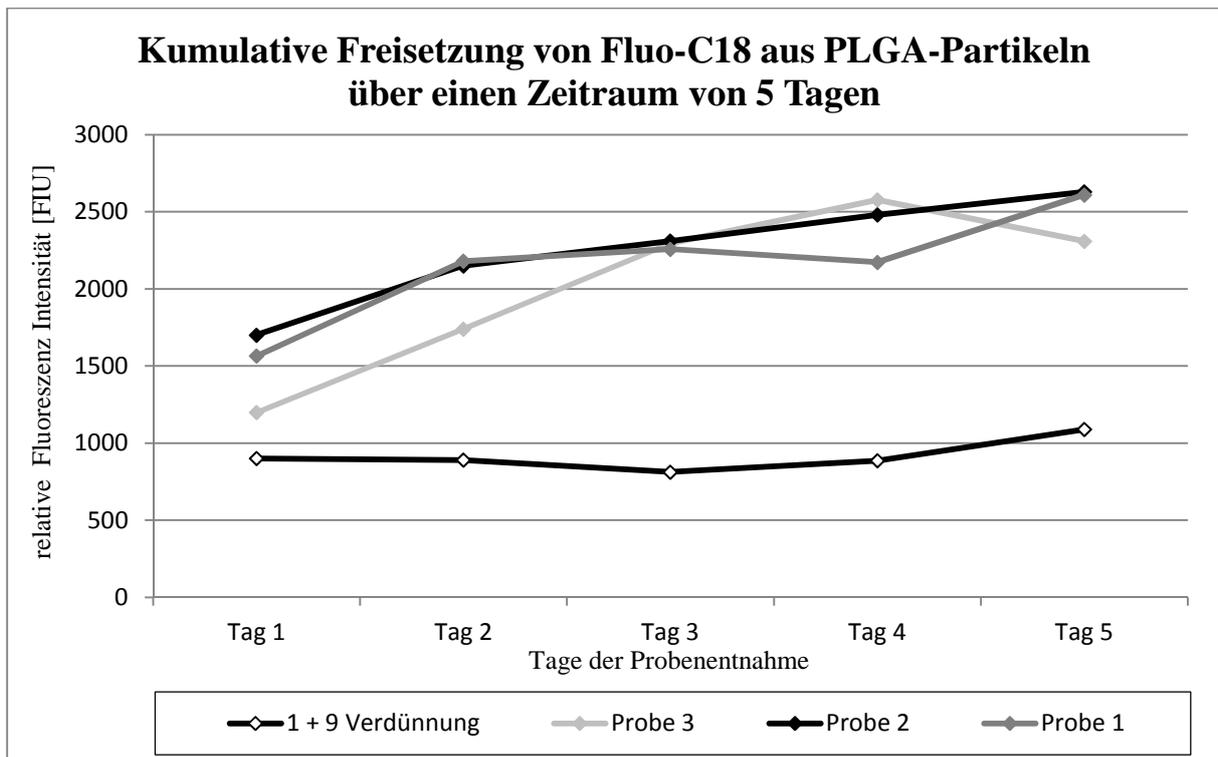


Diagramm 10: Kumulative Freisetzung von Fluo-C18 aus kleinsten PLGA-Mikropartikeln über 5 Tage bei Raumtemperatur auf einem Umlaufschüttler

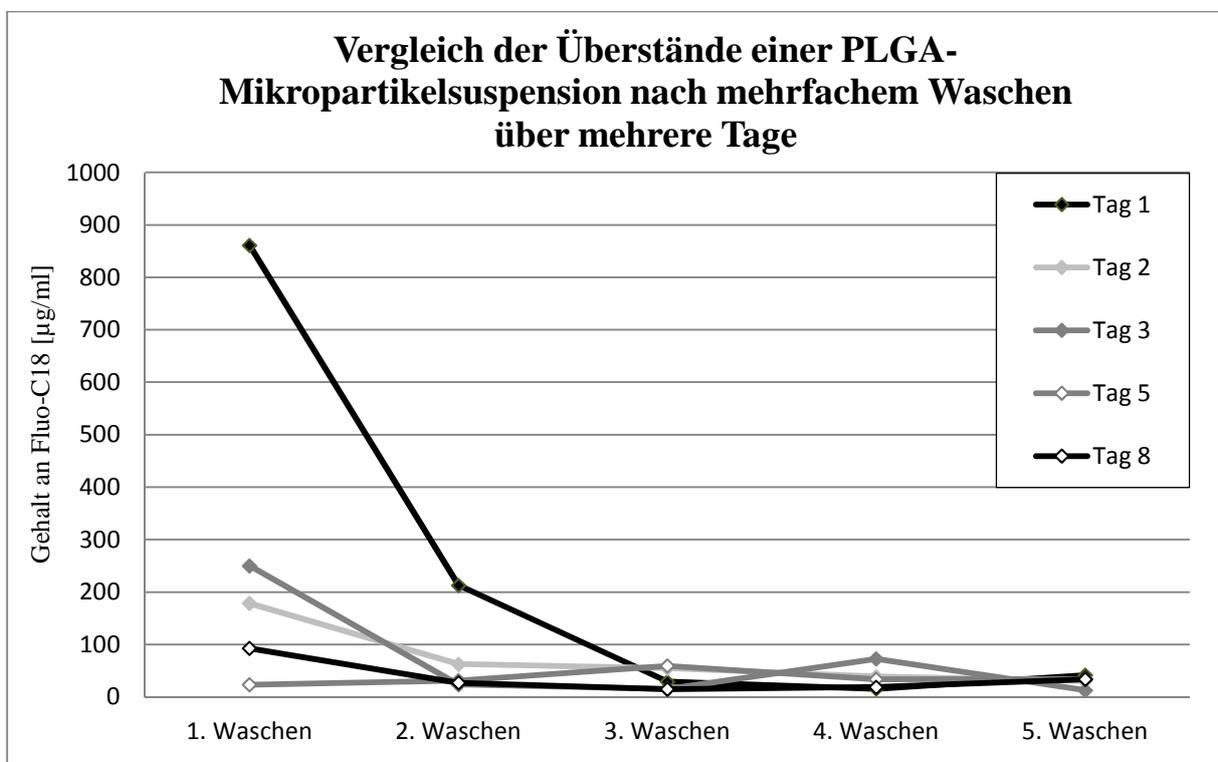


Diagramm 11: Das fünffache Waschen einer PLGA-Mikropartikelsuspension mit der anschließenden Analyse der Überstände mittels HPLC über mehrere Tage

Obwohl bereits beim ersten Waschschrift der größte Teil des bei der Lagerung freigesetzten Fluo-C18 entfernt wurde, wurde für die nachfolgenden Untersuchungen das Medium der Partikelsuspensionen immer fünfmal erneuert, um einen möglichst neutralen Ausgangswert zu erzielen.

Bei der Untersuchung der Freisetzung mittels Dialysemembran ergaben die Auswertungen mittels Fluoreszenzplattenleser [Tecan[®], Gain 120, 484/525 nm (ex/em), Bottom], sowie mittels HPLC (Agilent Technologies 1100) keine verwertbaren Daten. Das Freisetzungsmittel war mit 1,8 l offensichtlich zu groß bemessen.

11.2. Zelluläre Aufnahme von Fluo-C18 aus PLGA-Mikropartikeln in Blaszellen

11.2.1. Vergleich der zellulären Aufnahme von Fluo-C18 in die Zelle mittels direktem Kontakt mit Fluo-C18-Mikropartikeln und indirekten Kontakt durch deren Überstände

Es wurden nicht-modifizierte PLGA-Mikropartikel mit Fluo-C18 hergestellt. Für diese Untersuchung wurden die Blaszelllinien SV-HUC und 5637 verwendet.

Vorbereitung

In einer Mikrotiterplatte (96 Well) wurden, in jeder zweiten Reihe, Zellen angesetzt (17000 Z/Well) und bis zur Konfluenz gezüchtet.

Anschließend wurden 2 Verdünnungen (1 + 49) mit isotonem HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca hergestellt, eine aus der fünfmal gewaschenen Fluo-C18-Partikelsuspension und eine aus dem letzten Überstand der fünfmal gewaschenen Suspension.

Zellversuch

Diese Untersuchung wurde bei 4 °C (Kühlschrank) und bei 37 °C (Brutschrank) durchgeführt. Dazu wurden zuerst die Zellen und alle benötigten Reagenzien in den Kühlschrank beziehungsweise in den Brutschrank gestellt.

Kurz vor Gebrauch wurden die Zellen zweimal mit isotonem HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca gewaschen.

Je 100 µl der 1 + 49 verdünnten Partikelsuspensionen wurden in 4 Wells mit Zellen und in die 4 daneben liegenden leeren Wells pipettiert. In die darunter liegenden 4 Wells, mit und ohne Zellen, kamen je 100 µl des 1 + 49 verdünnten Überstandes. Danach wurden die Proben

fluorimetrisch [100 µl; Tecan[®], Gain 80, 100, 120, 484/525 nm (ex/em), Bottom] analysiert. Dieselben Partikelsuspensionen und Überstände wurden im Abstand von zweimal 60 min und dreimal 20 min in die Wells pipettiert, sodass am Schluss ein 180 min-Wert, ein 120 min-Wert, ein 60 min-Wert, ein 40 min-Wert, ein 20 min-Wert und ein 0-min Wert vorlagen. Beim Messen der Fluoreszenz [Tecan[®], Gain 120, 484/525 nm (ex/em), Bottom] wurden immer alle bereits befüllten Wells analysiert.

Nach der letzten Messung wurden die Wells mit Zellen dreimal gewaschen, indem die Platte 1 min lang auf einen Schüttler gelegt und die Überstände durch 100 µl isotonen HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca ersetzt wurden. Nach jedem Waschschrift wurde erneut die Fluoreszenz bestimmt (Abbildung 13).

Am Schluss wurde mikroskopisch (Epifluorescence Axio Observer.Z1 deconvolution microscopy system; Carl Zeiss) die Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffs in die Zellen bildlich festgehalten (Abbildung nicht gezeigt).

11.2.2. Vergleich zellulären Aufnahme von Fluo-C18 in die Zelle mittels direktem Kontakt mit Fluo-C18-Mikropartikeln und indirekten Kontakt mit Hilfe von Abstandshaltern

Bei diesem Versuch wurde die Aufnahme des Fluo-C18 bei direktem Kontakt der PLGA-Mikropartikel mit der Zelle und bei indirektem Kontakt durch Abstandshalter verglichen.

Vorbereitung

Es wurden nicht-modifizierte PLGA-Mikropartikel mit Fluo-C18 hergestellt. Der Zellversuch wurde mit Blasenzellen der Zelllinie 5637, HT1376 und SV-HUC durchgeführt, die auf Deckgläsern in einer Mikrotiterplatte (12 Well, 60000 Z/Well) konfluent angezüchtet wurden.

Die Fluo-C18-Partikelsuspension wurde fünfmal gewaschen, indem sie zuerst zentrifugiert (4000 U/min 20 °C, 5 min) und dann der Überstand durch isotonen HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca ersetzt wurde.

Von der Partikelsuspension wurde eine 1 + 49 Verdünnung mit isotonem HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca hergestellt. Zusätzlich wurde eine Alexa-WGA-Lösung (0,042 mg/ml, zum Einfärben von Zellmembranen) hergestellt. Um den direkten Kontakt zu verhindern wurden Abstandshalter aus Metall hergestellt, die eine U-Form (1,5 cm x 1,5 cm) hatten und zirka 0,5 cm hoch waren (Abbildung 7).

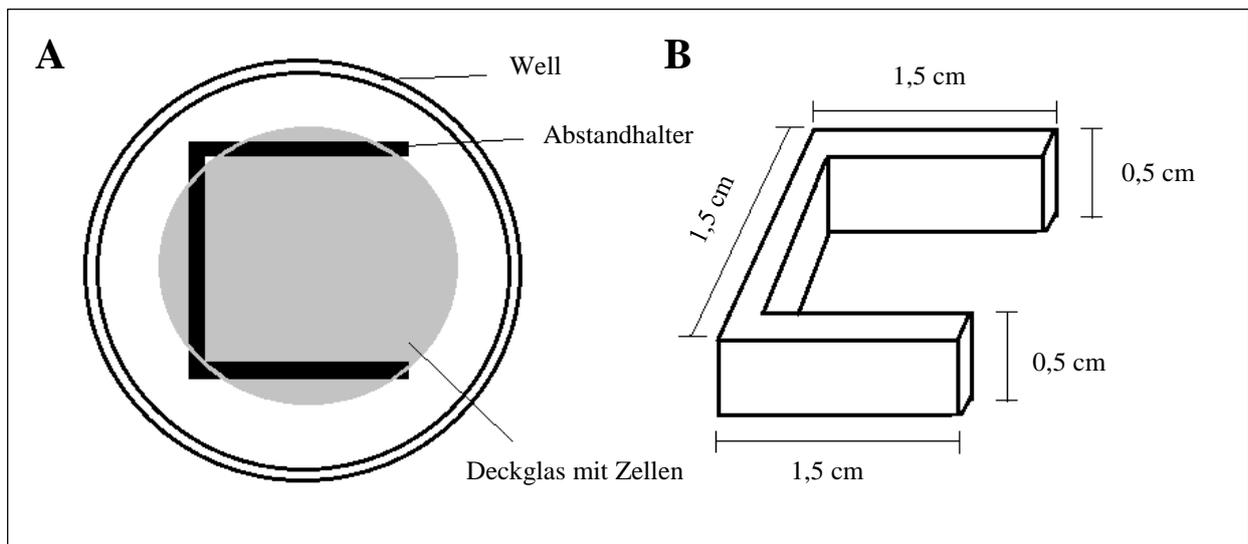


Abbildung 7: A: Die Ausrichtung eines Abstandhalters in einem Well;

B: Skizze eines Abstandhalters

Zellversuch

Diese Untersuchung wurde bei 4 °C (Kühlschrank) und bei 37 °C (Brutschrank) durchgeführt. Für den Versuch mittels indirektem Kontakt kamen in jeweils ein leeres Well ein Abstandhalter, 2,5 ml der verdünnten Partikelsuspension und 250 µl der Alexa-WGA-Lösung. Die Ansätze kamen für 15 min in den Kühlschrank oder in den Brutschrank, damit sich die Partikel absetzen konnten. Dann wurde ein Deckglas mit Zellen gewaschen, indem es mit einer Pinzette aus dem Well herausgenommen wurde, in einem Glas mit isotonem HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca, leicht geschwenkt und vorsichtig über dem Deckglasrand abgetupft wurde. Das Deckglas wurde mit den Zellen nach unten zeigend auf den Abstandhalter gelegt. Ein zweiter Abstandhalter wurde zur Beschwerung auf das Deckglas gelegt.

Für den Versuch mit direktem Kontakt wurde ein Deckglas mit Zellen gewaschen und mit den Zellen nach oben zeigend in ein leeres Well gelegt. Dazu kamen 2,5 ml verdünnter Partikelsuspension, 250 µl der Alexa-WGA-Lösung und 2 Abstandhalter übereinander.

Nach 15 min, 60 min und 120 min Inkubation im Brutschrank bzw. im Kühlschrank wurden je ein Deckglas vom Versuch mit direktem Kontakt, und je ein Deckglas vom Versuch mit indirektem Kontakt in isotonem HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca gewaschen. Die Deckgläser wurden in ein Well einer neuen Mikrotiterplatte mit je 2 ml isotonem HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca transferiert und fluorimetrisch [Tecan[®], Gain 120, 484/525 nm (ex/em), Bottom] analysiert. Zusätzlich wurde beim letzten Messvorgang noch

ein Well mit 2,5 ml verdünnter Partikelsuspension und ein Well mit 2 ml isotoner HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca analysiert.

Anschließend wurde in jedes Well mit Deckgläsern 12,5 µl DAPI (zum Einfärbung des Zellkerns) zugesetzt und für 20 min lang bei 37 °C inkubiert. Die Deckgläser wurden nochmals mit isotonem HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca gewaschen, abgetupft, kurz an der Luft trocknen gelassen und dann mit Fluorsave[®] auf einem Objektträger fixiert. Am Mikroskop (Epifluorescence Axio Observer.Z1 deconvolution microscopy system; Carl Zeiss) wurden Fotos und Z-Stacks erstellt, um die Aufnahme in die Zellen und die Einlagerung in zelluläre Organellen zu beobachten (Abbildung 8 und 9, Diagramm 13).

11.2.3. Vergleich Aufnahme von Fluo-C18 in die Zelle mittels direktem Kontakt mit Fluo-C18-Mikropartikeln und indirekten Kontakt unter Zuhilfenahme einer Dialysemembran

Es wurde die zelluläre Aufnahme von Fluo-C18 durch direkten Kontakt mit PLGA-Mikropartikel und indirektem Kontakt durch deren Überstände (Überstands-Proben) miteinander verglichen. Für die „Überstands-Proben“ wurden die PLGA-Mikropartikel durch eine Dialysemembran von den Zellen ferngehalten. Für diesen Versuch wurden SV-HUC-Zellen in Flexipermis (wiederverwendbares Zellkulturkammersystem aus Silikon) bei Raumtemperatur verwendet.

Vorbereitung

Es wurde eine Spezialapparatur hergestellt, die das Absinken der PLGA-Mikropartikel auf die Zellen verhinderte. Dazu wurde eine 1 ml Pipettenspitze am spitzen Ende aufgeschnitten und dieses Ende wurde mit einer Dialysemembran (*Molecular Weight Cut Off 12 kDa*) überzogen. Für die Vergleichsproben mit den PLGA-Mikropartikeln auf den Zellen (direkter Kontakt) wurde dieselbe Apparatur ohne Dialysemembran hergestellt.

Eine Partikelsuspension wurde fünfmal mit 1 ml isotonem HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca gewaschen (Zentrifuge: 4000 U/min 20 °C, 5 min). Von dieser Suspension ausgehend wurde eine 1 + 11,5-Verdünnung in isotonem HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca hergestellt. Mit dem fünften Überstand, der beim Waschen entstanden ist, wurde eine 1 + 49-Verdünnung hergestellt.

Zellversuch

Es wurden 2 Flexiperms mit je 4 Wells konfluenten Zellen benötigt, dazu wurden pro Well 17000 Zellen angezchtet.

Das erste Flexiperm wurde für die Proben mit Partikelsuspension verwendet. Dazu kamen in jedes Wells zuerst 150 µl isotoner HEPES/ NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca. Bei 2 Wells wurde eine Apparatur mit der Dialysemembran und bei 2 Wells eine Apparatur ohne Dialysemembran eingesetzt. Jede Apparatur wurde mit 50 µl der 1 + 11,5 verdünnten Partikelsuspension befüllt.

Das zweite Flexiperm diente für die Untersuchung der Überstände. Der Versuch wurde analog zu dem ersten Flexiperm durchgeführt, jedoch wurde statt der verdünnten Partikelsuspension eine 1 + 49-Verdünnung des fünften Überstandes verwendet.

Die Zellen in den Flexiperms wurden mikroskopisch (Epifluorescence Axio Observer.Z1 deconvolution microscopy system; Carl Zeiss) beobachtet und jeweils zu bestimmten Zeitpunkten (20 min, 40 min, 60 min, 120 min, 180 min) Fotos und Z-Stacks erstellt (Abbildung nicht gezeigt).

11.2.4. Ergebnisse und Diskussion

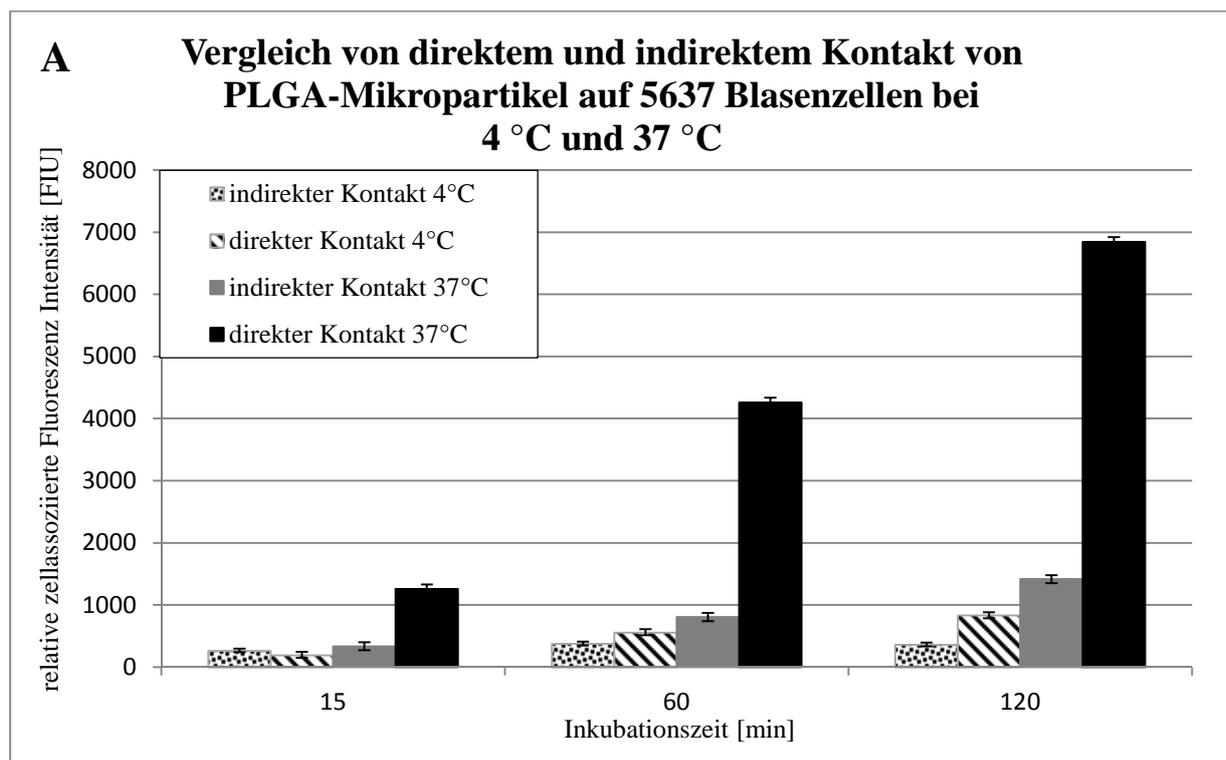
Beim Vergleich der Aufnahme von Fluo-C18 in die Blazenzellen ergaben sich bei allen 3 Versuchen dieselben Ergebnisse. Jene PLGA-Mikropartikel, die einen direkten Kontakt zur Zelloberfläche hatten, zeigten eine erhöhte Aufnahme von Fluo-C18 in die Zellen. Bei indirektem Kontakt bzw. bei indirektem Kontakt mittels Überstand waren die Werte deutlich geringer. Dabei ergab sich bei dem Versuch mit Hilfe eines Abstandshalters bei der Zelllinie 5637 bei 37 °C bereits nach 15 min bei direktem Kontakt ein Wert von 1235 FIU und bei indirektem Kontakt von 282 FIU. Diese Werte stiegen nach 60 min auf 3799 FIU (direkter Kontakt) bzw. 498 FIU (indirekter Kontakt) bis diese bei 120 min einen Wert von 7746 FIU (direkter Kontakt) bzw. 851 (indirekter Kontakt) aufwiesen. Die zwei anderen Zelllinien wiesen bei 37 °C analoge Ergebnisse auf: SV-HUC: 560 FIU (15 min, indirekter Kontakt), 1618 FIU (15 min, direkter Kontakt), 587 FIU (60 min, indirekter Kontakt), 3916 FIU (60 min, direkter Kontakt), 878 FIU (120 min, indirekter Kontakt), 6423 FIU (120 min, direkter Kontakt); HT1376: 334 FIU (15 min, indirekter Kontakt), 1256 FIU (15 min, direkter Kontakt), 806 FIU (60 min, indirekter Kontakt), 4259 FIU (60 min, direkter Kontakt), 1415 FIU (120 min, indirekter Kontakt), 6845 FIU (120 min, direkter Kontakt) (Diagramm 12). Die Untersuchung mit der Partikelsuspension im Vergleich mit deren Überständen ergaben je nach Zelllinie nach 20 min indirekten Kontakt 477 FIU (SV-HUC)

bzw. 2914 FIU (5637), sowie bzw. bei direktem Kontakt 1298 FIU (SV-HUC) bzw. 3124 FIU (5637); nach 60 min bei indirektem Kontakt 1167 FIU (SV-HUC) bzw. 4656 FIU (5637), sowie bei indirektem Kontakt 2774 FIU (SV-HUC) bzw. 6439 FIU (5637); nach 180 min bei indirektem Kontakt 2733 FIU (SV-HUC) bzw. 6272 FIU (5637), sowie bei direktem Kontakt 8893 FIU (SV-HUC) bzw. 10399 (5637), (Diagramm 13). Höchstwahrscheinlich war dies auf die erhöhte Konzentration von Fluo-C18 an den Blasenellen, welche durch den direkten Kontakt zustande kamen, zurückzuführen. Bei indirektem Kontakt verteilte sich das Derivat, nach der Freisetzung aus den Mikropartikeln, im gesamten Medium und erreichte so nur in geringerer Konzentration die Blasenellen. Im Gegensatz dazu setzten die Mikropartikel, welche direkt auf den Zellen verweilten, das Derivat direkt an den Blasenellen frei. Somit entstand eine lokal erhöhte Konzentration von Fluo-C18 (Diagramm 12 und 13). Die mikroskopische Analyse konnte diese Ergebnisse bestätigen. Bei direktem Kontakt war eine signifikant höhere Internalisation von Fluo-C18 in die Zelle ersichtlich. Diese Aufnahme konnte durch einen Kontakt über eine längere Zeit noch signifikant gesteigert werden (Abbildung 8 und 9).

Die Temperatur bei 4 °C und 37 °C wurde gewählt um zu bestätigen, dass die Membranfluidität, die dynamische Funktion der Membranbestandteile und die metabolische Aktivität der Zellen für die Aufnahme und Verteilung des Wirkstoffes in der Zelle mitverantwortlich sind [32]. Die Zellen sind bei 4 °C nicht aktiv, hier ist eine Aufnahme in die Zelle nur geringfügig möglich. Dabei ergab sich bei dem Versuch mit Hilfe eines Abstandshalters bei der Zelllinie 5637 bei 4 °C nach 15 min bei direktem Kontakt ein Wert von 143 FIU und bei indirektem Kontakt von 130 FIU. Diese Werte stiegen nach 60 min auf 280 FIU (direkter Kontakt) bzw. 159 FIU (indirekter Kontakt) bis diese bei 120 min einen Wert von 501 FIU (direkter Kontakt) bzw. 277 (indirekter Kontakt) aufwiesen. Die zwei anderen Zelllinien wiesen bei 4 °C analoge Ergebnisse auf: SV-HUC: 119 FIU (15 min, indirekter Kontakt), 354 FIU (15 min, direkter Kontakt), 256 FIU (60 min, indirekter Kontakt), 801 FIU (60 min, direkter Kontakt), 433 FIU (120 min, indirekter Kontakt), 983 FIU (120 min, direkter Kontakt); HT1376: 267 FIU (15 min, indirekter Kontakt), 194 FIU (15 min, direkter Kontakt), 378 FIU (60 min, indirekter Kontakt), 560 FIU (60 min, direkter Kontakt), 363 FIU (120 min, indirekter Kontakt), 834 FIU (120 min, direkter Kontakt) (Diagramm 12). Die Untersuchung mit der Partikelsuspension im Vergleich mit deren Überständen ergab je nach Zelllinie nach 20 min indirekten Kontakt 77 FIU (SV-HUC), bzw. 687 FIU (5637), sowie nach direktem Kontakt 98 FIU (SV-HUC) bzw. 980 FIU (5637), nach 60 min indirekten Kontakt 93 FIU (SV-HUC) bzw. 1418 FIU (5637), sowie nach direktem Kontakt 115 FIU (SV-HUC) bzw. 840 FIU (5637), nach 180 min indirekten Kontakt

153 FIU (SV-HUC) bzw. 1714 FIU (5637), sowie nach direktem Kontakt 239 FIU (SV-HUC) bzw. 2541 FIU (5637) (Diagramm 13). Bei Körpertemperatur (37 °C, Werte siehe oben) sind die Zellen aktiv an den Internalisationsprozessen beteiligt und somit ergaben sich hier signifikant höhere Werte (Abbildung 12 und 13) Diese Ergebnisse konnten auch bei der mikroskopischen Analyse bestätigt werden. Dabei wurde bei 37°C deutlich mehr Fluo-C18 in die Zelle aufgenommen als bei 4°C (Diagramm 8 und 9).

Die gewählten Zeitpunkte der Analyse sollten veranschaulichen, dass je länger die PLGA-Mikropartikel auf die Zelle einwirkten, umso mehr Fluo-C18 aufgenommen wurde. Bei einer intravesikalen Gabe von Gemcitabin ist meist ein Zeitintervall von 30 min [16] vorgesehen, dieses kann zwar etwas verlängert werden, aber auf Grund der Compliance nicht länger als 1 std [4]. Wahrscheinlich würden sich die hier angeführten Werte bezüglich Bindung und Aufnahme in die Zellen verbessern, wenn diese Fluo-C18-Mikropartikel ebenfalls mit WGA-modifiziert werden würden. Dies müsste aber noch näher untersucht werden.



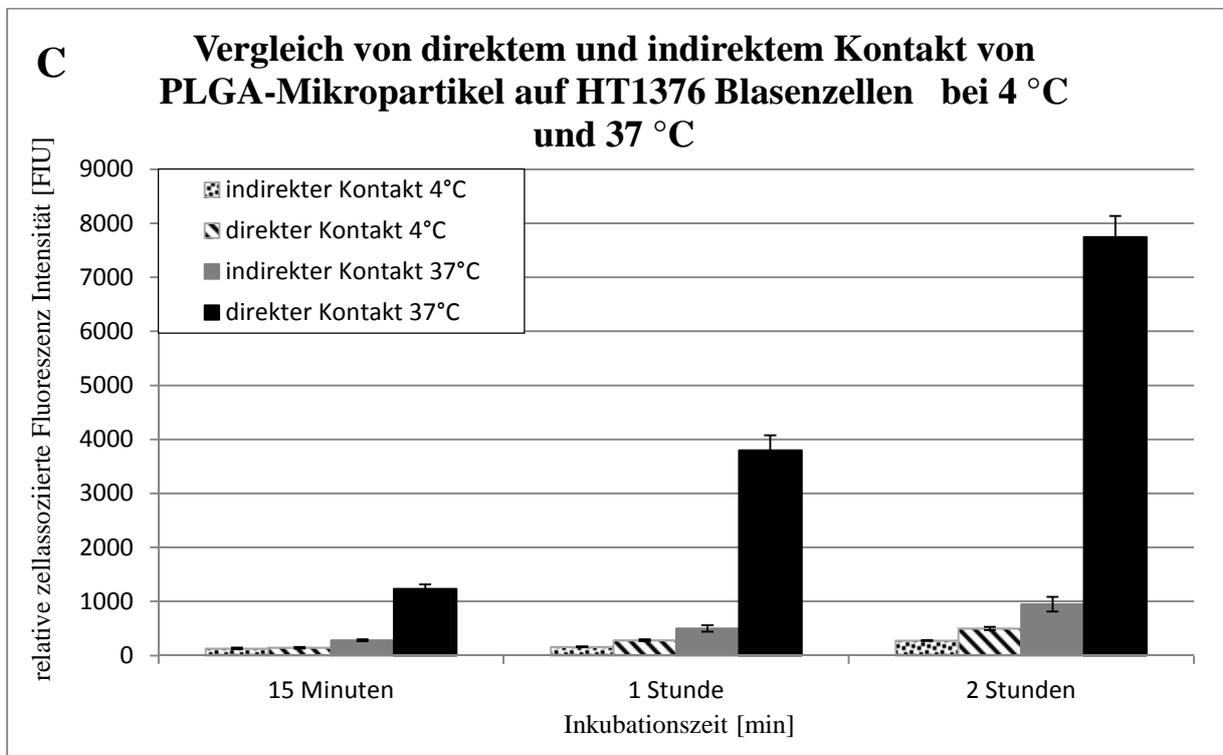
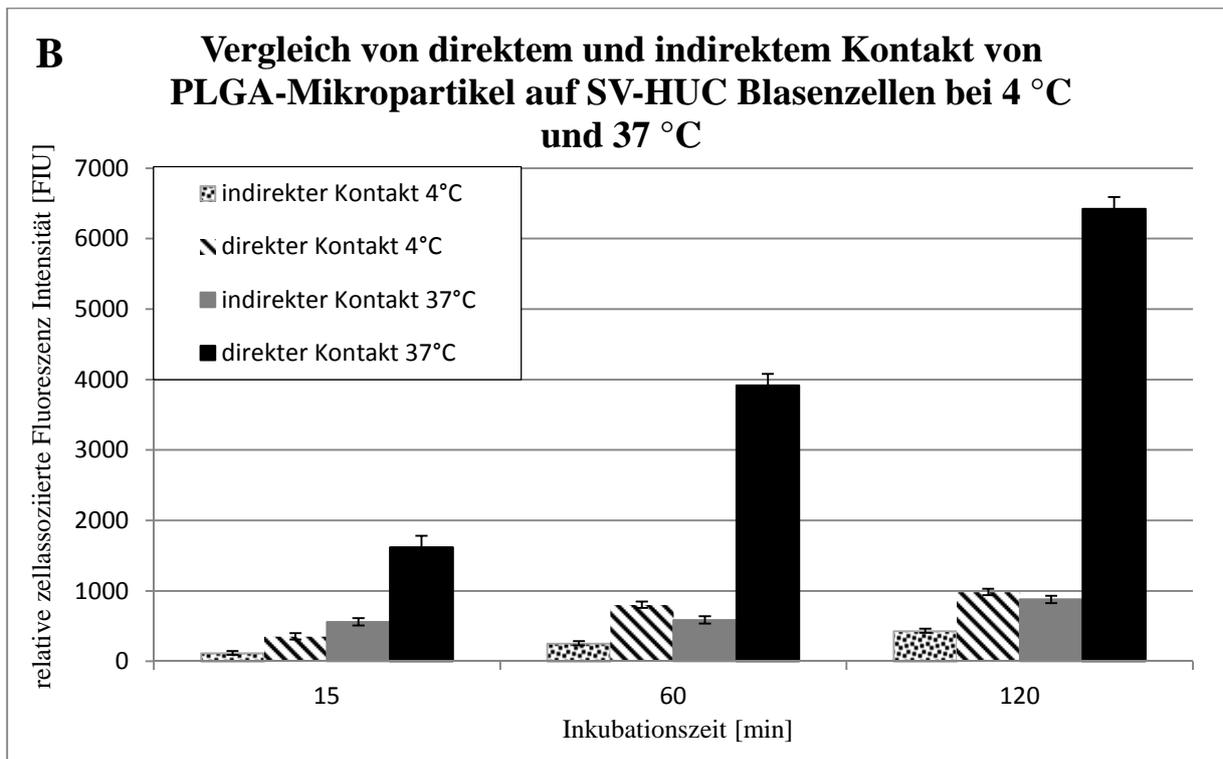


Diagramm 12 A - C.: Die Aufnahme von Fluo-C18 bei direktem und indirektem Kontakt (Abstandhalter) der PLGA-Mikropartikel mit Blasenzellen (5637, SV-HUC, HT1376) bei 4 °C und 37 °C (Abschnitt 2.2.2.)

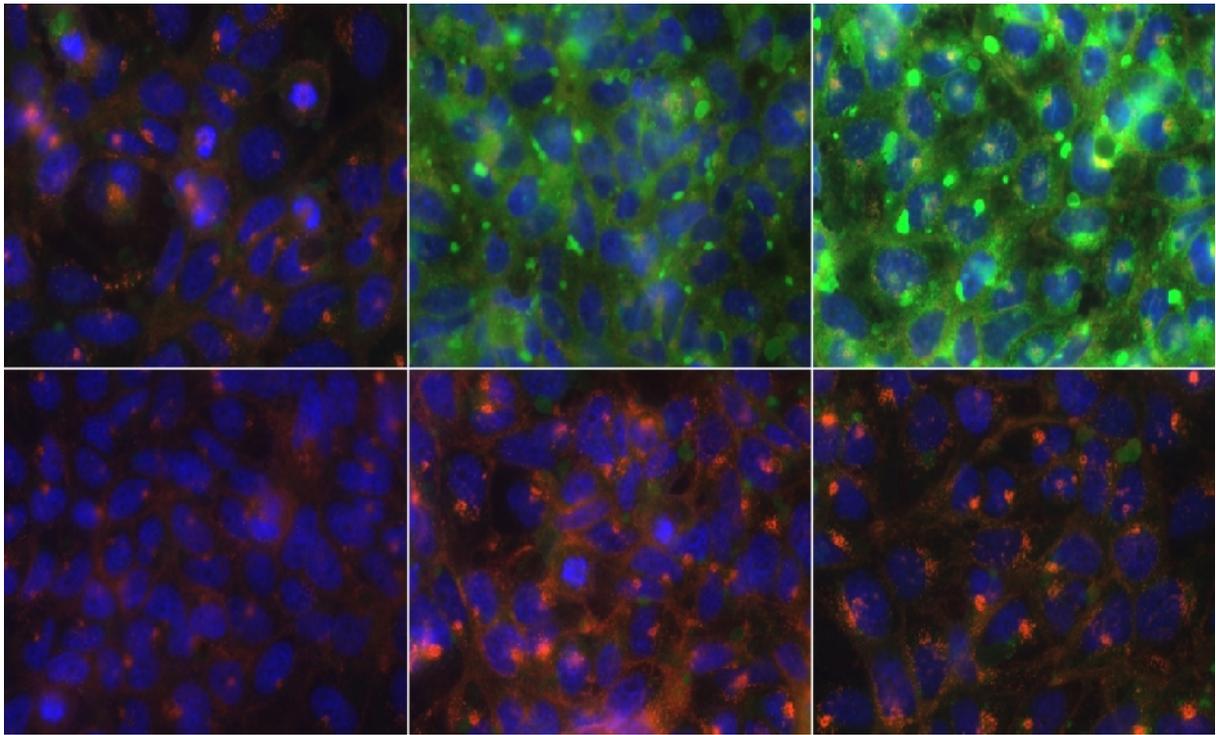


Abbildung 8: Mikroskopisches Bild der Blasenzellen (SV-HUC): Vergleich der Inkubation von PLGA-Partikeln (oben) und dessen Überstände (unten) im Zeitabstand von 15 min, 60 min, 120 min (von links nach rechts, Abschnitt 2.2.2). blau: Zellkern sichtbar gemacht mit DAPI; rot: Zellmembran eingefärbt mit Alexa-WGA; grün: Verteilung von Fluo-C18 in den Zellen

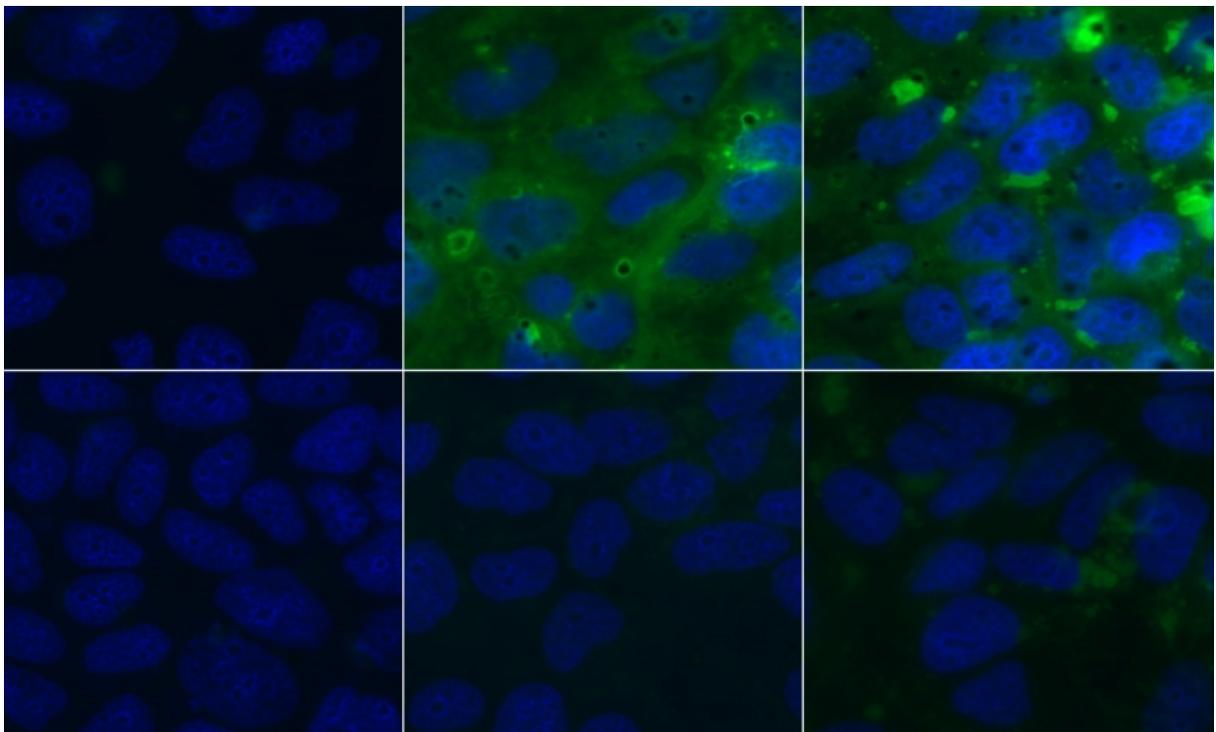


Abbildung 9: Mikroskopisches Bild der Blasenzellen (SV-HUC): Die Bindung von Fluo-C18-PLGA-Mikropartikeln 37 °C (oben) und 4 °C (unten) im Zeitabstand von 15 min, 60 min, 120 min (von links nach rechts, Abschnitt 2.2.1). blau: Zellkern sichtbar gemacht mit DAPI; grün: Verteilung von Fluo-C18 in der Zelle

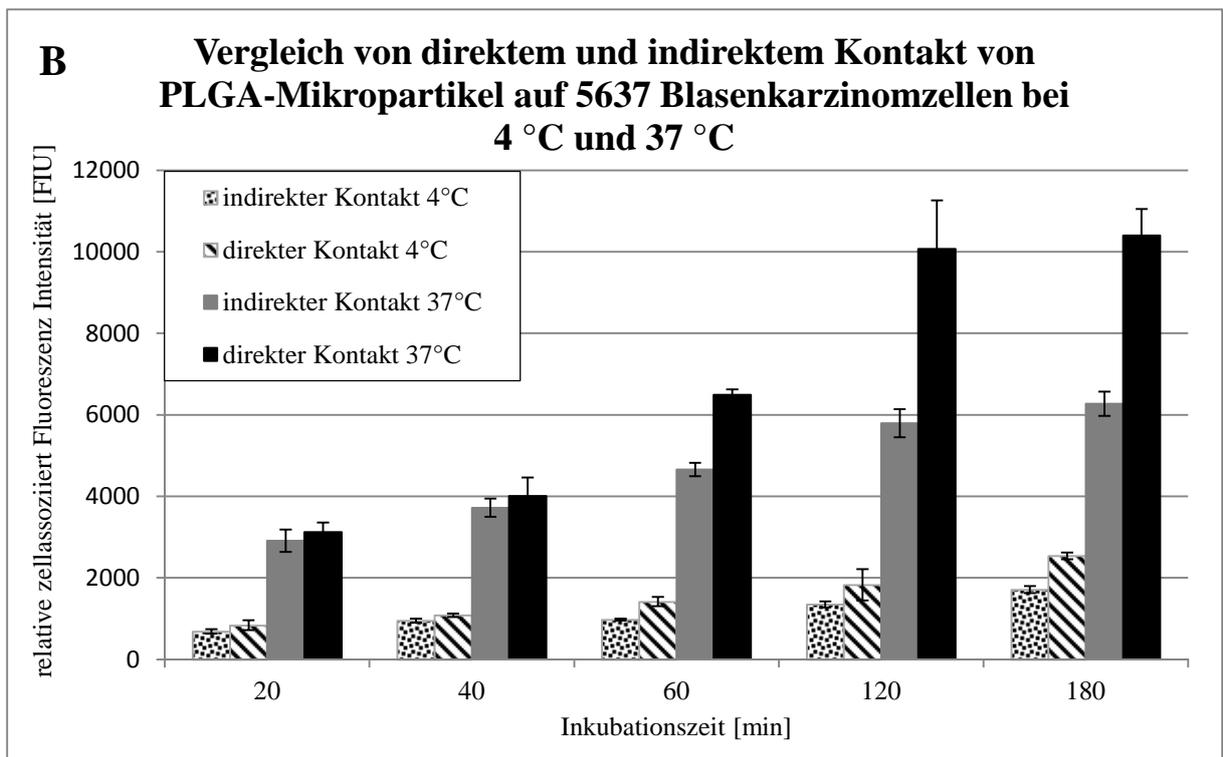
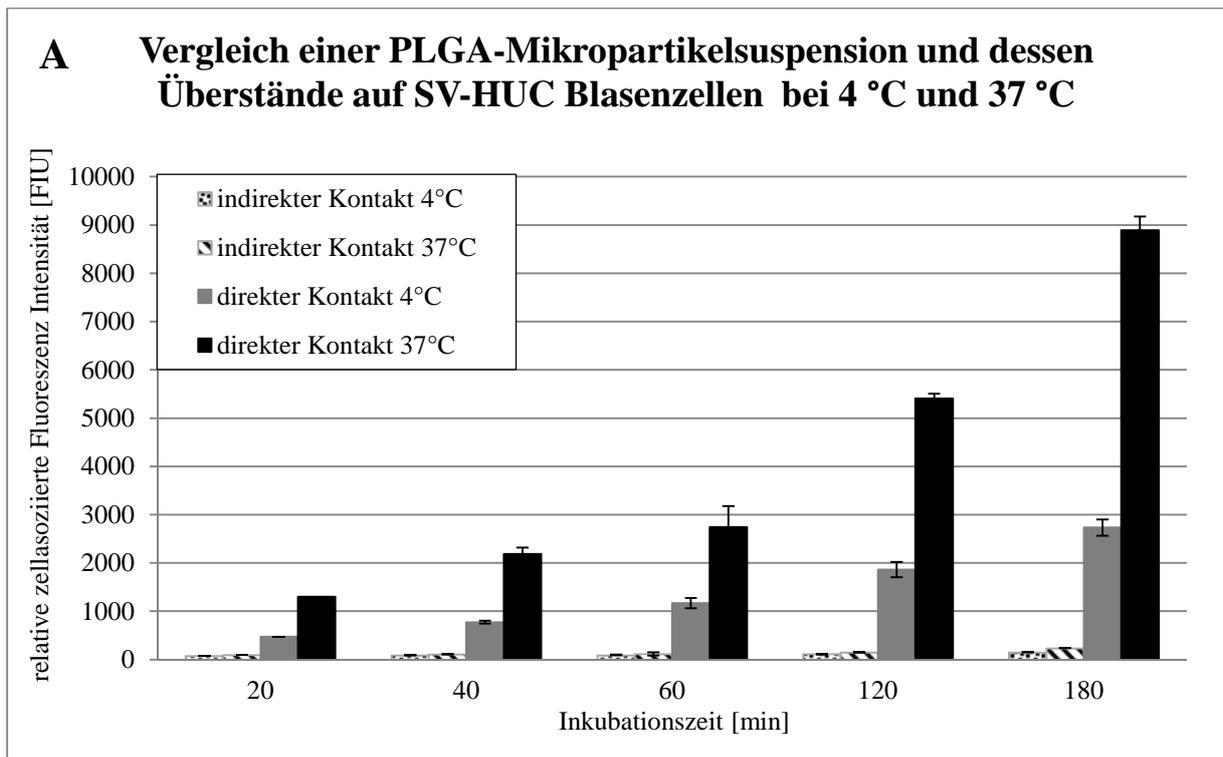


Diagramm 13 A und B: Die Aufnahme von Fluo-C18 bei direktem und indirektem Kontakt (Überstand) der PLGA-Mikropartikel mit Blasenzellen (SV-HUC, 5637) bei 4 °C und 37 °C (Abschnitt 2.2.1)

12. PLGA-Mikropartikel mit Gem-C18 und Fluo-C18

12.1. Untersuchung der Freisetzung von Gem-C18 und Fluo-C18 aus PLGA-Mikropartikeln

Bei diesem Versuch wurde die Freisetzung aus den Partikeln unter zwei verschiedenen Bedingungen miteinander verglichen. Bei den „SINK-Proben“ wurde das Freisetzungsmedium in bestimmten Zeitabständen erneuert, bei den „NON-SINK-Proben“ blieb das Freisetzungsmedium über den gesamten Verlauf des Versuches dasselbe, sodass die Konzentrationen des freigesetzten Gem-C18 und Fluo-C18 fortwährend anstieg.

Vorbereitung

Die Dialyseschläuche (*Molecular Weight Cut Off 1000 kDa*) wurden für 30 min in einer 0,5 M EDTA-Lösung und anschließend viermal 30 min lang mit destilliertem Wasser ausgekocht.

Es wurden PLGA-Mikropartikel mit Fluo-C18 (26,1 mg) und Gem-C18 (22,5 mg) hergestellt. Die PLGA-Mikropartikel wurden fünfmal mit je 1 ml isotonem HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit Mg/Ca gewaschen (Zentrifuge: 4000 U/min 20 °C, 10 min), dabei wurden die Partikel beim fünften Waschschrift mit je 200 µl PBS mit 5 % SDS und Mg/Ca versetzt und dadurch fünffach konzentriert. Ein Tube mit 7 ml Partikelsuspension wurde, wie beschrieben, gewaschen, aber nicht konzentriert.

Versuch

6 Dialyseschläuche wurden luftblasenfrei mit je 1 ml konzentrierter Partikelsuspension befüllt, die Enden wurden viermal umgeschlagen und mit einer Büroklammer fixiert. Jeder Dialyseschlauch kam in ein separates kleines Schraubverschlussglas mit 10 ml Freisetzungsmedium (PBS pH 7,4 mit 5 % SDS) und wurde bei Raumtemperatur auf einen Schüttler gestellt. Die Proben wurden eingeteilt in 3 NON-SINK-Proben (A, B, C) und 3 SINK-Proben (D, E, F).

Bei den „NON-SINK-Proben“ wurden dreimal 100 µl Probe pro Zeiteinheit (Tabelle 2) direkt in ein Well pipettiert und fluorimetrisch [Tecan[®], Gain 120, 484/525 nm (ex/em), Bottom] analysiert. Die Proben wurden danach in das Gläschen rückgeführt.

Aus jedem Gläschen wurde 1 ml Probe in ein HPLC-Vial überführt und für die spätere Analyse mittels HPLC (Agilent Technologies 1100) eingefroren (- 80 °C). Das entnommene

Volumen wurde durch 1 ml frisches FreisetzungsmEDIUM ersetzt, damit das Fassungsvermögen während des Versuches weitgehend konstant blieb.

Die dreimal 100 µl Proben und die 1 ml Proben wurden zu folgenden Zeiten gezogen:

100 µl Proben	0 min	10 min	20 min	30 min	60 min	90 min
	120 min	150 min	180 min	14,5 std	24 std	39 std
1ml Proben	-	-	-	30 min	60 min	90 min
	120 min	150 min	180 min	14,5 std	24 std	116 std

Tabelle 2: Zeitpunkte der Probenentnahme der NON-SINK-Proben

Bei den „**SINK-Proben**“ wurden dreimal 100 µl Probe pro Zeiteinheit (Tabelle 3) direkt in ein Well pipettiert und fluorimetrisch [Tecan[®], Gain 120, 484/525 nm (ex/em), Bottom] analysiert. Dann wurden die Dialyseschläuche mit der Partikelsuspension in ein neues Gläschen mit frischem FreisetzungsmEDIUM überführt. Das Gläschen mit dem bereits verwendeten Medium wurde im Kühlschrank (-80 °C) aufbewahrt und zu einem späteren Zeitpunkt mittels HPLC (Agilent Technologies 1100) analysiert.

Zu folgenden Zeiten wurden die Proben gezogen:

100 µl Proben	30 min	60 min	90 min	120 min
	150 min	180 min	14,5 std	39 std
Medium ersetzen	30 min	60 min	90 min	120 min
	150 min	180 min	14,5 std	39 std

Tabelle 3: Zeitpunkte der Probenentnahme der SINK-Proben

Am Ende des Versuchs wurden noch einmal, wie oben beschrieben, Proben gezogen. Anschließend wurde jede Partikelsuspension aus dem Dialyseschlauch, in ein frisches Gläschen überführt und der Schlauch mit frischem FreisetzungsmEDIUM nachgespült, um möglichst alle PLGA-Mikropartikel zu erhalten.

Dreimal 1 ml nicht-konzentrierte Partikelsuspension diente als 100 %-Wert für die Analyse mittels HPLC (Agilent Technologies 1100).

Vor der Analyse mittels HPLC (Agilent Technologies 1100) wurden die Proben lyophilisiert und danach in 500 µl EtOAc, sowie 500 µl MeOH gelöst. Die Proben wurden für 30 min in den Kühlschrank gestellt, 500 µl der flüssigen oberen Phase wurden mittels HPLC (Agilent Technologies 1100) analysiert.

12.2. Ergebnisse und Diskussion

Die Freisetzung eines Wirkstoffes aus PLGA-Mikropartikeln erfolgt in 2 Phasen. Zuerst kommt es zur Erosion des Wirkstoffes von der Polymeroberfläche, dann zur Freisetzung durch Diffusion aus der Polymermatrix [23].

Bei den Non-Sink-Proben kumulierten die freigesetzten Derivate, bis sie bei 14,5 std ein Plateau (Gem-C18: 25,84 %, Fluo-C18: 32,91 % bezogen auf die Menge in der Partikelsuspension) erreichten (Diagramm 14). Dieses Plateau kam durch die Sättigung des Mediums zustande, und nicht durch das Erreichen einer oberen Grenze der Freisetzungsrates bzw. nicht durch eine Erschöpfung der Diffusion von Gem-C18 und Fluo-C18 aus den PLGA-Partikeln. Dies wurde nach der fluorimetrischen Analyse der Sink-Proben deutlich, bei denen selbst nach 116 std noch eine Freisetzung messbar war.

Die Proben unter Sink-Bedingungen hatten die größte Freisetzungsrates bei 30 min (Gem-C18: 4,37 %, Fluo-C18: 5,31 %), fielen bei 60 und 90 min leicht ab (Gem-C18: 1,73 %, Fluo-C18: 2,11 %), bis sich ab 120 min ein konstanter Spiegel (Gem-C18: 0,81 %, Fluo-C18: 1,04 %) einstellte. (Diagramm 14). Die anfänglich großen freigesetzten Wirkstoffmengen waren auf die Erosion der Fluo-C18- und Gem-C18-Mikropartikel zurückzuführen. Die Sink-Bedingungen spiegelten die tatsächliche Situation in der Blase besser wieder, die durch ständiges Entleeren und erneutes Befüllen charakterisiert ist. Durch die garantierte Freisetzung über Tage unter diesen Bedingungen könnte eine effektivere Therapie erzielt werden.

Beim Vergleich von Sink- und Non-Sink-Bedingungen mittels fluorimetrischer Analyse konnte nur Fluo-C18 detektiert werden, da den PLGA-Mikropartikeln mit Gem-C18 kein Fluoreszenzfarbstoff zugesetzt wurde. Jedoch konnten die bereits oben erwähnten Ergebnisse der HPLC-Analyse (Agilent Technologies 1100) bestätigt werden (Diagramm 15).

Wie bereits zuvor erwähnt, wäre dem Patienten eine intravesikale Therapie über std nicht zumutbar [4]. Wünschenswert wäre daher eine Bindung der PLGA-Mikropartikel an die Blasenwand, die eine Freisetzung über Tage ermöglicht und somit den Therapieerfolg erhöht.

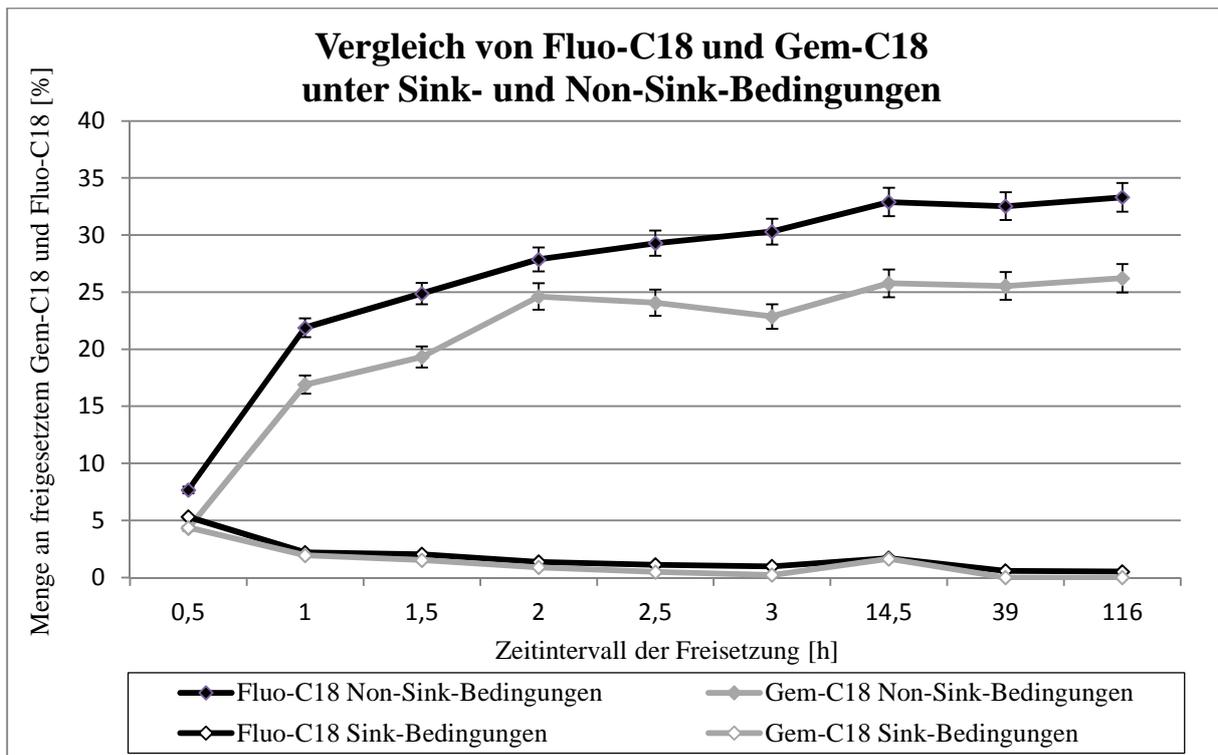


Diagramm 14: Der Vergleich von Fluo-C18 und Gem-C18 unter Sink- und Non-Sink-Bedingungen mittels HPLC-Analyse

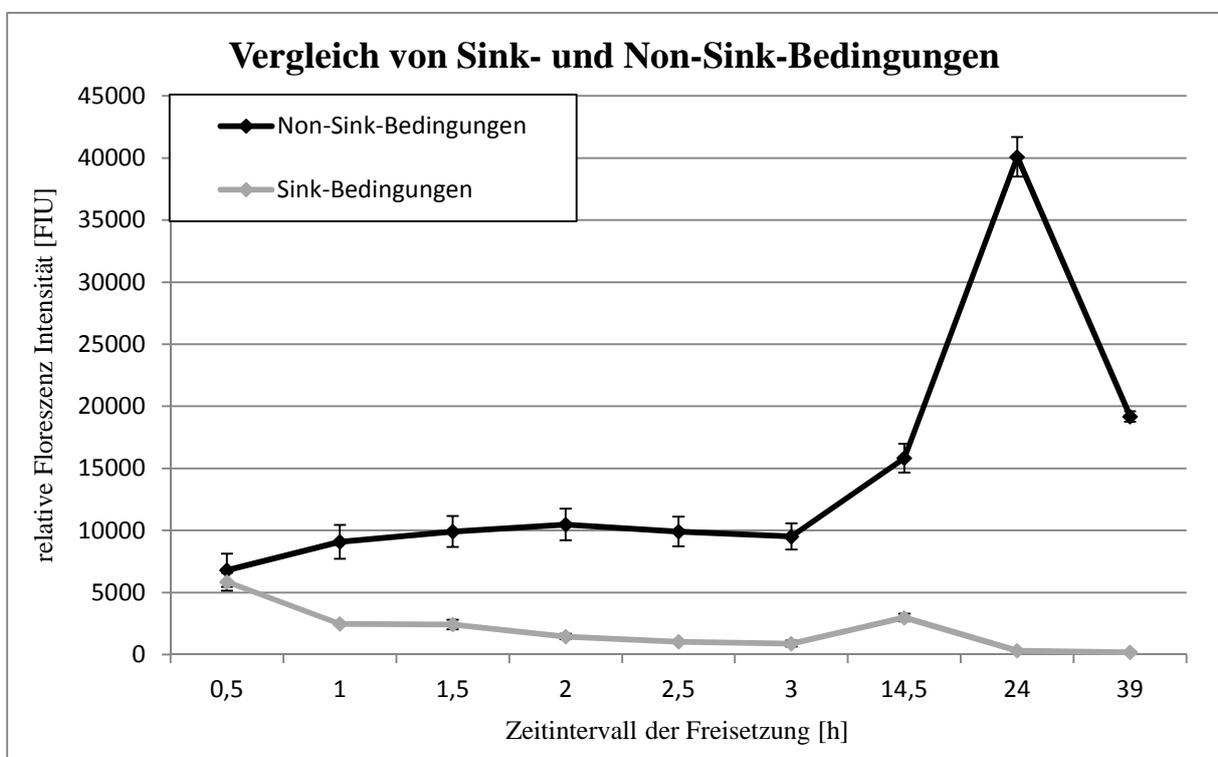


Diagramm 15: Der Vergleich von Sink- und Non-Sink-Bedingungen mittels Analyse der Fluoreszenz (Tecan®).

13. Bestimmung der Größe der PLGA-Mikropartikel

13.1. Bestimmung der Größe von PLGA-Mikropartikel mittels Mastersizer

Die PLGA-Mikropartikel wurden zuerst aufgereinigt, indem sie zweimal mit HEPES/NaOH 20 mM pH 7,4 mit 0,1 % Pluronic[®]-F68 gewaschen (Zentrifuge: 4000 U/min, 20 °C, 5 min) wurden.

Es wurden folgende Partikelsuspensionen mit dem Mastersizer analysiert:

- 10 ml PLGA-Mikropartikelsuspension ohne Bodipy[®] und Gem-C18
- 12 ml PLGA-Mikropartikelsuspension mit Stearinsäure
- 12 ml PLGA-Mikropartikelsuspension mit Stearinsäure und Isobutanol

13.2. Mikroskopische Bestimmung

Es wurde ein Ölpräparat von PLGA-Mikropartikeln ohne Bodipy[®] und ohne Gem-C18 hergestellt, indem ein Tropfen einer Partikelsuspension auf einem Objektträger aufgebracht und die flüssige Phase durch Verdunsten entfernt wurde.

Durch das Aufbringen eines Öltropfens auf das Präparat konnte mittels Mikroskop (Epifluorescence Axio Observer.Z1 deconvolution microscopy system; Carl Zeiss) die Größe bestimmt werden.

13.3. Ergebnisse und Diskussion

Durch die Analyse am **Mastersizer** konnte festgestellt werden, dass 81,40 % der PLGA-Mikropartikel ohne Bodipy[®] und ohne Gem-C18 unter einer Größe von 1 µm lagen, wobei 44,83 % sogar kleiner als 0,5 µm waren. Die Stearinsäurepartikel und jene mit Stearinsäure und Isobutanol hatten dieselbe Größenverteilung, davon befanden sich 60,49 bzw. 60,99 % unter 1 µm und 37,86 bzw. 38,05 % unter 0,5 µm (Diagramm 16). Ein großer Nachteil dieser Methode war, dass sehr große Volumina (mindestens 10 ml) Partikelsuspension für eine Analyse benötigt wurden. Im Gegensatz dazu wurde bei der mikroskopischen Analyse lediglich ein kleiner Tropfen Mikropartikelsuspension verwendet.

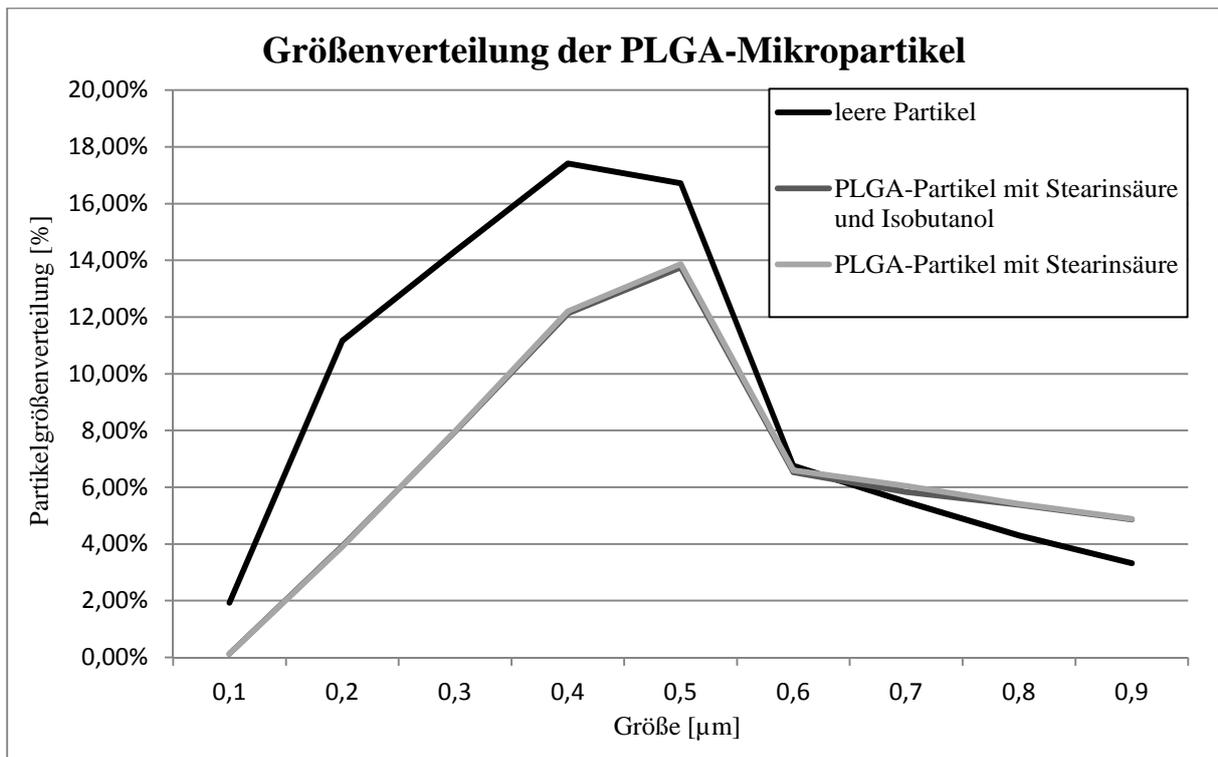


Diagramm 16: Die Größenverteilung der PLGA-Mikropartikel im Bereich von 0,1 bis 1 µm. Die Größenbestimmung erfolgte mittels Mastersizer.

Bei der **mikroskopischen Bestimmung** konnte bestätigt werden, dass alle gemessenen PLGA-Mikropartikel im Bereich von 0,5 µm liegen.

Diese Größenverteilung lag in einem optimalen unteren Bereich für Mikropartikel. Diese können passiv Zellmembranen durchdringen und bieten eine optimale Oberfläche für die Kopplung mit WGA-Lektinen [6, 29].

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Bindung, die Aufnahme in die Zelle und die Freisetzung von mikroverkapseltem 4-(N)-Stearoyl-Gemcitabin-Prodrug (Gem-C18) untersucht.

Zur Herstellung dieses Derivats wurde ein Protokoll von Immordino et al [34] verwendet. Das für Gem-C18 erstellte NMR-Spektrum wies zunächst noch Verunreinigungen auf, sodass das Protokoll optimiert werden musste. Gem-C18 wurde anschließend mittels Solvent Evaporation in PLGA mikroverkapselt [32]. An die Oberflächen der dadurch entstandenen Partikel wurden Lektine (WGA) bzw. humanes Serum Albumin (HSA) gekoppelt [33]. Zum Vergleich wurden zusätzlich nicht-modifizierte Partikel (Plain) verwendet. Es konnte eine signifikant höhere Bindung der WGA-modifizierten Mikropartikeln an die immortalisierten Blaszellen (SV-HUC), sowie an die malignen Blaszellen 2. Grades (RT112, 647V, 5637, T24) und 3. Grades (HT1376) nachgewiesen werden. Selbst nach mehrfachem Waschen blieb ein Großteil der PLGA-Partikeln an den Zellen haften. Die Spezifität der Bindung konnte durch Co-Inkubation mit N,N,N-Triacetylchitotriose bestätigt werden. Dieser Zucker bindet, genauso wie die an der Zelloberfläche vorhandenen Zucker (N-Acetylglucosamin und N-Acetylneuraminsäure) an WGA-Lektine [30]. In einer weiteren Analyse wurde festgestellt, dass leichte Strömungen keinen Einfluss auf die Partikelbindung haben.

Für die Freisetzungsuntersuchungen und jene für die Aufnahme in die Zellen wurde zusätzlich ein Fluoreszenzfarbstoff (5-N-(Oktadecanoyl)aminofluorescein, Fluo-C18) mit ähnlicher Struktur wie Gem-C18 verwendet und eingebaut.

Durch Inkubation der Zellen mit mikroverkapseltem Fluo-C18 konnte die Aufnahme in die Zellen bildlich festgehalten werden. Dabei wurde bestätigt, dass nur durch direkten Kontakt der Mikropartikel mit den Blaszellen und die anschließende Freisetzung des Farbstoffs ein ausreichender passiver Transport von Fluo-C18 in die Zelle möglich ist. Mikroskopisch konnte deutlich die Verteilung des Farbstoffes in der Zelle über die Zeit (15 min, 1 std, 2 std) bei 4 °C (sehr wenig Resorption) und bei 37 °C (sehr gute Resorption) dargestellt werden.

Ohne Wirkstofffreigabe aus den Partikeln kann keine effektive Therapie stattfinden. Dazu wurden Untersuchungen hinsichtlich der Freisetzung des lipophilen Gem-C18 und des lipophilen Fluo-C18 in ein hydrophiles Medium durchgeführt. Die Freisetzung beider Substanzen aus den PLGA-Partikeln konnte mittels HPLC (Agilent Technologies 1100) bestätigt werden.

Diese Arbeit liefert gute Ansätze für die Optimierung der bereits vorhandenen Zytostatikatherapie bei Blasenkarzinomen. Durch die Bindung der Partikel und die erhöhte Aufnahme des Wirkstoffes in die Zelle können die Dosis des Zytostatikums und die Nebenwirkungen reduziert werden. Ein weiterer Schritt in der Entwicklung einer verbesserten

intravesikalen Therapie wäre eine Modifikation der Partikel, die gezielt ausschließlich Tumorzellen erreicht.

Abstract

In this work, the binding and the uptake of 4-(N)-Stearoyl-Gemcitabine-Prodrug (Gem-C18) into bladder cells and the release of encapsulated Gem-C18 were investigated.

The derivatization of Gemcitabine to lipophilic Gem-C18 was carried out according to the protocol of Immordino et al. The NMR spectra of Gem-C18 indicated impurities, and thus, the protocols of the synthesis had to be improved. Subsequently, the Prodrug was encapsulated into PLGA microparticles by solvent evaporation and a surface modification of the prepared PLGA-particles with lectins (wheat germ agglutinin, WGA) or human serum albumin (HSA) were implemented and compared to plain particles.

The binding capacity of WGA-modified microparticles to the immortalized bladder cells, as well as to malignant bladder cancer cells (RT112, 647V, 5637, T24, HT1376) were significantly higher than for HSA-modified or plain particles. Even after repeated washing, most of the particles remained attached to the cell surfaces, which was confirmed by co-incubation of N,N,N-Triacetylchitotriose. The carbohydrate epitopes on the surface of the bladder cells interact with WGA in the same way as the carbohydrates, N-acetylglucosamine and N-acetylneuraminic acid. In a further assay, it was determined that there was no influence of gentle flow on the binding.

For the analysis of the release and the uptake into the bladder cells, a fluorescent marker, (5-N-(octadecanoyl)aminofluorescein, Fluo-C18) was additionally used, which has a configuration similar to that of Gem-C18.

Incubating the bladder cells with Fluo-C18 microparticles, the uptake could be analysed visually with a microscope. Thereby, it could be confirmed that only the direct contact of the microparticles with the cells and the following release of the drug enable the transport of Fluo-C18 into the cell. The distribution of the Fluo-C18 inside the cancer cells was displayed with the microscope over a time period of 15 min, one hour, and two hours, at temperatures of 4 °C (low resorption) and 37 °C (high resorption).

The release of active substances is a prerequisite for effective therapy. Thus, the release of lipophilic Gem-C18 and lipophilic Fluo-C18 in a hydrophilic medium was examined.

The present results of this work provide strategies for an improvement of the current cytostatic therapy of bladder cancer. Binding of the particles may lead to an increased uptake of the drug into the cancer cells. That way, both the therapeutic dose and adverse effects could

be reduced. A further step in the development of targeted therapy might be a modification of these particles that is specific for urothelial tumour cells.

Literaturverzeichnis

- [1] Urologie, Hautmann, 4.Auflage (2010), Springer Verlag.
- [2] Facharztwissen Urologie – Differenzierte Diagnostik und Therapie, Schmelz Hans-Ulrich, 2. Auflage (2010), Springer Verlag.
- [3] Basiswissen Urologie, Gasser Thomas, 5.Auflage (2011), Springer Verlag.
- [4] Phase II study to investigate the ablative efficacy of intravesical administration of gemcitabine in intermediate-risk superficial bladder cancer (SBC), Gontero P1, Casetta G, Maso G, Sogni F, Pretti G, Zitella A, Frea B, Tizzani A., European Urology, 2004 Sep;46(3):339-43.
- [5] Lectin bioconjugates trigger urothelial cytoinvasion - a glycotargeted approach for improved intravesical drug delivery, Neusch L1, Eggenreich B, Herwig E, Marchetti-Deschmann M, Allmaier G, Gabor F, Wirth M., European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2012 Oct;82(2):367-75.
- [6] Biopharmazie, Langhut, Fricker, Wunderli-Allenspach, 1. Auflage (2004), VILEY-VICH Verlag GmbH Co KGaA.
- [7] Cellular pharmacology of gemcitabine, E. Mini, S. Nobili, B. Caciagli, I. Landini, T. Mazzei, Annals of Oncology, 2006 May;17 Suppl 5:v7-12.
- [8] Waldeyer - Anatomie des Menschen, Waldexer Anton, Anderhuber Friedrich, 17.Aufage (2003), De Gruyter.
- [9] Urologie für die Praxis, Hofstetter Alfons G., Eisenberger Ferdinand, 2. Auflage (2011), Springer Verlag.
- [10] The Uroepithelium: Not Just a Passive Barriere. Apodaca G, Traffic, 2004 Mar;5(3):117-28.
- [11] Intravesical treatments of bladder pain syndrome/interstitial cystitis., Neuhaus J, Schwalenberg T., Nature Reviews Urology. 2012 Dec;9(12):707-20

- [12] Biochemie, Werner Müller-Esterl, 1. Auflage (2004), Elsevier Verlag.
- [13] Structure, function, and pathology of proteoglycans and glycosaminoglycans in the urinary tract, R.E. Hurst, World Journal of Urology, 1994 12:3-10.
- [14] The glycosaminoglycans of human bladder cancer of varying grade and stage, D.P. Deklerk, The Journal of Urology, 1985 Vol. 134.
- [15] Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen, Thews, Mutschler, Vaupel, 6. Auflage (2007), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- [16] Rote Liste® 2013 Arzneimittelverzeichnis für Deutschland.
- [17] Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Aktories et al, 9. Auflage (2005), Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
- [18] Transmembrane diffusion of gemcitabine by a nanoparticulate squalenoyl prodrug: An original drug delivery pathway, L. Bildstein, C. Dubernet, V. Marsaud, H. Chacun, V. Nicolas, C. Gueutin, A. Sarasin, H. Bénech, S. Lepêtre-Mouelhi, D. Desmaele, P. Couvreur, Journal of Controlled Release, 2010 Oct. 15; 147(2) 163-170.
- [19] Austria-Codex, Fachinformation 2011/2012, Österreichische Apotheker-Vertragsgesellschaft.
- [20] Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing lipophilic gemcitabine prodrugs, M.L. Immordino, P. Brusa, F. Rocco, S. Arpicco, M. Ceruti, L. Cattel, Journal of Controlled Release, 2004 Dec 10; 100(3):331-46.
- [21] Prodrug-based intracellular delivery of anticancer agents, L. Bildstein, C. Dubernet, P. Couvreur, Advanced Drug Delivery Reviews, 2011 Jan-Feb; 63(1-2):3-23.
- [22] Intravesical drug delivery for dysfunctional bladder, Chun-Chien Hsu, Yao-Chi Chuang, Michael B. Chancellor, International Journal of Urology, 2013 Jan 22 doi: 10.1111/iju.12085.

- [23] Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier, Makadia HK, Siegel SJ., *Polymers (Basel)*. 2011 Sep 1;3(3):1377-1397.
- [24] Mucoadhäsion on urinary bladder mucosa: the influence of sodium, calcium, and magnesium ions, M. Kerec Kos, M. Bogataj, A. Mrhar, *Pharmazie*, 2010 Juli; 65(7):505-9.
- [25] Drug Delivery Systems in Urology – Getting “Smarter”, O. C. Farokhzad, J. D. Dimitrakov, J. M. Karp, A. Khademhosseini, M. R. Freeman, R. Langer, *Urology*, 2006 68: 463-469.
- [26] New Frontiers in Intravesical Therapies and Drug Delivery, A. Giannantoni, S.M. Di Stasi, M.B. Chancellor, E. Costantini, M. Porena, *European Urology*, 2006 Dec; 50(6):1183-1193.
- [27] *Chemical Biology*, Herbert Waldmann, Petra Janning, 1. Auflage (2004), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- [28] *The Sugar Code – fundamentals of Glycosciences*, Hans Joachim Gabius, 1. Auflage (2009), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- [29] Lectin-mediated drug delivery: the second generation of bioadhesives, Lehr CM., *Journal of Controlled Release*, 2000 March 1;65(1-2):19-29.
- [30] Efficient wheat germ agglutinin purification with a chitosan-based affinity chromatographic matrix, M. F. Baieli, N. Urtasun, M.V. Miranda, O. Cascone, F. J. Wolman, *Journal of Separation Science*, 2012 Jan;35(2):231-8.
- [31] Systematic comparisons of artificial urine formulas for in vitro cellular study, Chutipongtanate S. Thongboonkerd V., *Analytical Biochemistry*, 2010 Jul 1; 402(1):110-2.

- [32] UPEC biomimicry at the urothelial barrier: Lectin-functionalized PLGA microparticles for improved intravesical chemotherapy, Neutsch L, Wambacher M, Wirth EM, Spijker S, Kählig H, Wirth M, Gabor F., *International Journal of Pharmacy*, 2013 Jun 25; 450(1-2):163-76.
- [33] Surface modification of PLGA particles: the interplay between stabilizer, ligand size, and hydrophobic interactions, Ratzinger G, Länger U, Neutsch L, Pittner F, Wirth M, Gabor F., *Langmuir*, 2010 Feb 2;26(3):1855-9.
- [34] Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing lipophilic gemcitabine prodrugs, Immordino ML, Brusa P, Rocco F, Arpicco S, Ceruti M, Cattel L., *Journal of Controlled Release*, 2004 Dec 10;100(3):331-46.
- [35] Differences in hydrophobic properties of ligand binding at four independent sites in wheat germ agglutinin-oligosaccharide crystal complexes, Wright CS, Kellogg GE., *Protein Science*, 1996 Aug;5(8):1466-76.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Sylvia Maria Spijker

Geburtsdatum: 17.09.1985

Geburtsort: Bregenz

Staatsbürgerschaft: Österreich / Niederlande

Eltern: Dipl.-Päd. Ingrid Ottilie Spijker, geb. Grass
Eur. Ing. Frederikus Albertus Petrus Maria Spijker

Geschwister: Dr. mont. Dipl.-Ing. Christoph Johannes Spijker (geb.1984)

Ausbildung

Juni 2004: Matura mit gutem Erfolg am Bundesoberstufenrealgymnasium Dornbirn ORG mit besonderer Berücksichtigung der sportlichen Ausbildung

Seit Oktober 2004: Studium der Pharmazie an der Universität Wien

März – Okt. 2012: Diplomarbeit
Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie,
Althanstraße 14, 1090 Wien

Publikationen

Juli 2013: Synergistic targeting / prodrug strategies for intravesical drug delivery – Lectin-modified PLGA microparticles enhance cytotoxicity of stearyl gemcitabine by contact-dependent transfer, L. Neutsch, E-M. Wirth, S. Spijker, C. Pichl, H. Kählig, F. Gabor, M. Wirth, 2013 Jul 10, J Control Release; 169 (1-2):62-72

Juli 2013: UPEC biomimicry at the urothelial barrier: Lectin-functionalized PLGA microparticles for improved intravesical chemotherapy, L. Neutsch, M. Wambacher, E-M. Wirth, S. Spijker, H. Kählig, M. Wirht, F. Gabor, 2013 Jul 25, Int J Pharm.; 450(1-2):163-76

Berufserfahrung

Juli bis Sept.2004,

August 2005: Julius Blum GmbH, Abteilung Marketing und
Bedürfnisforschung
Industriestraße 1, 6973 Höchst

August 2006: Leiblachtal Apotheke
Lindauerstraße 71, 6912 Hörbranz

August 2007: Martin Apotheke und Drogerie
Bahnhofstraße 25, 6911 Lochau

Juli 2008: Apotheke im Messepark
Messestraße 2, 6850 Dornbirn

September 2009: Bahnhof Apotheke
Bahnhofstraße 25, 6900 Bregenz

WS11, SS12,

SS13: Tutorin im „Grundpraktikum aus Pharmazeutischer Technologie“
Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie,
Althanstraße 14, 1090 Wien

WS12

Tutorin im Praktikum „Grundlagen der industriellen
Arzneimittelherstellung“
Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie,
Althanstraße 14, 1090 Wien

Sept. 2013 bis

Nov. 2015 Geringfügige Beschäftigung im Ausmaß von 8 Wochenstunden
Apotheke Hernals, Hernalser Hauptstraße 212, 1170 Wien

Seit Dez. 2015

Beschäftigung im Ausmaß von 20 Wochenstunden
Lindwurmapotheke, Gablenzgasse 31, 1150 Wien