



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Optimierung der Oberflächenmodifikation von PLGA-Nanopartikeln mit den Targetern Folsäure und Weizenkeimlektin“

verfasst von / submitted by

Tara Naima Stock

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

Wien, 2022 / Vienna, 2022

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

UA 449

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

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

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

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlichst bei Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor und Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth für die Aufnahme in ihre Forschungsgruppe und die damit verbundene Zeit bedanken. Das Mitarbeiten an ihren Themengebieten war überaus spannend und eine sehr große Bereicherung für mein Studium. Die liebevolle Betreuung und der freundliche Umgang miteinander machten jeden Tag am Department zu einem Besonderen.

Für die sehr kompetente Beratung, stetige Unterstützung und große Hilfsbereitschaft über die gesamte Zeit hinweg möchte ich mich vielmals bei Mag. pharm. Maria Anzengruber bedanken.

Ebenso geht mein Dank an alle KollegInnen, welche diesen Studienabschnitt mit mir erleben durften und den starken Zusammenhalt und das großartige Arbeitsklima innerhalb der Arbeitsgruppe ermöglichten.

Abschließend möchte ich ein großes Dankeschön an meinen Partner Bernhard und an meine Familie richten, die mich über den gesamten Zeitraum des Studiums ermutigt, motiviert und in jeglicher Weise unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1. Therapie von Tumorerkrankungen.....	7
1.2. Gemcitabin	8
1.3. Nanopartikel	9
1.4. PLGA (Poly-Milch-Co-Glykolsäure).....	9
1.5. Drug Targeting	10
2. Zielsetzung	12
3. Material und Methoden	13
3.1. Nanopartikel-Herstellung	13
3.2. Qualitätskontrolle der Nanopartikel	14
3.2.1. Bestimmung der Partikelgröße und der Polydispersität	14
3.2.2. Quantifizierung von GemCx mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	14
3.3. Stabilitätsprüfung der Gemcitabin-Fettsäure-Konjugate.....	15
3.4. GemCx-Freisetzung aus PLGA-Nanopartikeln innerhalb von sechs Tagen	15
3.5. Funktionalisierung der PLGA-Nanopartikel mit Targeter-Molekülen.....	16
3.5.1. Oberflächenmodifikation mit WGA (Wheat Germ Agglutinin)	16
3.5.2. Oberflächenmodifikation mit Folsäure.....	16
3.6. Zellversuche	17
3.6.1. Prüfung der Bindungsaffinität an Einzelzellen mittels Durchflusszytometrie	18
3.6.2. Prüfung der Bindungsstärke anhand von Zellmonolayer-Versuchen.....	18
3.6.3. Prüfung der Toxizität anhand von Zellviabilitätstests	19
4. Ergebnisse	21
4.1. Nanopartikelherstellung	21
4.2. Qualitätsprüfung der hergestellten Nanopartikel	21
4.2.1. In-Prozess Kontrolle der Partikelgröße und des PDI	21
4.3. Quantifizierung von GemCx mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography).....	23
4.3.1. Einfluss der Herstellungsmedien auf die Einbauraten von GemCx	24
4.4. Stabilität der Gemcitabin-Fettsäure-Konjugate	25
4.5. GemCx-Freisetzung aus PLGA-Nanopartikeln innerhalb von sechs Tagen	26
4.6. Zellbindungsstudien mit funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln	27

4.6.1. Ergebnisse der Zellbindungsstudien mit WGA-funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln	27
4.6.2. Ergebnisse der Zellbindungsstudien von Folsäure-funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln	34
4.6.3. Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Bindungsstudien	39
4.6.4. Ergebnisse der Zellbindungsstudien von Folsäure-funktionalisierten Nanopartikeln nach Änderung des Versuchsprotokolls – optimierte Zellbindungsversuche	41
4.6.5. Zusammenfassung der optimierten Zellbindungsversuche.....	44
4.6.6. Ergebnisse der Toxizitätstests.....	45
4.6.7. Zusammenfassung der Toxizitätstests	49
5. Zusammenfassung.....	50
6. Anhang.....	52
6.1. Abstract.....	52
Abbildungsverzeichnis	53
Tabellenverzeichnis	54
Literaturverzeichnis	55

1. Einleitung

1.1. Therapie von Tumorerkrankungen

Die derzeitigen Behandlungsstrategien von Tumorerkrankungen umfassen die Chirurgie, die Strahlentherapie und die pharmakologische Therapie, z.B. in Form einer Chemotherapie.³

Das Ziel der Chemotherapie ist es, die Zellproliferation zu inhibieren und dadurch das Tumorwachstum zu hemmen, sodass das Fortschreiten der Erkrankung und eine Metastasierung unterbunden werden. Die zytotoxische Wirkung ist aber nicht nur auf die Tumorzellen beschränkt, sondern führt auch zu einer Schädigung von gesunden Zellen.^{2,4}

Viele der gebräuchlichen Chemotherapeutika erzielen ihre Wirkung, indem sie in die DNA-, RNA- oder Proteinsynthese eingreifen und diese direkt stören oder die Funktionalität der entstehenden Produkte beeinflussen. Wenn der Angriff in genügend starkem Ausmaß erfolgt, führt dies aufgrund des Funktionsverlustes zum Absterben der Zelle. Da die einmalige Gabe dieser Arzneimittel in der Regel nicht in allen Tumorzellen eine ausreichende Zytotoxizität auslöst, müssen diese mehrmals appliziert werden.²

Die verabreichte Dosis wird individuell an die Körperoberfläche angepasst, da das therapeutische Fenster von Chemotherapeutika sehr eng ist und es leicht zu Überdosierungen kommen kann. Gleichzeitig ist die Wirkung zu wenig selektiv, sodass auch gesunde Zellen absterben. Letztendlich führen diese Umstände dazu, dass viele Chemotherapeutika schwere Organtoxizitäten aufweisen und diese dadurch in niedrigeren, tolerierbaren Dosen über einen längeren Zeitraum verabreicht werden müssen. Dennoch kommt es häufig, überwiegend aber bei dosisdichteren Therapieplänen, zur Entwicklung einer behandlungspflichtigen Neutropenie.^{2,3,18}

Weitere Nebenwirkungen ergeben sich durch die Aktivität der Chemotherapeutika vor allem in sich rasch teilenden Zellen. Besonders betroffen sind die Zellen des Magen-Darm-Traktes, des Knochenmarks und der Haarfollikel, wodurch die üblichen Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Alopezie und Müdigkeit entstehen, aber auch eine erhöhte Infektanfälligkeit resultiert.^{2,10}

Der technologische Fortschritt, kombiniert mit der wachsenden Menge an Wissen über Pathophysiologie und molekulare Mechanismen von Tumorerkrankungen, verändert die Therapie. In Anbetracht der zuvor beschriebenen Nebenwirkungen bemüht sich die moderne Medizin neue, zielgerichtete Therapien zu entwickeln, welche die Schäden an gesunden Zellen minimieren sollten. Das Prinzip des Drug-Targetings nutzt bestimmte

Moleküle an der Zelloberfläche zur gezielten Bekämpfung von Krebszellen. Diese Therapieform bildet derzeit den Mittelpunkt vieler Entwicklungen und stellt somit einen Eckpfeiler der Präzisionsmedizin dar.³

Besonders großes Augenmerk wird auf die Entwicklung intelligent gesteuerter Drug-Delivery-Systeme gelegt, welche zusätzlich die Mechanismen des passiven oder aktiven Targetings nutzen.¹⁹

Die Verwendung dieser neuen Therapie-Systeme kann die Wirksamkeit von Krebstherapeutika erhöhen, indem die geringe Selektivität für das Tumorgewebe ausgeglichen und die Toxizität dadurch erhöht werden kann. Zudem können neben dem Einsatz von Drug-Delivery-Systemen auch die physiko-chemischen Eigenschaften des Arzneimittels angepasst und die metabolische Stabilität verbessert werden, was eine Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit mit sich bringt.⁸

1.2. Gemcitabin

Ein häufig eingesetzter Wirkstoff zur Behandlung von soliden Tumoren ist Gemcitabin. Es wird unter anderem im Rahmen einer Chemotherapie zur Behandlung von Blasenkrebs verwendet.^{2,8,9,11} Die Behandlung von Blasenkrebs erfordert zunächst eine operative Entfernung des Tumors, gefolgt von intravesikaler Instillation von Chemotherapeutika oder Immunmodulatoren aufgrund der hohen Rezidivraten.^{28,29}

In chemischer Hinsicht ist Gemcitabin ein Analogon von Desoxycytidin. Es besitzt sehr große strukturelle Ähnlichkeit zum Cytosinarabinosid, von welchem es sich nur anhand von zwei Fluoratomen in Position 2 unterscheidet (2',2'-Difluordesoxycytidin). Außerdem besitzt Gemcitabin eine verstärkte pharmakologische Aktivität und dadurch ein erweitertes Einsatzgebiet als Antineoplastikum. Es ist ein Prodrug, welches intrazellulär durch die Desoxycytidinkinase phosphoryliert und somit aktiviert wird. Als Triphosphat wird es dann in den sich verlängernden DNA-Strang eingebaut, wodurch die DNA-Synthese stoppt. Das Durchdringen der Zellmembran erfolgt aufgrund der ausgeprägten Hydrophilie durch aktiven Transport.^{8,9,11}

Des Weiteren besitzt Gemcitabin eine kurze Plasma-Halbwertszeit, wodurch es schnell an den Wirkort gelangen muss, um eine ausreichende zytotoxische Wirkung ausüben zu können. Die Limitierung dieser Plasma-Halbwertszeit ergibt sich aus der raschen Metabolisierung des Gemcitabins. Die Umwandlung erfolgt durch die Cytidin-Deaminase, welche die Aminogruppe in Position 4 enzymatisch entfernt – es resultiert der inaktive Metabolit 2',2'-Difluorodeoxyuridin, welcher über die Niere ausgeschieden wird. Aus diesen

Gründen ist eine hohe Dosis von Gemcitabin nötig, damit eine ausreichende, therapeutisch wirksame Menge den Wirkort erreicht.¹¹

1.3. Nanopartikel

Da es zu vielen Problemen bei der Therapie mit zytotoxischen Tumorthapeutika kommt, wie einer ineffizienten Membranpassage, einer raschen Metabolisierung und Elimination, aber auch einer Anreicherung in gesundem Gewebe, ist ihr Einsatz dadurch limitiert. Auch die Entwicklung von neuen Arzneimitteln in diesem Bereich wird durch einige Faktoren ungünstig beeinflusst. Besonders die Überwindung von Zellbarrieren und die schlechte Wasserlöslichkeit stellen die Forschung vor neue Herausforderungen. Dadurch liegt es nahe, immer mehr Anstrengung in die Entwicklung von geeigneten Wirkstoffträgersystemen zu stecken, welche die Verabreichung trotz solcher Probleme zulässt. Ein Teil dieses Themengebiets bilden Arzneiformen in der Nanodimension. Diese schützen einerseits die therapeutische Komponente vor dem biologischen Abbau und können andererseits den Zelleintritt erleichtern.¹⁷

Die erleichterte Diffusion der Nanopartikel beruht auf der verbesserten Permeabilität und verstärkten Retention von diesen durch Tumorzellen – zusammengefasst als EPR-Effekt. Mittlerweile können Nanopartikel auch mit bestimmten Molekülen an ihrer Oberfläche modifiziert werden, um ein gezieltes Targeting des Tumors zu erreichen.^{14,23}

1.4. PLGA (Poly-Milch-Co-Glykolsäure)

Eines in den letzten zwei Jahrzehnten häufig für die Herstellung von Drug-Delivery-Systemen verwendetes Polymer ist die Poly-Milch-Co-Glykolsäure. Aufgrund der hohen Biokompatibilität und der biologischen Abbaubarkeit ist es ein sehr attraktiver Kandidat für die Arzneistoffentwicklung. Zudem können die Freisetzungsrate des Wirkstoffs als auch die mechanischen Eigenschaften des Polymers reguliert werden. Besonders wird es für die Herstellung von Mikro- und Nanopartikeln zur Abgabe von niedermolekularen Arzneistoffen, Proteinen und anderen Makromolekülen untersucht.^{15,16,25}

Im Allgemeinen sollten gute Krebstherapeutika Eigenschaften wie eine gewisse metabolische Stabilität gegenüber Enzymen und eine damit verbundene lange Plasma-Halbwertszeit aufweisen.⁵

Aufgrund seiner Eigenschaften ist PLGA in der Lage, die Wirkstoffe vor dem enzymatischen Angriff in vivo zu schützen und so deren Abbau zu verzögern.^{15,16}

Außerdem sind verschiedene Methoden zur Modifikation der Oberfläche bekannt, welche ein gezieltes Tumor-Targeting der PLGA-Nanopartikel ermöglichen und wodurch eine Reduktion der Nebenwirkungen erreicht werden kann.¹⁶

Im Zusammenhang mit Gemcitabin wurde eine Resistenzentwicklung der Tumorzellen beobachtet, welche dessen Anreicherung am Wirkort vermindern soll. Um die Konzentration am Wirkort zu steigern, wurden Esterderivate des Gemcitabins mit Fettsäuren erzeugt. Durch diese Modifikation sollten die Gemcitabin-Fettsäure-Konjugate in der Tumorzelle akkumulieren und darin zurückgehalten werden.^{9,11} PLGA-Nanopartikel bieten sich als geeigneter Arzneistoffträger dafür an, da in dieses Polymer vor allem lipophile Substanzen gut integriert werden können.^{26,27}

1.5. Drug Targeting

In den letzten Jahren hat sich die Strategie zur Entdeckung neuer Tumorthapeutika stark verändert. Die zuvor auf zufälligem Screening basierte Vorgangsweise löste ein rationalerer, zielbasierter Ansatz ab – die Identifizierung von spezifischen molekularen Targets.^{6,7}

Da sich Tumorzellen von gesunden Zellen in ihrer Biologie und Physiologie unterscheiden und bestimmte Oberflächenmoleküle vermehrt exprimieren, eignen sich diese besonders als Target, um eine zielgerichtete Therapie zu realisieren.^{17,23}

Die Wechselwirkung der Targeter-Moleküle mit ihrem Ziel ist dem Prinzip der Interaktion von Arzneimittel und Rezeptor gleichzusetzen. Es resultiert eine an Tumorzellen gerichtete Wirkung, welche darin begründet wird, dass lediglich festgelegte Targets, z.B. in Tumorzellen hochregulierte Proteine, angegriffen werden. Somit sollte die neue Form der Therapie selektiver und weniger toxisch für gesundes Gewebe sein.^{7,23}

Es konnten Drug-Delivery-Systeme entwickelt werden, welche einerseits die Wirkstoffmenge am Zielort erhöhen und andererseits die Verteilung im systemischen Kreislauf vermindern, was zu einer verbesserten therapeutischen Wirkung und gleichzeitig zur Reduktion der Nebenwirkungen führt.¹³

Ein Beispiel für gezieltes Targeting ist die Verwendung von Folsäure als Targeter-Molekül. Die erhöhte Aufnahme von Folsäure in viele menschliche Krebsarten und Eigenschaften der Folsäure, wie die geringe Immunogenität, das niedrige Molekulargewicht und die

Kompatibilität mit organischen Lösungsmitteln, welche für die Herstellung benötigt werden, macht Folsäure zu einem vielversprechenden Targeter-Molekül. Zudem zeigen verschiedene Folat-konjugierte PLGA-Nanopartikel eine verlängerte Verweildauer in Tumoren im Vergleich zu nicht zielgerichteten Nanopartikeln.^{17,23,24}

Ein weiteres Beispiel ist gezieltes Targeting durch Lektine. Lektine sind Proteine, welche an spezielle Kohlenhydratstrukturen an der Zelloberfläche binden und manchmal sogar Autophagie und Apoptose induzieren können. Diese komplexen Kohlenhydrate sind Hauptbestandteil aller Zellmembranen und dienen auch der Signalweiterleitung. Es gibt allerdings einen deutlichen Unterschied dieser Kohlenhydratstrukturen zwischen gesunden Zellen und Tumorzellen.^{1,20}

In Tumorzellen wird das sogenannte Glykosylierungsmuster durch spezifische Enzyme verändert, wodurch diese neu geschaffene Oberfläche ein Target für gewisse Lektine bildet. Diese Veränderungen beinhalten auch Xeno- und Hypersialylierung, welche als Ziele im Drug-Targeting genutzt werden können.²¹

Wheat Germ Agglutinin (WGA), ein bioadhäsives Lektin, bindet neben N-acetyl-D-glucosamin an diese Sialinreste an der Oberfläche der Zellen und kann deshalb für das gezielte Targeting verwendet werden.²²

Zudem gibt es für WGA hinsichtlich Lektin-vermittelter Arzneimittelabgabe vielversprechende Ergebnisse.¹²

2. Zielsetzung

In der Therapie von Blasenkrebs kommt es besonders durch das nahezu undurchdringliche Urothel zu Schwierigkeiten. Diese natürliche Barriere führt dazu, dass bei Behandlung mit Immunmodulatoren und/oder Chemotherapeutika nur eine unzureichende Menge davon das Urothel passiert und in die Tumorzellen gelangt.¹²

Aus diesem Grund wurde als Zielsetzung dieser Arbeit die Optimierung der Oberfläche von Gemcitabin-Fettsäure-Konjugat-haltigen PLGA-Nanopartikeln festgelegt. Die Gemcitabin-Fettsäure-Konjugate (GemCx-Konjugate) wurden nach einem bekannten Protokoll synthetisiert und auch die daraus resultierenden PLGA-Nanopartikel. Anschließend sollte die Funktionalisierung mit den Targeter-Molekülen Folsäure und Wheat Germ Agglutinin (WGA) insofern optimiert werden, sodass diese eine höhere Zellbindung als nicht funktionalisierte PLGA-Nanopartikel zeigen. Durch das Funktionalisieren der Nanopartikel sollte eine zielgerichtete Arzneiform entstehen, welche eine erhöhte Bindungsaffinität aufweist und die Aufnahme in die Zielzellen verbessert.

Dazu wurde ein Funktionalisierungsprotokoll erstellt und im Laufe dieser Arbeit an die gewonnenen Ergebnisse angepasst. Die Funktionalität der modifizierten PLGA-Nanopartikel wurde durch Zellbindungsversuche an Einzelzellen und Zellmonolayern an zwei Zelllinien untersucht – 5637 und SV-HUC-1. Diese beiden Zelllinien exprimieren die Targets, die zum Nachweis der zielgerichteten Bindung notwendig sind und sollten daher mit den Targeter-Molekülen interagieren.

Des Weiteren wurde die Zytotoxizität der GemCx-Konjugate und der GemCx-haltigen PLGA-Nanopartikel anhand von Zellviabilitätstests untersucht. Auch diese Zellstudien wurden mit den zuvor beschriebenen Zelllinien durchgeführt. Es wurde die Zytotoxizität der entstandenen Produkte im Vergleich zu reinem Gemcitabin untersucht und mit Gemcitabin-freien PLGA-Nanopartikeln verglichen.

3. Material und Methoden

3.1. Nanopartikel-Herstellung

Die Herstellung der PLGA-Nanopartikel erfolgte mittels Solvent Evaporation-Methode. Dazu wurden 50 mg PLGA (Evonik, Resomer RG 503 H), 8-10 mg Gemcitabin-Konjugat und gegebenenfalls 25 µg BodiPy (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diazas-indacene, Invitrogen, Eugene, USA) als Fluoreszenzmarker, in insgesamt 3 ml Aceton gelöst – was die organische Phase darstellte. Als wässrige Phase wurden 20 ml 0,3%ige PVA (Polyvinylalkohol, Sigma Aldrich, 87-90% hydrolysiert, MW: 30000-70000)-Lösung verwendet. Die Herstellung erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde unter Ultraschallbehandlung (Ultraschallsonde: UW 2070, Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland) mit einer Amplitude von 60% und unter Kühlung 2 Minuten 30 Sekunden lang die Nanoemulsion hergestellt, wobei innerhalb der ersten 30 Sekunden die organische Phase durch eine 6 ml Spritze mittels Kanüle (0,6 × 30 mm) in die wässrige Lösung eingespritzt wurde. Anschließend wurde die Nanoemulsion in eine 0,1%ige PVA-Lösung eingebracht und durch Druckluft das restliche Lösungsmittel entfernt.

Die darauffolgende Reinigung der PLGA-Nanopartikel erfolgte durch Zentrifugation. Es wurden neun Zentrifugationsschritte mit ansteigender Rotationsgeschwindigkeit durchgeführt.

Tabelle 1: Zentrifugationsschritte zur Aufreinigung der PLGA-Nanopartikel

Schritt	Geschwindigkeit	Dauer	Temperatur
1	267 × g (1500 U/min)	30 min	20 °C
2	2968 × g (5000 U/min)	10 min	4°C
3	11872 × g (1000 U/min)	10 min	4°C
4	30392 × g (16000 U/min)	10 min	4°C
5	38465× g (18000 U/min)	30 min	4°C
6	45569 × g (19500 U/min)	30 min	4°C
7	55396 × g (21500 U/min)	30 min	4°C
8	66182 × g (23500 U/min)	30 min	4°C
9	81012 × g (26000 U/min)	30 min	4°C

Für die Aufreinigung wurde eine Sorvall Lynx 6000 Zentrifuge (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit den Rotoren Fiberlite F21-8x50y (Schritte 1-5) und T29-8x50 (Schritte 6-9) verwendet. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde als In-Prozess Kontrolle die Partikelgröße am Lichtstreuungs-Messgerät Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) bestimmt. Dazu wurde das Nanopartikelpellet in 2 ml 0,1%iger PVA-Lösung, alternativ auch in partikelfreiem Wasser oder 0,05%iger PVA-Lösung, resuspendiert und die Partikelgröße und der Polydispersitätsindex (PDI) ermittelt. Anschließend wurden die Partikelsuspensionen der Schritte 4-9 vereint, die Nanopartikelsuspension filtriert (Nucleopore Whatman; 5µm) und erneut die Partikelgröße sowie der PDI dieses Pools ermittelt. Danach wurde dieser zu je 1 ml aliquotiert und lyophilisiert.

3.2. Qualitätskontrolle der Nanopartikel

3.2.1. Bestimmung der Partikelgröße und der Polydispersität

Wie in Abschnitt 3.1. angeführt, wurde die Qualität der Nanopartikel schon im Verlauf der Herstellung bestimmt, was zugleich eine Überprüfung der Herstellungsmethode darstellte. Als weitere entscheidende Endkontrolle der Qualität der entstandenen PLGA-Nanopartikel wurden diese Parameter nochmals nach der Lyophilisation überprüft.

Dazu wurden die lyophilisierten Nanopartikel in 1 ml partikelfreiem Wasser resuspendiert und die Partikelgröße und der PDI-Wert dieser Partikelsuspension im Zetasizer gemessen.

3.2.2. Quantifizierung von GemCx mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Die GemCx-Derivate wurden für die Konzentrationsbestimmung in einer 1:1 Mischung aus Methanol und Isopropanol gelöst, in ein HPLC-Vial überführt und der GemCx-Gehalt in der HPLC (Nexera XR, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) gemessen. Die Auftrennung erfolgte mittels isokratischer Elution bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min an einer RP-18e Säule (Acclaim™120 C18, 5µm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Das Fließmittel für die Quantifizierung von GemC10 und GemC14 setzte sich aus 90% Methanol und 10% partikelfreiem Wasser zusammen. GemC10 eluierte nach dieser Methode bei 5 min, während GemC14 nach einer Laufzeit von 9 min detektiert werden konnte. Für die Gehaltsbestimmung von GemC6 wurde die Laufmittelzusammensetzung auf 65:35 Methanol/partikelfreies Wasser verändert. Die Quantifizierung von GemC6 erfolgte dabei nach 9 min. Die Detektion erfolgte bei 300nm anhand eines Diodenarray-Detektors.

3.3. Stabilitätsprüfung der Gemcitabin-Fettsäure-Konjugate

Es wurden drei verschiedene Gemcitabin-Fettsäure-Konjugate hergestellt und deren Stabilität in Kunsturin pH 7 bei sowohl 4°C als auch 37°C untersucht. Die Gemcitabin-Derivate (GemCx) wurden, wie bei Immordino et. al beschrieben, hergestellt. Die GemCx-Konjugate unterschieden sich in der Länge der gesättigten Fettsäuren – Capronsäure (GemC6; 6 C-Atome; Sigma Aldrich), Caprinsäure (GemC10; 10 C-Atome; Sigma Aldrich) oder Myristinsäure (GemC14; 14 C-Atome; Sigma Aldrich). Für die Stabilitätsprüfung wurden die drei GemCx-Konjugate in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und danach in das Versuchsmedium Kunsturin pH 7 transferiert, wodurch folgende Konzentrationen resultierten: c (GemC6) = 0,0640 mg/ml; c (GemC10) = 0,0375 mg/ml; c (GemC14) = 0,0214 mg/ml. Die drei Ansätze wurden 18 Tage lang bei 4°C und 37°C inkubiert. Über den gesamten Zeitraum wurden regelmäßig Proben entnommen und mittels HPLC-Analyse der GemCx-Gehalt bestimmt.

3.4. GemCx-Freisetzung aus PLGA-Nanopartikeln innerhalb von sechs Tagen

Um abschätzen zu können, inwieweit die Oberflächenmodifikation der GemCx-haltigen Nanopartikel zu einer Freisetzung des Wirkstoffes und damit zu Effekten auf Zellen führt, wurden die ausgewählten GemCx-PLGA-Nanopartikeln Chargen bei 4°C inkubiert und sechs Tage beobachtet. Die lyophilisierten Nanopartikel der jeweiligen GemCx-Charge wurden dafür zunächst in 0,1 M MES-Puffer pH 7 (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE) resuspendiert und anschließend in einem Röhrchen bei 4°C gelagert. Jeden Tag wurden zwei Proben entnommen, um eine Parallelbestimmung durchführen zu können. Die gesammelten Proben wurden im Anschluss eingefroren, um die Wirkstofffreisetzung zu diesem Zeitpunkt abzustoppen. Nach Abschluss der Probensammlung wurden alle Proben wieder aufgetaut und für die Ultrazentrifugation vorbereitet. Die Zentrifugation erfolgte bei 45000 U/min (226800×g) und 4°C für 30 Min. Das Partikelpellet wurde vom Überstand getrennt und dieser im Anschluss in ein neues Gefäß übergeführt. Die voneinander getrennten Phasen wurden erneut bei -80°C eingefroren und lyophilisiert. Daraufhin erfolgte die Quantifizierung von GemCx mittels HPLC, sowohl im Pellet als auch im Überstand. Die Proben wurden so vorbereitet und gemessen wie im Abschnitt 3.2.2. (Quantifizierung von GemCx mittels HPLC) beschrieben.

3.5. Funktionalisierung der PLGA-Nanopartikel mit Targeter-Molekülen

Die Funktionalisierung lief in zwei Schritten ab. Zu Beginn wurden die Carboxylgruppen der PLGA-Matrix aktiviert und an diese ein sogenannter Spacer gebunden. Im Anschluss wurde dann die neu entstandene Oberfläche mit dem Targeter modifiziert.

3.5.1. Oberflächenmodifikation mit WGA (Wheat Germ Agglutinin)

Zunächst wurden 8-10 mg lyophilisierte Nanopartikel in 0,1 M MES pH 6 resuspendiert. Zur Aktivierung der Carboxylgruppen wurde ein 20-fach molarer Überschuss von EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE) und ein 40-fach molarer Überschuss an Sulfo-NHS (N-Hydroxysulfosuccinimid-Natriumsalz, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE) zugefügt und bei Raumtemperatur 15 Min. gerührt. Danach wurde ein 40-fach molarer Überschuss des Spacers ϵ -Aca (ϵ -Aminocaprinsäure, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE) in 0,1 M MES pH 8 gelöst. Der Spacer wurde zugegeben und der pH-Wert der aktivierten Nanopartikelsuspension wurde durch Zugabe von 1 M NaOH auf pH 8 angeglichen. Das Reaktionsgemisch wurde zwei Stunden am Magnetrührer bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurden die mit ϵ -Aca modifizierten Partikel zwei Stunden gegen 0,1 M MES pH 7 dialysiert (MW Cut-Off 12 kDa). Das Dialysemedium wurde mehrfach ausgetauscht, um eine erneute Gleichgewichtseinstellung und somit eine bessere Aufreinigung zu erreichen. Im nächsten Schritt mussten die Carboxylgruppen der ϵ -Aca auf dieselbe Weise wie die der PLGA-Matrix aktiviert werden. Auch hier kam ein 20-fach molarer Überschuss an EDC und 40-fach molarer Überschuss an Sulfo-NHS zur Anwendung. Nach erfolgter Aktivierung wurden 4 mg WGA (Vector Laboratories, Burlingame, USA) in 0,1 M MES pH 8 gelöst und der Nanopartikelsuspension zugesetzt. Diese wurde auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und danach zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Carboxylgruppen, die nicht an der Reaktion beteiligt waren, wurden mit Glycin abgesättigt. Dazu wurden 2 mg Glycin in 0,1 M MES pH 8 gelöst, der Suspension zugesetzt und eine Stunde inkubiert. Zum Abschluss erfolgte eine Dialyse gegen 0,1 M MES pH 7 über mindestens acht Stunden, um etwaige Reaktionsprodukte zu entfernen (MW Cut-Off 100 kDa). Danach wurde die Partikelsuspension in kleineren Aliquoten lyophilisiert.

3.5.2. Oberflächenmodifikation mit Folsäure

Die Funktionalisierung mit Folsäure erfolgte ähnlich wie jene mit WGA. Unterschiede gab es in der Verwendung des Spacers und in der Durchführung der Kopplungsreaktion. Für die Oberflächenmodifikation mit Folsäure wurde im ersten Schritt 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan (Diamin) an die PLGA-Matrix gekoppelt. Dazu wurde zur Nanopartikelsuspension ein 20-fach molarer Überschuss von EDC und ein 40-fach molarer

Überschuss von Sulfo-NHS zugefügt, um die Carboxylgruppen zu aktivieren. Nach Ablauf der 15-minütigen Reaktionszeit wurden 2 µl Diamin beigemischt und der pH-Wert auf 8 eingestellt, um die Kopplungsreaktion zu starten. Nach zwei Stunden Reaktionszeit wurde die Suspension eine Stunde gegen 0,1 M MES pH 7 dialysiert. Im Gegensatz zur Modifikation mit WGA musste im zweiten Schritt die Folsäure (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE) aktiviert werden. Dazu wurden 1,15 mg Folsäure in 0,1 M MES pH 8 gelöst und danach der pH-Wert ins Saure verlagert. Die Aktivierung der Carboxylgruppen gelang erneut durch Zugabe eines 20-fach molaren Überschuss von EDC und eines 40-fachen molaren Überschuss von Sulfo-NHS. Nach erfolgter Aktivierung wurden die Folsäure-Lösung und die Nanopartikel-Spacer-Suspension vereint und so der zweistündige Kopplungsprozess initiiert. Die nachfolgenden Schritte wurden, wie oben bei der WGA-Modifizierung beschrieben, durchgeführt.

3.6. Zellversuche

Für die Zellversuche wurden zwei verschiedenen Zelllinien ausgewählt - zum einen die humane Blasenkarzinomzelllinie 5637 und zum anderen die humane immortalisierte Uroepithelzelllinie SV-HUC-1. Die Zellen wurden in Kulturflaschen in unterschiedlichen Nährmedien kultiviert und bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80% passagiert. Als Nährmedium für die 5637-Zellen wurde RPMI-1640-Nährmedium (Entwicklung am Roswell Park Memorial Institute) verwendet und für die SV-HUC-1-Zelllinie wurde F12K-Nährmedium (Nutrient Mixture F-12 Ham Kaighn's Modification) verwendet. Beiden Medien wurde hitzeinaktiviertes FBS (Fetal Bovine Serum, Corning Incorporated, Corning, US) und L-Glutamin (Merck KGaA, Darmstadt, DE) zugesetzt. Zusätzlich wurde das RPMI 1640-Medium mit Gentamycin (Gentamycinsulfat, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE) und das F12K-Medium mit Pen/Strep (Penicillin/Streptomycin Solution, Biowest, Nuaille, FR) supplementiert. Die Subkultivierung der Zellen gelang durch Ablösen der adhären Zellen vom Flaschenboden mithilfe von Trypsin und das tropfenweise Aussäen der Zellsuspension in neuem Nährmedium. Da für diesen Vorgang nur wenige Tropfen benötigt wurden, konnte die restliche Zellsuspension für Zellversuche genutzt werden.

3.6.1. Prüfung der Bindungsaffinität an Einzelzellen mittels Durchflusszytometrie

Zellbindungsstudien wurden bei 4°C und 37°C mit den Zelllinien 5637 und SV-HUC1 durchgeführt. Es wurde dabei das Zellinteraktionspotential funktionalisierter PLGA-Nanopartikel mit dem Zellinteraktionspotential nicht funktionalisierter PLGA-Nanopartikel derselben Charge verglichen.

Im ersten Schritt wurden die lyophilisierten Nanopartikel in 0,1 M MES pH 7 resuspendiert und im Nachhinein die Fluoreszenzintensität der Proben durch Verdünnen mit 0,1 M MES pH 7 aneinander angeglichen. Die Zellsuspension, wurde mit Hilfe einer Bürker-Türk Zählkammer ausgezählt und auf eine Zellzahl von drei Millionen Zellen pro Milliliter eingestellt. Danach wurden Nanopartikel- und Zellsuspension im Verhältnis 1:1 (insgesamt 100 µl) gemischt und ein Aliquot bei 4°C und das andere bei 37°C eine Stunde inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden alle Proben zweimal bei 1000 U/min und 4°C 5 Min. zentrifugiert (Centrifuge 5804 R, Eppendorf AG, Hamburg, D), der Überstand abgehoben und das Zellpellet mit frischem 0,1 M MES pH 7 aufgefüllt. Mit diesem Reinigungsschritt sollten ungebundene Partikel und Zellbruchstücke entfernt werden.

Es folgte die Probenvorbereitung für die Messung am Durchflusszytometer (Gallios 6C, Beckman Coulter Inc, Indianapolis, USA). Dazu wurden 900 µl 0,1 M MES pH 7 in Durchflusszytometer-Tubes vorgelegt, die 100 µl Probe hinzugegeben und die RFI-Werte (= relative zellassoziierte Fluoreszenzintensität) gemessen.

3.6.2. Prüfung der Bindungsstärke anhand von Zellmonolayer-Versuchen

Die funktionalisierten PLGA-Nanopartikel wurden in diesem Versuch mit den nicht funktionalisierten Nanopartikeln derselben Charge hinsichtlich ihrer Bindungsstärke verglichen. Weil der Vergleich anhand der zellassoziierten Fluoreszenzintensitäten erfolgte, wurden für alle Zellversuche mit BodiPy-markierte Nanopartikel verwendet. Einige Tage vor Versuchsbeginn wurde damit begonnen die Zellen in einer 96-Well-Mikrotiterplatte zu kultivieren, um darin einen Monolayer zu generieren. Bis zum Erreichen der Konfluenz des Monolayers wurden die Platten bei 37°C inkubiert. Am Tag des Versuchs wurden die lyophilisierten PLGA-Nanopartikel in isotonem 0,1 M MES pH 7 resuspendiert und die Fluoreszenzintensität der BodiPy-markierten Proben anhand eines Platten-Fluoreszenz-Readers (TECAN Infinite M200 Pro, Tecan Austria GmbH, Grödig, AT) bei 485/525 nm gemessen und auf eine einheitliche Intensität eingestellt. Nach Abschluss der Fluoreszenzeinstellung wurden die konfluenten Mikrotiterplatten aus dem Brutschrank entnommen und das Nährmedium vorsichtig abgehoben, ohne den Monolayer zu beschädigen. Danach wurden 50 µl-Aliquote der Partikelsuspensionen pro Well zugesetzt.

Dieser Arbeitsschritt wurde an zwei 96-Well-Platten durchgeführt, da zeitgleich ein Bindungsversuch bei 4°C und bei 37°C gemacht wurde.

Die Platte für den 4°C-Versuch wurde eine Stunde bei 4°C am Piezoelektrischen Kristall belassen. Die andere Platte hingegen wurde eine Stunde im Brutschrank bei 37°C mit der entsprechenden Partikelsuspension inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Fluoreszenz der beiden Platten am TECAN Infinite M200 Pro bei 485/525 nm gemessen. Diese Mess-Werte spiegelten die Sofortbeladung der Zellen mit den fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln wider. Um die Bindungsstärke detektieren zu können, wurde im nächsten Schritt der nicht gebundene Nanopartikel-Anteil durch Abheben des Überstandes sorgfältig entfernt und zweimal mit frischem isotonen 0,1 M MES pH 7 gewaschen. Im Anschluss wurde die Fluoreszenzintensität erneut bestimmt.

Im zweiten Teil des Versuchs wurden beide Versuchsansätze nochmals eine Stunde bei 37°C inkubiert und danach analog zum ersten Teil gewaschen und die Fluoreszenzintensität gemessen. Die gesammelten Messwerte der beiden Waschschritte wurden im Nachhinein in Bezug zur Sofortbeladung gesetzt und so die Bindungsstärke der einzelnen Proben berechnet.

3.6.3. Prüfung der Toxizität anhand von Zellviabilitätstests

In diesem Versuch wurden die funktionalisierten PLGA-Nanopartikel sowohl mit den nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln als auch mit den entsprechenden GemCx-Konjugaten und mit reinem Gemcitabin hinsichtlich ihrer Toxizität verglichen. Dazu wurde die Veränderung der Zellviabilität nach Inkubation mit den verschiedenen Proben genutzt, welche durch sogenannte XTT (Natrium-3,3'-[1-(phenylamino)-carbonyl-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)-benzol-sulfonsäurehydrat)-Tests angezeigt wird. Das verwendete Reagens ist ein gelber wasserlöslicher Farbstoff, welcher durch eine Enzymreaktion in ein rot gefärbtes Formazan umgewandelt wird und am Mikroplatten-Reader bei 492 nm und 450 nm detektiert werden kann. Nur vitale Zellen verursachen eine Umwandlung. Damit korreliert die detektierte Absorption mit der Menge an lebenden Zellen bzw. im Umkehrschluss mit der Toxizität der jeweiligen Probe.

Die Versuche wurden an Zellmonolayern in einer 96-Well-Platte durchgeführt. Die lyophilisierten PLGA-Nanopartikel wurden zunächst in 1 ml 0,1 M MES pH 7 resuspendiert. Alle untersuchten Proben wurden auf den gleichen Gemcitabin-Gehalt eingestellt, damit diese hinsichtlich ihrer Toxizität vergleichbar waren. Es wurden auch dementsprechende Verdünnungen von reinem Gemcitabin und der nicht-verkapselten GemCx-Konjugate hergestellt. Weiters wurden RPMI, eine Mischung aus RPMI und 0,1 M MES pH 7 sowie XTT-Reagens in zellfreien Wells als Leerwert gemessen. Danach wurde in jedes Well,

ausgenommen in jene der entsprechenden Leerwerte, 100 µl RPMI vorgelegt und das gleiche Volumen der jeweiligen Probe hinzugefügt. Die Platte wurde bei 37°C im Brutschrank so lange inkubiert, bis die Zellen in den Wells, in denen sich die Blank-Proben befanden, einen konfluenten Monolayer bildeten. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend aus dem Brutschrank entnommen, der Überstand vorsichtig abgehoben und durch 200 µl farblosem RPMI (ohne Phenolrot) ersetzt. In das frische Medium wurden 20 µl des XTT-Reagens pro Well gegeben, die Platten zwei Stunden bei 37°C inkubiert und danach die Absorption am TECAN Infinite M200 Pro bestimmt. Dabei erfolgte eine duale Wellenlängenmessung: die Messwellenlänge lag bei 450 nm bzw. 492 nm und die Referenzwellenlänge bei 620 nm. Nach der Messung wurde die Platte erneut bei 37°C inkubiert und es folgten weitere Messungen nach der insgesamt dritten und vierten Stunde.

4. Ergebnisse

4.1. Nanopartikelherstellung

Die Solvent-Evaporation Methode lieferte durch Ultraschallbehandlung mit einer Amplitude von 60% und einer Dauer von 2 Minuten und 30 Sekunden eine zunächst grobdisperse Partikelsuspension. Diese wurde daher im Nachhinein durch Resuspendieren und Zentrifugation gereinigt, was im Endeffekt zu einem monodispersen System mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von < 200 nm bei einem durchschnittlichen PDI $< 0,1$ führte.

4.2. Qualitätsprüfung der hergestellten Nanopartikel

4.2.1. In-Prozess Kontrolle der Partikelgröße und des PDI

Zur Reinigung der Nanopartikelsuspension dienten neun Zentrifugations-/Resuspendierungsschritte bei unterschiedlicher Temperatur, Zeit und Geschwindigkeit. Nach jedem dieser Zentrifugationsschritte wurde die durchschnittliche Partikelgröße und die Partikelgrößenverteilung (PDI) gemessen. Für die endgültige Nanopartikel-Suspension wurden nur Partikel bestimmter Zentrifugationsschritte vereint, die einen Nanopartikelpool ergeben sollten. Diese Schritte wurden ausgewählt, weil so die größte Menge an Partikeln mit enger Größenverteilung und hoher Wirkstoffbeladung gewonnen werden konnte. [Abbildung 1] Zudem konnte durch die In-Prozess Kontrolle das Herstellungsprotokoll laufend überprüft und während der Herstellung Unterschiede der einzelnen Chargen ermittelt und dokumentiert werden.

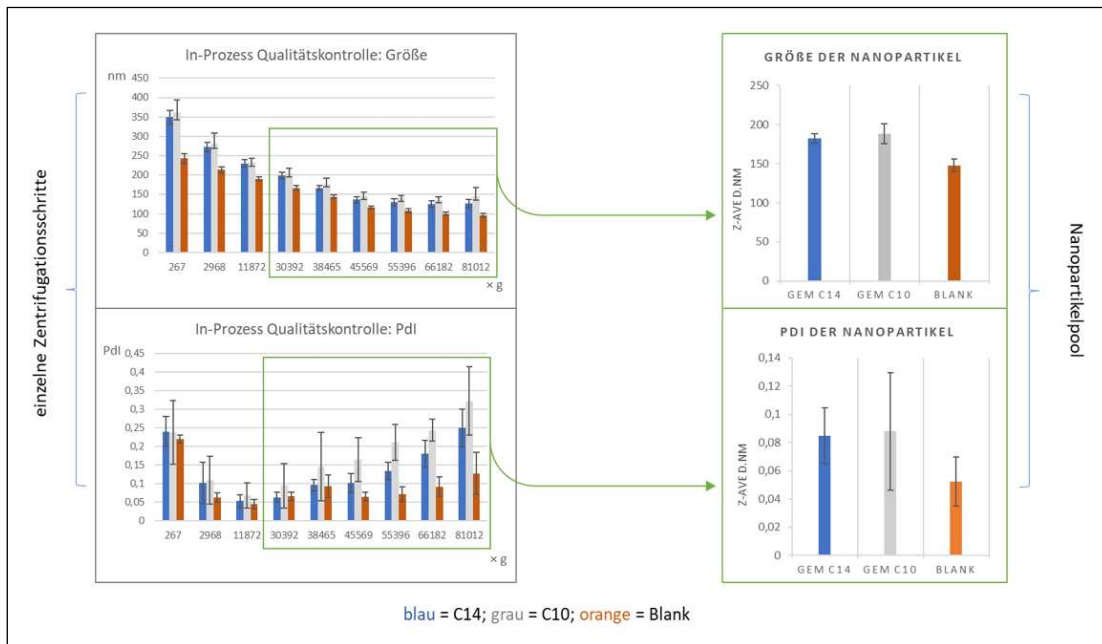


Abbildung 1: Größenverteilung und PDI der Partikelsuspensionen nach jedem Zentrifugationsschritt

Abbildung 1 zeigt, dass die Partikelgröße mit steigender Zentrifugationsdrehzahl abnimmt und sich innerhalb der letzten vier Zentrifugationsschritte auf eine annähernd gleiche Partikelgröße von 150 nm einpendelt. Dies gilt sowohl für GemC10-, GemC14-, als auch für Blank-PLGA-Nanopartikel. Größere Unterschiede sind allerdings im Verlauf des PDI-Wertes zwischen GemC14- und GemC10-PLGA-Nanopartikeln zu erkennen. Während sich die PDI-Werte der GemC14-PLGA-Nanopartikel und der Blank-PLGA-Nanopartikel bis zum letzten Schritt im Mittel zwischen 0,05 und 0,25 bewegen, steigen diese bei den GemC10-PLGA-Nanopartikeln gegen Ende immer stärker an, bis auf einen Wert von über 0,3. Die hohen Werte der GemC10-PLGA-Nanopartikel wurden durch das Aneinanderkleben während der Zentrifugation unter höchster Zentrifugalkraft erklärt. Diese Agglomeration war bei hohen Zentrifugationsgeschwindigkeiten so stark ausgeprägt, dass diese durch anschließendes Resuspendieren nicht mehr vollends getrennt werden konnte und so die hohen PDI-Werte ergab. Da die Nanopartikelsuspensionen im Anschluss gepoolt und filtriert wurden, waren die gepoolten Nanopartikel-Suspensionen wieder eindeutig monodisperse Systeme mit PDI-Werten < 0,2. Weiters waren die Partikel im GemC14- und GemC10-PLGA-Nanopartikelpool im Schnitt um ca. 40 nm größer als die Blank-Partikelsuspension. Zwischen den beiden Nanopartikelpools mit unterschiedlichen Gemcitabin-Konjugaten gab es hinsichtlich Partikelgröße und PDI-Wert keine signifikanten Unterschiede. Die kleinsten PDI-Werte zeigten die Blank-PLGA-Nanopartikel mit einem

Durchschnittswert des Nanopartikelpools von $< 0,06$. [Tabelle 2] Die Herstellung laut diesem Protokoll lieferte demnach Partikel im Nanomaßstab mit enger Größenverteilung.

Tabelle 2: Durchschnittliche Partikelgröße und PDI der Nanopartikelpools

Nanopartikel	Partikelgröße	PDI
GemC14-PLGA-Nanopartikel	182,404 $\pm$ 5,684 nm	0,085 $\pm$ 0,020
GemC10-PLGA-Nanopartikel	188,262 $\pm$ 12,655 nm	0,088 $\pm$ 0,042
Blank-PLGA-Nanopartikel	147,773 $\pm$ 7,954 nm	0,052 $\pm$ 0,017

4.3. Quantifizierung von GemCx mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

In einem weiteren Schritt wurde der GemCx-Einbau in die hergestellte Nanopartikelsuspension mittels HPLC ermittelt. Hierzu wurden die lyophilisierten PLGA-Nanopartikel in 50:50 Isopropanol/MeOH aufgenommen und das GemCx-Derivat gelöst. Anschließend wurden die Proben bei 14000 U/Min und 4°C 30 Min zentrifugiert und der Wirkstoffgehalt im klaren Überstand mittels HPLC bestimmt.

Die Auswertung erfolgte durch Berechnung der Encapsulation Efficiency (EE) und der Loading Capacity (LC). Die EE gibt an wieviel Prozent des eingesetzten Wirkstoffs im Nanopartikel eingebaut sind, während die LC angibt, wieviel Prozent des Partikels aus Wirkstoff bestehen.

Tabelle 3: Durchschnittliche EE und LC der GemCx-PLGA-Nanopartikel

PLGA-Nanopartikel	EE	LC
GemC14 in 0,1% PVA	56,73 $\pm$ 3,68%	9,66 $\pm$ 0,87%
GemC14 in H₂O	31,39 $\pm$ 0,32%	5,17 $\pm$ 0,05%
GemC10 in 0,1% PVA	51,10 $\pm$ 6,92%	8,54 $\pm$ 1,58%
GemC10 in H₂O	32,88 $\pm$ 0,73%	5,12 $\pm$ 0,11%

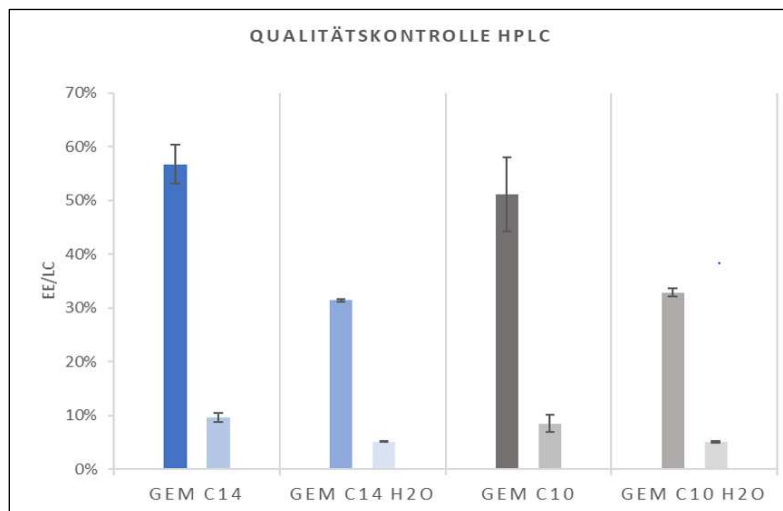


Abbildung 2: EE und LC der hergestellten GemCx-PLGA-Nanopartikel

In Abbildung 2 und anhand der Werte aus Tabelle 3 ist zu erkennen, dass sowohl die EE als auch die LC von GemC14-PLGA-Nanopartikeln im Vergleich zu GemC10-PLGA-Nanopartikeln geringfügig höher ist. Außerdem ist die Abweichung der berechneten Einbauraten bei GemC14-PLGA-Nanopartikeln geringer.

4.3.1. Einfluss der Herstellungsmedien auf die Einbauraten von GemCx

Für die Herstellung der PLGA-Nanopartikel wurden unterschiedliche wässrige Phasen ausprobiert: partikelfreies Wasser, 0,05%ige wässrige PVA-Lösung und 0,1%ige wässrige PVA-Lösung. Die anfängliche PVA-Konzentration von 0,1% sollte in diesem Experiment reduziert werden. Der Grund dafür war die Annahme, dass PVA die Funktionalisierung der Nanopartikeloberfläche behindert, weil es die funktionellen Gruppen an der Partikeloberfläche abschirmt und diese dadurch nicht mehr für die Reaktion mit Targeter-Molekülen bereitstehen, woraus eine geringe bzw. stark schwankende Kopplungseffizienz resultiert.

Das Ergebnis zeigte allerdings, dass sich die Herstellung umso massiver beeinträchtigt wurde, je weniger PVA verwendet wurde. Durch die Reduktion der PVA-Menge verklumpte die Partikelsuspension, wodurch die abschließende Filtration des Nanopartikelpools sehr schwierig war und der Filter mehrmals wegen Verstopfens getauscht werden musste. Zudem konnten die lyophilisierten Nanopartikel nicht mehr zu einer stabilen Suspension mit enger Partikelgrößenverteilung redispergiert werden. Daher wurde wieder die ursprüngliche Konzentration von 0,1% PVA eingesetzt.

Ein zweiter Nachteil zeigte sich bei Betrachtung der Einbauraten der GemCx-Konjugate in die PLGA-Nanopartikel. Der Vergleich von partikelfreiem Wasser mit 0,1% PVA-Lösung

zeigt eine deutliche Abnahme sowohl der LC als auch der EE bei Verwendung von partikelfreiem Wasser. Dies führte zu einer Reduktion der EE von GemC10 um 35,66% und der LC um 40,05%. Bei GemC14 sank die EE um 44,67 % und die LC um 46,48%. [Abbildung 2]

4.4. Stabilität der Gemcitabin-Fettsäure-Konjugate

Da für die Partikelherstellung als auch für eine mögliche Applikation, eine gewisse Stabilität der GemCx-Konjugate Voraussetzung ist, wurde die Stabilität von GemC6, GemC10 und GemC14 in Kunsturin pH 7 (AU7) untersucht. Nur so konnte ein vorzeitiger Wirkverlust des Konjugats schon während der Herstellung und der Zellinteraktionsversuche ausgeschlossen werden, was im Nachhinein zu verfälschten Ergebnissen geführt hätte.

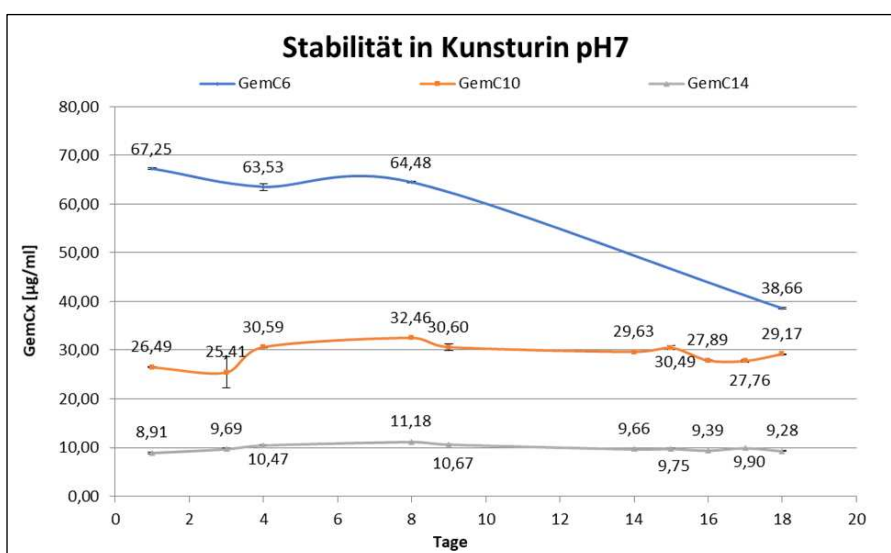


Abbildung 3: Stabilität der unterschiedlichen GemCx-Konjugate in Kunsturin pH 7

In Abbildung 3 sind links die Anfangskonzentrationen der jeweiligen GemCx-Konjugate dargestellt und weiter nach rechts deren Änderung über einen Zeitraum von 18 Tagen. Es fällt auf, dass sowohl das GemC10-, als auch das GemC14-Konjugat innerhalb eines gewissen Schwankungsbereiches stabil blieben, wohingegen das GemC6-Konjugat ab dem achten Tag stetig abgebaut wurde, sodass nach 18 Tagen nur mehr 57,49% des Wirkstoffes detektiert werden konnten. Dieses Ergebnis zeigte deutlich, dass das C6-Konjugat instabiler ist als die anderen beiden GemCx-Konjugate und deshalb für die nachstehenden Versuche ausgeschlossen wurde.

4.5. GemCx-Freisetzung aus PLGA-Nanopartikeln innerhalb von sechs Tagen

Einerseits ist die Stabilität des Gemcitabin-Konjugats maßgeblich für den Einbau in das Nanopartikel, andererseits ist auch die Stabilität des Wirkstoffeinbaus für eine nachfolgende Modifikation oder Weiterverarbeitung der Partikelsuspension entscheidend. Daher wurde die Wirkstofffreisetzung innerhalb eines hypothetischen Zeitfensters von sechs Tagen, das den maximalen Zeitraum für eine Oberflächenmodifikation darstellt, bei 4°C untersucht.

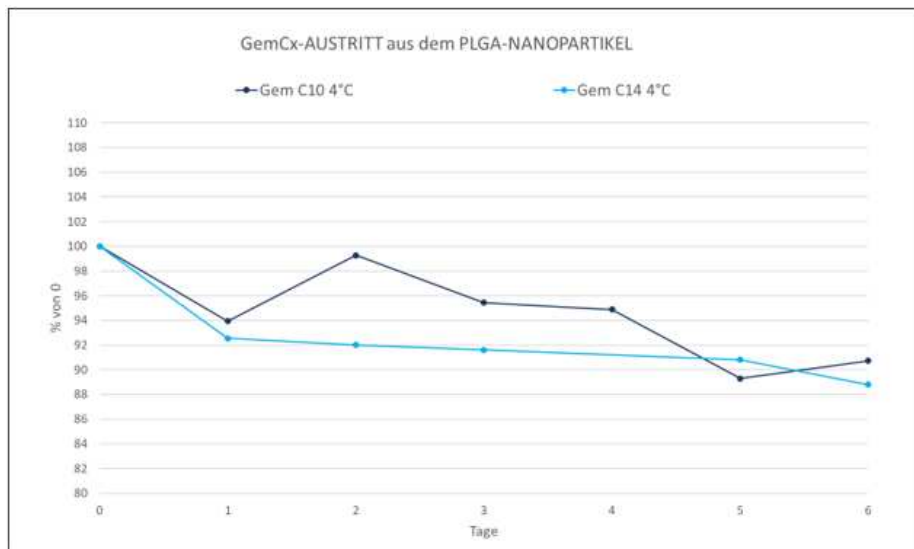


Abbildung 4: Freisetzungsprofil der GemCx-Konjugate aus PLGA-Nanopartikeln (Pellet als Probenmaterial)

Die Ausgangskonzentrationen der jeweiligen Proben entsprachen 100% der im Pellet befindlichen Menge an GemCx-Konjugaten und es wurde die prozentuelle Abnahme davon im Pellet durch Austritt aus dem PLGA-Nanopartikel gemessen. Bei 4°C schwankten die Werte vom GemC10-Konjugat zwischen 100% und 90,72% und die des GemC14-Konjugats zwischen 100% und 88,81%, sodass die eingebauten GemCx-Konjugate nur in geringen Mengen von maximal 11,19% des Gesamtgehaltes vorzeitig freigesetzt werden. Durch diese Erkenntnis konnten die nachfolgenden Experimente angepasst werden. So konnte das Protokoll für die Funktionalisierung der PLGA-Nanopartikel mit den Targeter-Molekülen optimiert werden, indem die Dialysezeiten verlängert wurden. Das Resultat war die verbesserte Abtrennung unerwünschter Reaktionsprodukte und die dadurch erhöhte Reinheit der funktionalisierten Nanopartikel.

4.6. Zellbindungsstudien mit funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln

Nachdem die PLGA-Nanopartikel mit den Targeter-Molekülen Folsäure und WGA funktionalisiert wurden, erfolgten Zellbindungsstudien der funktionalisierten und nicht funktionalisierten Nanopartikel. Einerseits wurde die Bindungsrate und die Bindungsstärke der funktionalisierten Nanopartikel im Vergleich zu den nicht funktionalisierten Nanopartikeln anhand von Einzelzell- und Zellmonolayer-Versuchen untersucht. Andererseits dienten Zellviabilitätstests zur Abschätzung der Zytotoxizität der funktionalisierten PLGA-Nanopartikel, der nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikel, der nicht verkapselten GemCx-Konjugate sowie des nicht konjugiertem Gemcitabins. Alle Zellversuche wurden mit den beiden Zelllinien 5637 und SV-HUC-1 durchgeführt.

4.6.1. Ergebnisse der Zellbindungsstudien mit WGA-funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln

4.6.1.1. Ergebnisse der Einzelzell-Bindungsversuche mit WGA-funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln

In diesem Versuch wurde eine Zellsuspension mit funktionalisierten und nicht funktionalisierten Nanopartikeln bei 4°C oder 37°C inkubiert und anschließend die relative zellassoziierte Fluoreszenzintensität mittels Durchflusszytometrie gemessen. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt, um die Aussagekraft zu erhöhen. Zur Auswertung wurden die gemittelten Werte der Bindungsversuche mit nicht funktionalisierten Nanopartikeln als 100% festgelegt und die RFI der entsprechenden funktionalisierten Nanopartikel darauf bezogen.

4.6.1.1.1. Zellbindungsversuche von WGA-funktionalisierten Nanopartikeln an SV-HUC-1-Einzelnzellen

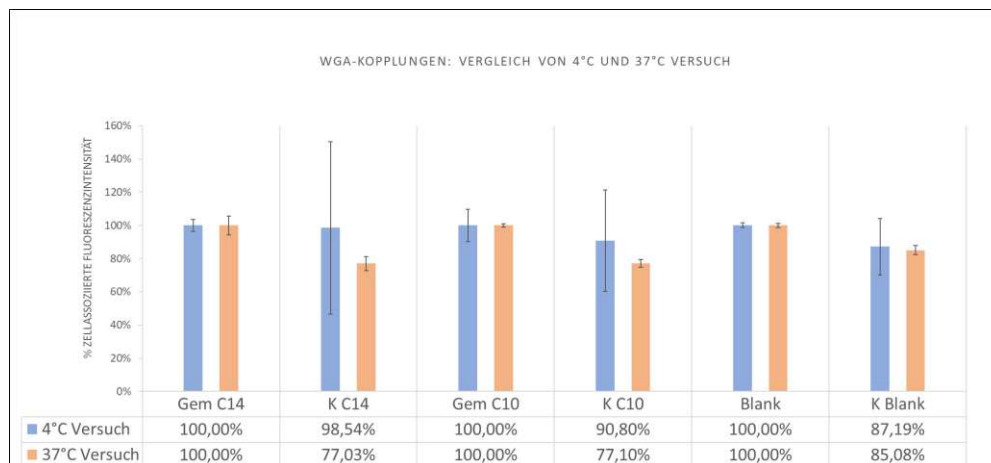


Abbildung 5: Bindung von WGA-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an SV-HUC-1-Einzelnzellen nach Inkubation bei 4°C und 37°C

(Gem C14...GemC14-beladene PLGA-NP, K C14... GemC14-beladene, WGA-funktionalisierte PLGA-NP, Gem C10...GemC10-beladene PLGA-NP, K C10... GemC10-beladene, WGA-funktionalisierte PLGA-NP, Blank...PLGA-NP, K Blank...WGA-funktionalisierte PLGA-NP)

Wie aus Abbildung 5 ersichtlich ist, ergaben sich durch die Funktionalisierung weder im 4°C-, noch im 37°C-Setting signifikant große Unterschiede zu den nicht funktionalisierten Nanopartikeln. Bei 4°C zeigten die WGA-funktionalisierten PLGA-Nanopartikel sowohl mit eingebautem GemC14- als auch GemC10-Konjugat eine nur geringfügig niedrigere Fluoreszenzintensität als die zugehörige nicht funktionalisierte Charge. Im 37°C Versuch war, zumindest auf den ersten Blick, die Bindungsrate aller funktionalisierten Nanopartikel geringer als die der nicht funktionalisierten Chargen.

4.6.1.1.2. Zellbindungsversuche von WGA-funktionalisierten Nanopartikeln an 5637-Einzelzellen

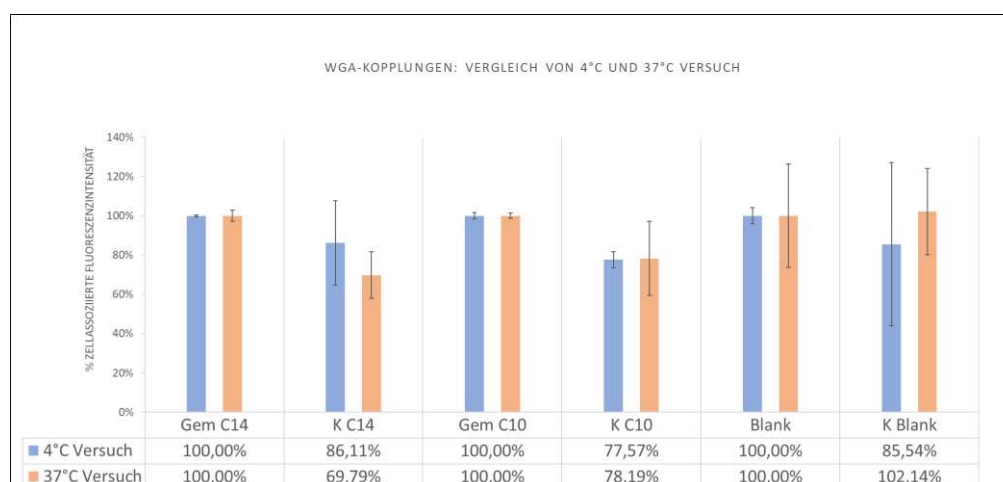


Abbildung 6: Bindungsaffinität von WGA-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an 5637-Einzelzellen nach Inkubation bei 4°C und 37°C

(Gem C14...GemC14-beladene PLGA-NP, K C14... GemC14-beladene, WGA-funktionalisierte PLGA-NP, Gem C10...GemC10-beladene PLGA-NP, K C10... GemC10-beladene, WGA-funktionalisierte PLGA-NP, Blank...PLGA-NP, K Blank...WGA-funktionalisierte PLGA-NP)

Wie in Abbildung 6 dargestellt, bestanden im 4°C Versuch zwischen allen Proben nur sehr kleine Unterschiede in der 5637-Einzelzell-Bindungsrate. Die funktionalisierten GemC14-PLGA-Nanopartikel zeigten etwas geringere Werte im Vergleich mit den nicht funktionalisierten GemC14-PLGA-Nanopartikeln, nicht aber im Vergleich mit allen anderen Proben. Im 37°C Experiment konnte für alle funktionalisierten PLGA-Nanopartikel mit eingebautem GemCx-Konjugat im Vergleich zu den zugehörigen nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln eine geringere Bindungsrate beobachtet werden. Die funktionalisierten Blank-Partikel übertrafen die nicht funktionalisierten mit geringfügig höheren RFI-Werten ($100 \pm 26,30\%$ vs. $102,14 \pm 21,88\%$).

4.6.1.2. Ergebnisse der Bindungsversuche an Zellmonolayer von WGA-funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln

Für die Zellmonolayer-Versuche wurden die in 96-Well-Mikrotiterplatten kultivierten Monolayer mit den jeweiligen fluoreszenzmarkierten Partikelsuspensionen inkubiert und die zellassoziierte Fluoreszenzintensität bei 485/525 nm (ex/em) detektiert. Die Versuche wurden zudem zeitgleich bei 4°C und 37°C durchgeführt.

Es wurde die Bindungsrate der nicht funktionalisierten Nanopartikel mit den zugehörigen funktionalisierten Nanopartikeln verglichen, um feststellen zu können, ob die Bindungsrate durch die Funktionalisierung erhöht wurde.

4.6.1.2.1. Bindungsversuche von WGA-funktionalisierten Nanopartikeln an SV-HUC-1-Monolayer

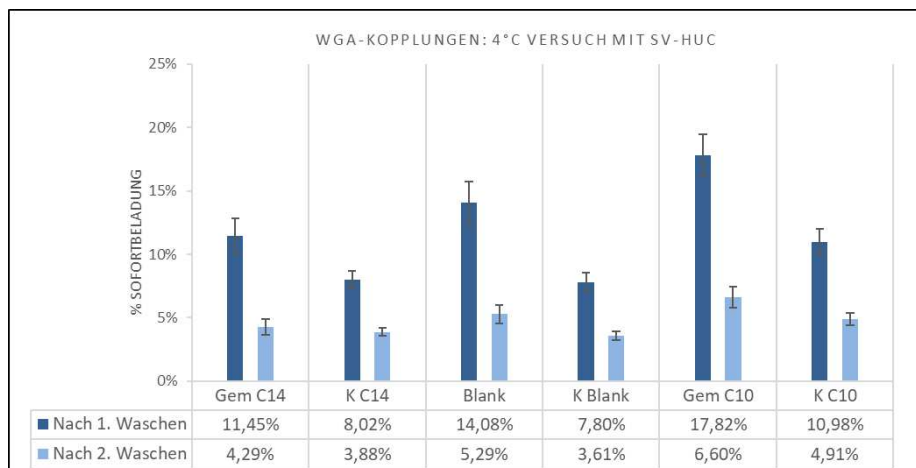


Abbildung 7: Bindungsrate von WGA-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an SV-HUC-1-Monolayer nach einstündiger Inkubation bei 4°C

(Gem C14...GemC14-beladene PLGA-NP, K C14... GemC14-beladene, WGA-funktionalisierte PLGA-NP, Gem C10...GemC10-beladene PLGA-NP, K C10... GemC10-beladene, WGA-funktionalisierte PLGA-NP, Blank...PLGA-NP, K Blank...WGA-funktionalisierte PLGA-NP)

Wie aus der Abbildung zu erkennen ist, nahm die Bindungsrate aller Nanopartikel durch Funktionalisierung mit WGA ab, wobei die Fluoreszenzintensität der WGA-funktionalisierten PLGA-Nanopartikel im ersten Waschschrift stärker abnahm als bei den nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln. Die Differenz zwischen den erstem und zweitem Waschschrift war allerdings bei den funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln geringer, was auf eine erhöhte Stabilität der Bindung hinweist.

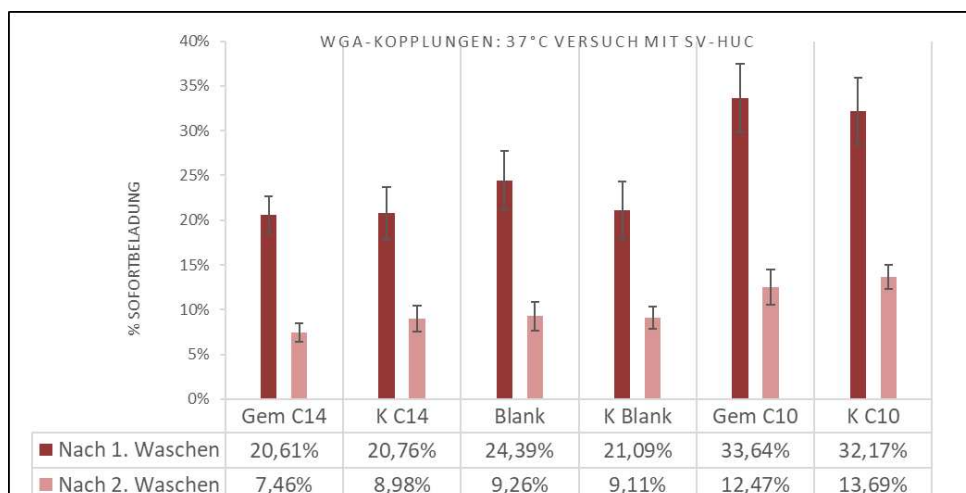


Abbildung 8: Bindungsrate von WGA-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an SV-HUC-1-Monolayer nach einstündiger Inkubation bei 37°C

(Gem C14...GemC14-beladene PLGA-NP, K C14... GemC14-beladene, WGA-funktionalisierte PLGA-NP, Gem C10...GemC10-beladene PLGA-NP, K C10... GemC10-beladene, WGA-funktionalisierte PLGA-NP, Blank...PLGA-NP, K Blank...WGA-funktionalisierte PLGA-NP)

Im 37°C-Setting war im Vergleich zum Versuch bei 4°C die gemessene zellassoziierte Fluoreszenzintensität nach dem ersten Waschschrift höher. Nach Inkubation der Zellmonolayer mit den Partikelsuspensionen bei 37°C verblieben nach dem ersten Waschvorgang durchschnittlich 25% der Partikel im Vergleich zu 11,69% nach einer Inkubation bei 4°C. Obwohl die Bindungsstärke nach einmaligem Waschen bei 37°C stärker erschien als bei 4°C sanken die Werte jedoch nach dem zweiten Waschschrift um 2,2-fache mehr ab als bei 4°C. Die Differenzen zwischen den Waschschriften bei 37°C betrugen durchschnittlich 15,28%. Im 4°C Versuch lag die durchschnittliche Differenz zwischen den Waschschriften bei 6,93%. Daher ist die Bindungsrate und -stärke unter anderem von der Temperatur abhängig. Im 37°C-Versuch ist des Weiteren zu sehen, dass die Bindungsstärke der beiden WGA-funktionalisierten GemCx-PLGA-Nanopartikel Chargen nach dem ersten Waschschrift, geringfügig geringer war als die der nicht funktionalisierten Nanopartikel Allerdings blieb nach dem zweiten Waschen die Bindung an die SV-HUC-1-Zellen stabiler. [Abbildung 7, 8]

4.6.1.2.2. Bindungsversuche von WGA-funktionalisierten Nanopartikeln an 5637-Monolayer

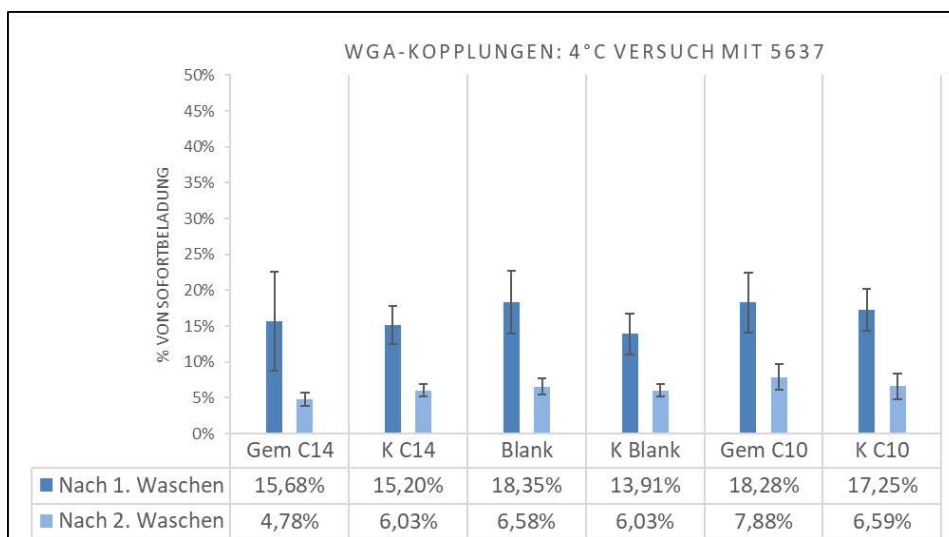


Abbildung 9: Bindungsrate von WGA-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an 5637-Monolayer nach einstündiger Inkubation bei 4°C

(Gem C14...GemC14-beladene PLGA-NP, K C14... GemC14-beladene, WGA-funktionalisierte PLGA-NP, Gem C10...GemC10-beladene PLGA-NP, K C10... GemC10-beladene, WGA-funktionalisierte PLGA-NP, Blank...PLGA-NP, K Blank...WGA-funktionalisierte PLGA-NP)

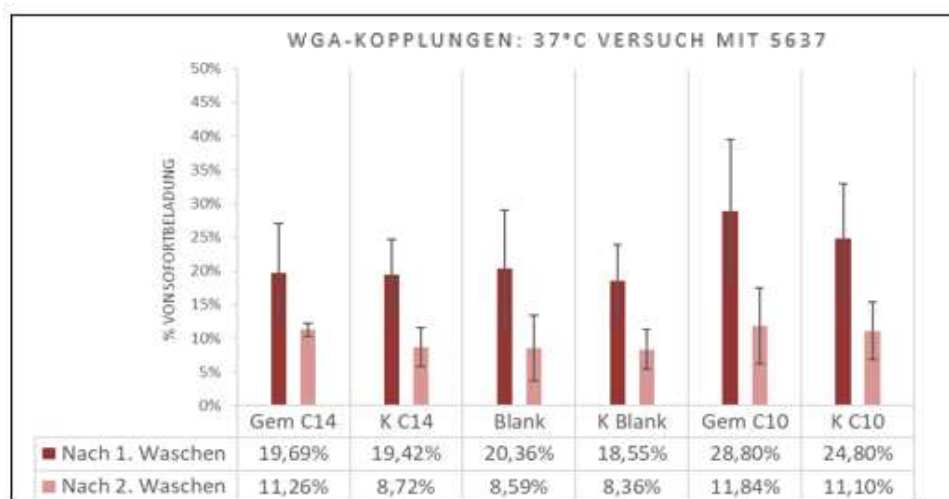


Abbildung 10: Bindungsrate von WGA-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an 5637-Monolayer nach einstündiger Inkubation bei 37°C

(Gem C14...GemC14-beladene PLGA-NP, K C14... GemC14-beladene, WGA-funktionalisierte PLGA-NP, Gem C10...GemC10-beladene PLGA-NP, K C10... GemC10-beladene, WGA-funktionalisierte PLGA-NP, Blank...PLGA-NP, K Blank...WGA-funktionalisierte PLGA-NP)

Die Zellbindungsversuche an 5637-Monolayer zeigten ähnliche Ergebnisse wie am SV-HUC-1-Monolayer. Bei 37°C wurde für WGA-funktionalisierte PLGA-Nanopartikel dieselbe Tendenz hinsichtlich der Bindungsrate und -stabilität beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass durch Funktionalisierung der Partikel mit WGA die Zellbindung während der Waschschrte beständiger ist. Wird diese „Beständigkeit“ bei 4°C- und 37°C-Inkubation verglichen, ergibt sich eine ausgeprägtere Bindungsstabilität bei 4°C. Lediglich GemC14-PLGA-Nanopartikel stellen möglicherweise eine Ausnahme bezüglich der Stabilität der Bindung an die 5637-Zellen dar, da die Fluoreszenzintensitäten im Gegensatz zu den nicht funktionalisierten Partikeln etwas stärker abfielen. [Abbildung 9, 10]

In allen Versuchen mit den beiden Zelllinien konnte mit diesem Versuchsprotokoll kein Vorteil der Funktionalisierung auf die initiale Zellbindung der Nanopartikel nachgewiesen werden, allerdings wurde eine leicht erhöhte Beständigkeit der Bindung für alle mit WGA funktionalisierten Nanopartikel bestätigt. [Abbildung 7, 8, 9, 10]

4.6.2. Ergebnisse der Zellbindungsstudien von Folsäure-funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln

4.6.2.1. Ergebnisse der Bindungsversuche an Einzelzellen von Folsäure-funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln

Der Versuchsaufbau der Bindungsstudien mit Folsäure-funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln war mit dem der WGA-funktionalisierten PLGA-Nanopartikel ident und ist in Punkt 4.6.1.1. beschrieben.

4.6.2.1.1. Bindungsversuche von Folsäure-funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an SV-HUC-1-Einzelzellen

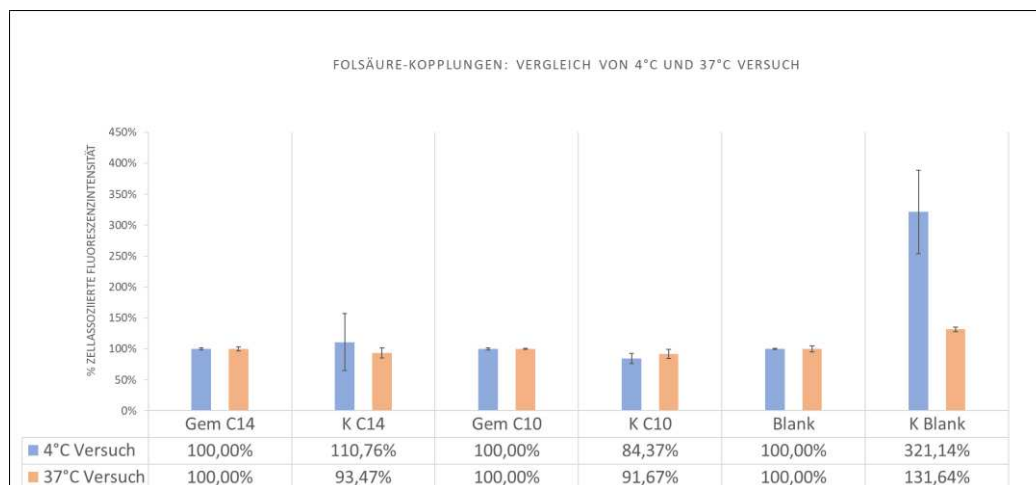


Abbildung 11: Bindungsrate von Folsäure-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an SV-HUC-1-Einzelzellen nach Inkubation bei 4°C und 37°C

(Gem C14...GemC14-beladene PLGA-NP, K C14... GemC14-beladene, Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP, Gem C10...GemC10-beladene PLGA-NP, K C10... GemC10-beladene, Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP, Blank...PLGA-NP, K Blank...Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP)

In Abbildung 11 ist zu erkennen, dass die Folat-funktionalisierten GemC14-PLGA-Nanopartikel im Vergleich mit den nicht funktionalisierten im 4°C-Setting eine höhere Fluoreszenzintensität und damit eine höhere Zellbindungsrate aufwiesen. Obwohl der extrem hohe Wert der funktionalisierten Blank-Partikel bei 4°C mit hoher Wahrscheinlichkeit einen Ausreißer darstellt, spiegelt die Fluoreszenzintensität derselben Partikel bei 37°C die höhere Bindungsrate ebenso wider (100,00 ± 4,64%vs. 131,64 ± 3,48%). In diesem Versuch zeigten GemC10-PLGA-Partikel keine erhöhte Bindungsrate durch Funktionalisierung mit Folsäure.

4.6.2.1.2. Bindungsversuche von Folsäure-funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an 5637-Einzelzellen

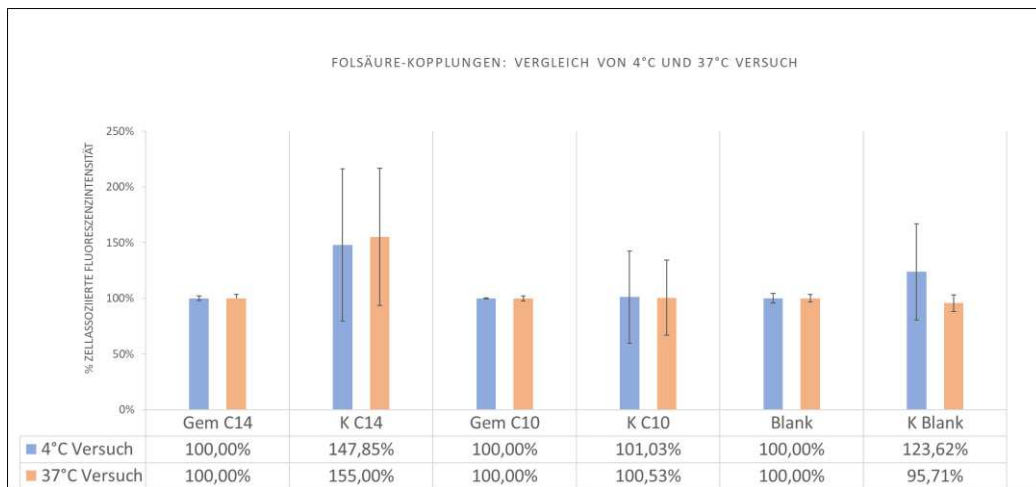


Abbildung 12: Bindungsrate von Folsäure-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an 5637-Einzelzellen nach Inkubation bei 4°C und 37°C

(Gem C14...GemC14-beladene PLGA-NP, K C14... GemC14-beladene, Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP, Gem C10...GemC10-beladene PLGA-NP, K C10... GemC10-beladene, Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP, Blank...PLGA-NP, K Blank...Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP)

Die Bindungsaffinität von Folsäure-funktionalisierten PLGA-Partikeln wurden auch an 5637-Einzelzellen untersucht. Wie in der Abbildung 12 zu sehen ist, zeigten vor allem die funktionalisierten GemC14-PLGA-Nanopartikel eine hohe zellassoziierte Fluoreszenzintensität. Diese war im 4°C-Setting um 47,85% und im 37°C-Setting um 55,00% höher als die der nicht funktionalisierten GemC14-PLGA-Nanopartikel. Im Gegensatz dazu war die Bindungsrate von GemC10-PLGA-Nanopartikeln bei beiden Temperaturstufen unabhängig von der Funktionalisierung. Die funktionalisierten Blank-Nanopartikel zeigten im 4°C Versuch ebenfalls eine erhöhte Bindungsrate.

4.6.2.2. Ergebnisse der Bindungsversuche an Zellmonolayer von Folsäure-funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln

Die Zellmonolayer-Versuche von Folsäure-funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln waren den Versuchen mit WGA-funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln ident und sind in Punkt 4.6.1.2. beschrieben.

4.6.2.2.1. Bindungsversuche von Folsäure-funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an SV-HUC-1-Monolayer

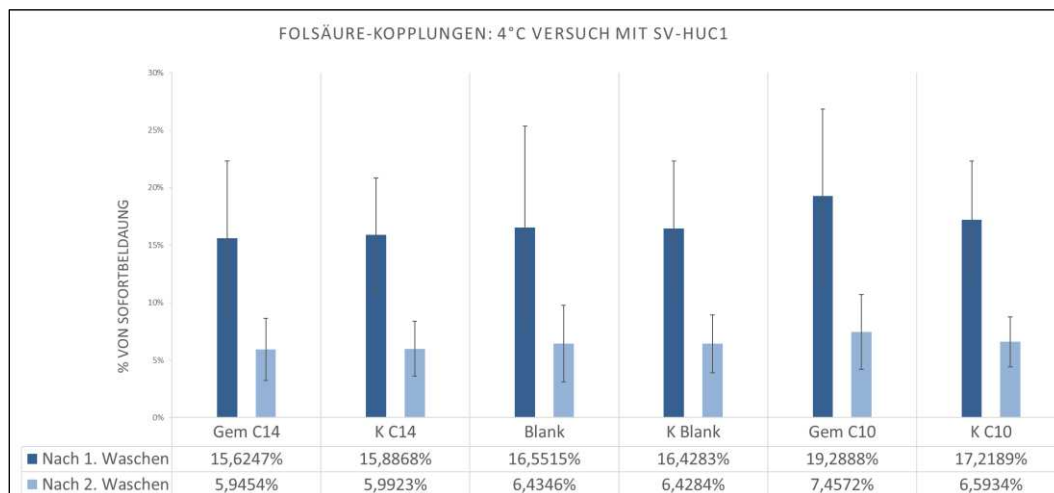


Abbildung 13: Bindungsrate von Folsäure-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an SV-HUC-1-Monolayer nach einstündiger Inkubation bei 4°C

(Gem C14...GemC14-beladene PLGA-NP, K C14... GemC14-beladene, Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP, Gem C10...GemC10-beladene PLGA-NP, K C10... GemC10-beladene, Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP, Blank...PLGA-NP, K Blank...Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP)

In diesem Versuch wurde die Bindungsrate und -stabilität von Folsäure-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an SV-HUC-1-Monolayern untersucht. Dazu wurden Folsäure-funktionalisierte Gem14-, GemC10- und Blank-PLGA-Nanopartikel verwendet und die an SV-HUC-1-Zellen vorhandene Fluoreszenz der mit BodiPy-markierten Nanopartikel als Maß für die Bindungsrate herangezogen. Im Zellbindungs-Experiment bei 4°C sind, wie in Abbildung 13 zu sehen ist, kaum Unterschiede zwischen funktionalisierten und nicht funktionalisierten Partikelsuspensionen zu erkennen. Lediglich die funktionalisierten GemC10-PLGA-Nanopartikel zeigten eine im Vergleich zu den nicht funktionalisierten GemC10-Nanopartikeln verminderte Fluoreszenzintensität sowohl bei 4°C als auch 37°C. [Abbildung 13]

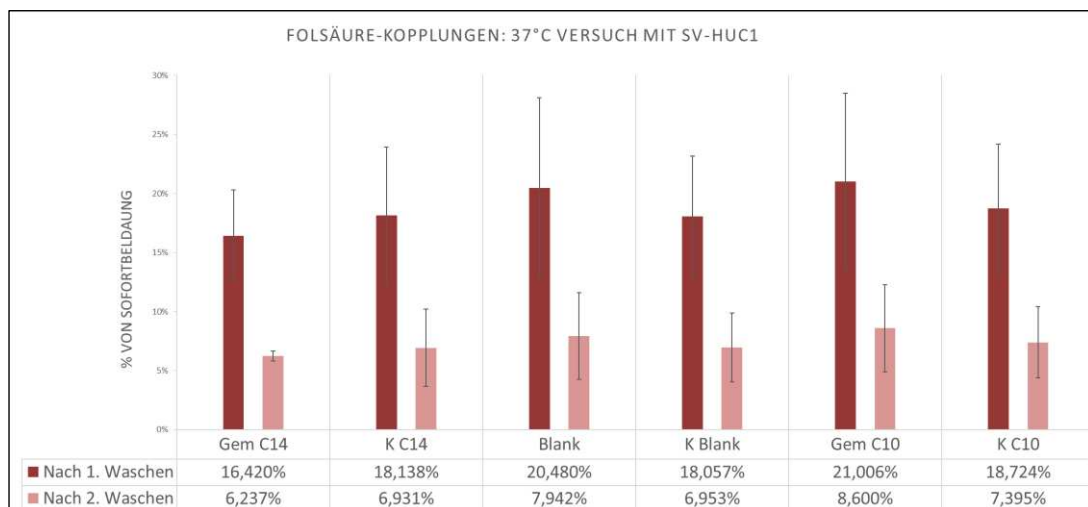


Abbildung 14: Bindungsrate von Folsäure-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an SV-HUC-1-Monolayer nach einstündiger Inkubation bei 37°C

(Gem C14...GemC14-beladene PLGA-NP, K C14... GemC14-beladene, Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP, Gem C10...GemC10-beladene PLGA-NP, K C10... GemC10-beladene, Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP, Blank...PLGA-NP, K Blank...Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP)

Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der Partikel-Zellinteraktion von Folsäure-modifizierten und nicht modifizierten PLGA-Nanopartikeln bei 37°C an SV-HUC-1-Monolayern. Entsprechend dieser Versuche bewirkte die Funktionalisierung von GemC14-PLGA-Nanopartikeln mit Folsäure eine geringfügige Zunahme der Zellbindungsrate. Allerdings konnte dieser Bindungsvorteil nach einem erneuten Waschvorgang nicht aufrechterhalten werden. Bei GemC10-PLGA-Nanopartikeln als auch Blank-PLGA-Nanopartikeln bewirkte die Funktionalisierung mit Folsäure keine Änderung von Bindungsrate und Bindungsstärke.

4.6.2.2.2. Bindungsversuche von Folsäure-funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an 5637-Monolayer

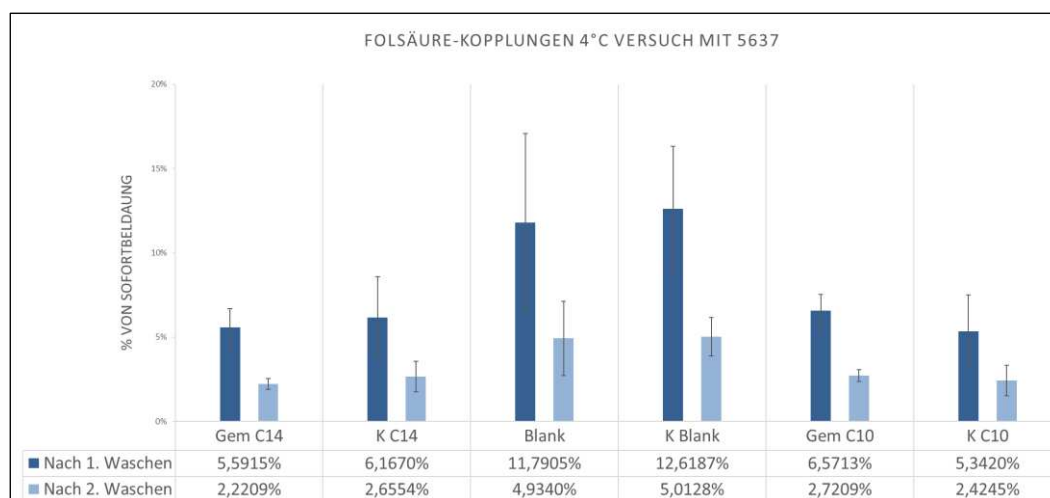


Abbildung 15: Bindungsrate von Folsäure-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an 5637-Monolayer nach Inkubation einstündiger bei 4°C

(Gem C14...GemC14-beladene PLGA-NP, K C14... GemC14-beladene, Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP, Gem C10...GemC10-beladene PLGA-NP, K C10... GemC10-beladene, Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP, Blank...PLGA-NP, K Blank...Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP)

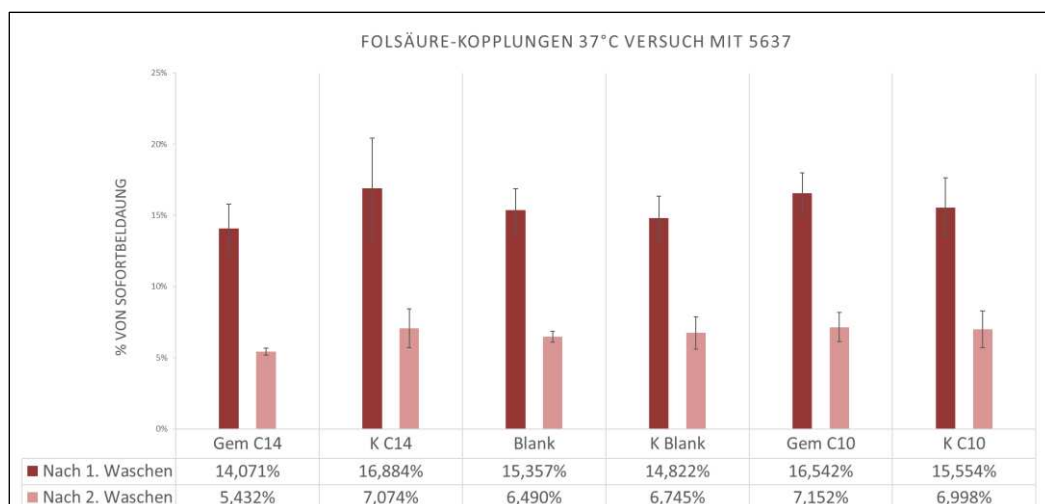


Abbildung 16: Bindungsrate von Folsäure-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an 5637-Monolayer nach einstündiger Inkubation bei 37°C

(Gem C14...GemC14-beladene PLGA-NP, K C14... GemC14-beladene, Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP, Gem C10...GemC10-beladene PLGA-NP, K C10... GemC10-beladene, Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP, Blank...PLGA-NP, K Blank...Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP)

In den Abbildungen 15 und 16 sind die Ergebnisse der Nanopartikel-Interaktionsversuche mit Zellen von 5637-Monolayern in Abhängigkeit von der Folsäure-Funktionalisierung bei 4°C und 37°C dargestellt. In diesen beiden Versuchen konnte erneut die erhöhte Bindungsrate bei höherer Temperatur beobachtet werden. Die Bindungsraten nach dem ersten Waschen betrugen im Schnitt 15,54% bei 37°C im Gegensatz zu 8,01% bei 4°C. Bei beiden Inkubations-Temperaturen waren etwas mehr funktionalisierte GemC14-PLGA-Nanopartikel als nicht funktionalisierten Nanopartikeln gebunden (16,88%/6,17% vs. 14,07%/5,59%). Die vorerst geringere Bindungsrate von funktionalisierten GemC10- und Blank-PLGA-Nanopartikeln resultierte im zweiten Waschschrift in einer erhöhten Bindungsstabilität im Vergleich zu den nicht funktionalisierten Varianten.

4.6.3. Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Bindungsstudien

Aus den Bindungsversuchen mit Einzelzellen kann keine eindeutige Tendenz hinsichtlich der Bindungsrate der funktionalisierten Nanopartikel abgeleitet werden. Dazu waren die Ergebnisse zu unterschiedlich bzw. teilweise sogar gegensätzlich.

Insgesamt bewirkte jedoch die Funktionalisierung mit Folsäure im Vergleich zu WGA eine erhöhte Zelladhäsion der Partikel, vor allem im Bindungsversuch an 5637-Einzelzellen. In diesen Bindungsstudien konnte eine deutlich erhöhte Bindungsrate der mit Folsäure funktionalisierten GemC14-PLGA-Nanopartikel sowohl bei 4°C als auch 37°C gezeigt werden. Auch die Charakteristik der GemC10-PLGA-Nanopartikel waren in diesen Versuchen den nicht funktionalisierten Nanopartikeln ebenbürtig. Daraus ergibt sich die Annahme, dass Folsäure als kleines Targeter-Molekül von der sterischen Abschirmung der funktionellen Carboxylgruppen durch PVA weniger stark betroffen ist als großes WGA. Der Grund dafür könnte darin liegen, dass Folsäure um ein Vielfaches weniger komplex aufgebaut ist und trotz PVA genügend Platz hat, um an die Carboxylgruppen heranzukommen und an diese zu binden. Wohingegen WGA eine deutlich ausgedehntere Struktur aufweist und dadurch sehr stark abgeschirmt wird bzw. der Zugang zu den Carboxylgruppen an der Partikeloberfläche durch die PVA-Moleküle nur mehr in geringerem Ausmaß möglich ist. Trotz dieser Problematik konnte man bisher auf die Verwendung von PVA aufgrund seiner Unentbehrlichkeit für die Partikelherstellung und den Wirkstoffeinbau wie im Punkt 4.3.1. beschrieben, nicht verzichten.

Die Zellbindungsstudien mit Monolayern ergaben, dass die Funktionalisierung der PLGA-Nanopartikel mit WGA zwar keine erhöhte Zellbindungsrate verursachte, allerdings die Beständigkeit der Bindung im Gegensatz zu jenen Partikeln ohne Targeter-Molekül erhöht

war. Alle funktionalisierten PLGA-Nanopartikel konnten die Zellbindung nach dem zweiten Waschschrift besser aufrecht erhalten als die nicht funktionalisierten Partikel.

Eine Erhöhung der Bindungsstabilität, wie sie für WGA-funktionalisierte Nanopartikel in Interaktions-Versuchen mit Zellmonolayern auftrat, konnte nach Funktionalisierung mit Folsäure nicht nachgewiesen werden. Es konnte im identen Versuchsaufbau auch keine Erhöhung der Bindungsrate gezeigt werden.

Im Laufe der Versuche fiel allerdings auf, dass es schon während der Funktionalisierung der Partikeloberfläche zu Unterschieden kam. Die Partikel wurden während der Funktionalisierung mit den Targeter-Molekülen des Öfteren und über einen längeren Zeitraum dialysiert. Diese Dialyse dürfte aber auch der Grund für die verminderte detektierbare Fluoreszenz der funktionalisierten Nanopartikel sein. Somit könnte der Fluoreszenzmarker BodiPy im Laufe der langen Dialyseschritte zum Teil aus den Partikeln ausgewaschen werden und dadurch wäre die resultierende Fluoreszenzintensität pro funktionalisiertem Nanopartikel geringer als die eines nicht funktionalisierten Nanopartikel. Wenn jedoch die Fluoreszenz eines modifizierten Nanopartikels schon von Beginn an geringer ist, resultieren auch bei gleicher Bindungsrate geringere RFI-Werte.

Daher sollten in weiteren Versuchen die nicht funktionalisierten Chargen vor Versuchsbeginn an die funktionalisierten Nanopartikel angeglichen werden. Dies wurde durch eine nachgeholte, dem Funktionalisierungsprotokoll entsprechenden Dialyse realisiert und in den nachstehenden optimierten Zellbindungsstudien an Zellmonolayern überprüft.

4.6.4. Ergebnisse der Zellbindungsstudien von Folsäure-funktionalisierten Nanopartikeln nach Änderung des Versuchsprotokolls – optimierte Zellbindungsversuche

Im Laufe der Arbeit wurde das Protokoll zur Untersuchung der Interaktion von Folsäure-modifizierten PLGA-Nanopartikeln mit Zellen aufgrund von schon zuvor beobachteten Mängeln wie in Punkt 4.6.3. beschrieben, modifiziert. Die Überarbeitung beinhaltete die Dialyse der nicht funktionalisierten Nanopartikel im gleichen Ausmaß wie im Funktionalisierungsprotokoll. Dadurch sollte schon vor dem eigentlichen Versuchsbeginn die Partikel-inhärente Fluoreszenz angeglichen und die Vergleichbarkeit der relativen Fluoreszenzintensitäten möglich sein.

4.6.4.1. Optimierte Bindungsversuche von Folsäure-funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an SV-HUC-1-Monolayer

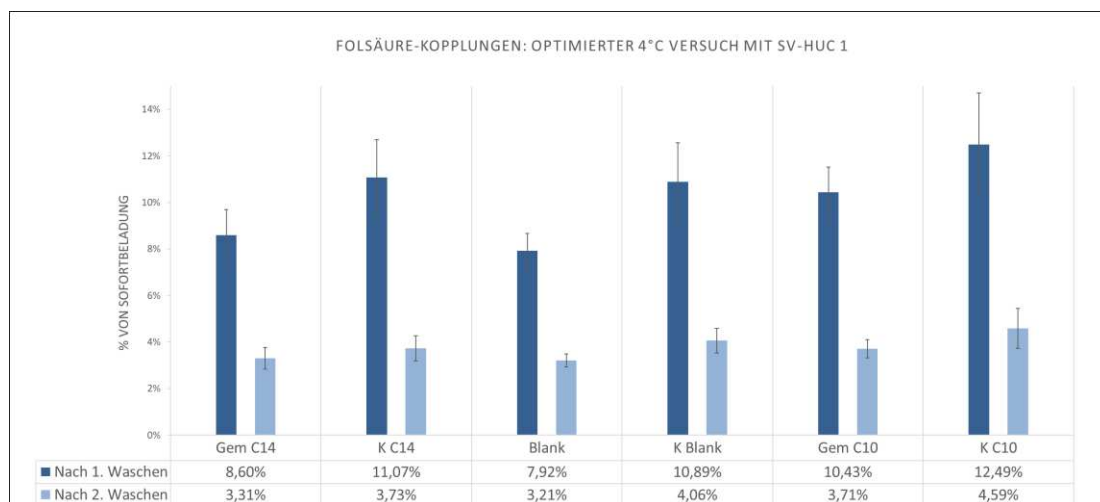


Abbildung 17: Bindungsrate von Folsäure-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an SV-HUC-1-Monolayer nach einstündiger Inkubation bei 4°C nach Änderung des Versuchsprotokolls

(Gem C14...GemC14-beladene PLGA-NP, K C14... GemC14-beladene, Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP, Gem C10...GemC10-beladene PLGA-NP, K C10... GemC10-beladene, Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP, Blank...PLGA-NP, K Blank...Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP)

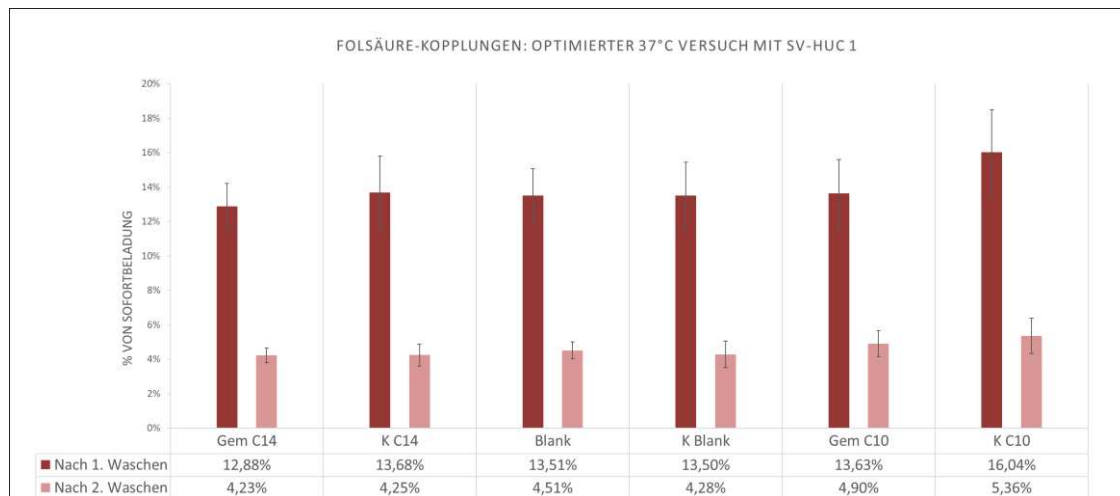


Abbildung 18: Bindungsrate von Folsäure-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an SV-HUC-1-Monolayer nach einstündiger Inkubation bei 37°C nach Änderung des Versuchsprotokolls

(Gem C14...GemC14-beladene PLGA-NP, K C14... GemC14-beladene, Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP, Gem C10...GemC10-beladene PLGA-NP, K C10... GemC10-beladene, Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP, Blank...PLGA-NP, K Blank...Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP)

In den Abbildungen 17 und 18 sind die Ergebnisse der Interaktion zwischen SV-HUC-1-Monolayern und den Nanopartikeln entsprechend dem optimierten Versuchsprotokoll zusammengefasst. Durch die Optimierung des Versuchsprotokolls konnte eine signifikante Veränderung der zellassozierten Fluoreszenzintensität nach einmaligem Waschen beobachtet werden. Wie in Abbildung 17 und 18 zu sehen ist, war die zellassozierte Fluoreszenzintensität und damit die Bindungsrate von allen funktionalisierten Nanopartikeln höher als jene der nicht funktionalisierten. Vor allem die funktionalisierten GemC10-PLGA-Nanopartikel zeigten in diesen Versuchen eine deutliche erhöhte Fluoreszenzintensität im Gegensatz zu den nicht funktionalisierten Nanopartikeln und im Vergleich zu vorigen Versuchen, wo keine erhöhte Bindungsrate beobachtet werden konnte. [Abbildung 13, 14, 15, 16]

4.6.4.2. Optimierte Bindungsversuche von Folsäure-funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an 5637-Monolayer

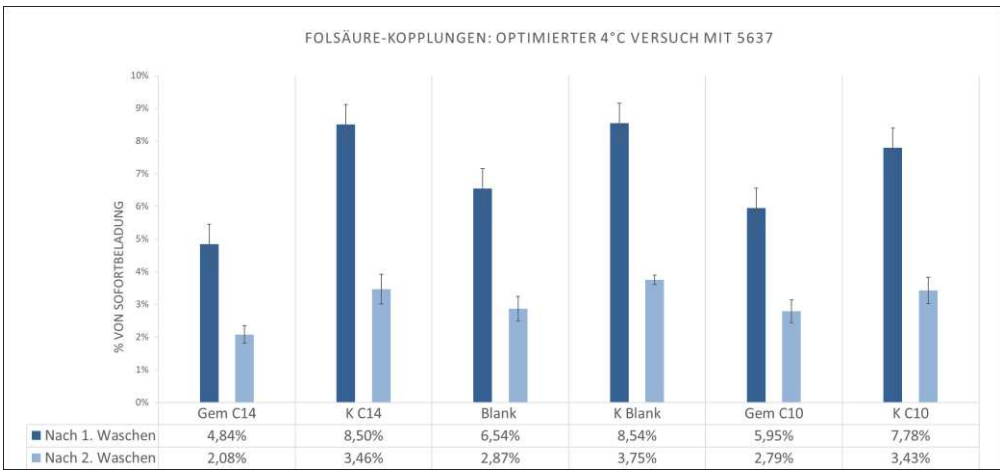


Abbildung 19: Bindungsrate von Folsäure-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an 5637-Monolayer nach einstündiger Inkubation bei 4°C nach Änderung des Versuchsprotokolls

(Gem C14...GemC14-beladene PLGA-NP, K C14... GemC14-beladene, Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP, Gem C10...GemC10-beladene PLGA-NP, K C10... GemC10-beladene, Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP, Blank...PLGA-NP, K Blank...Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP)

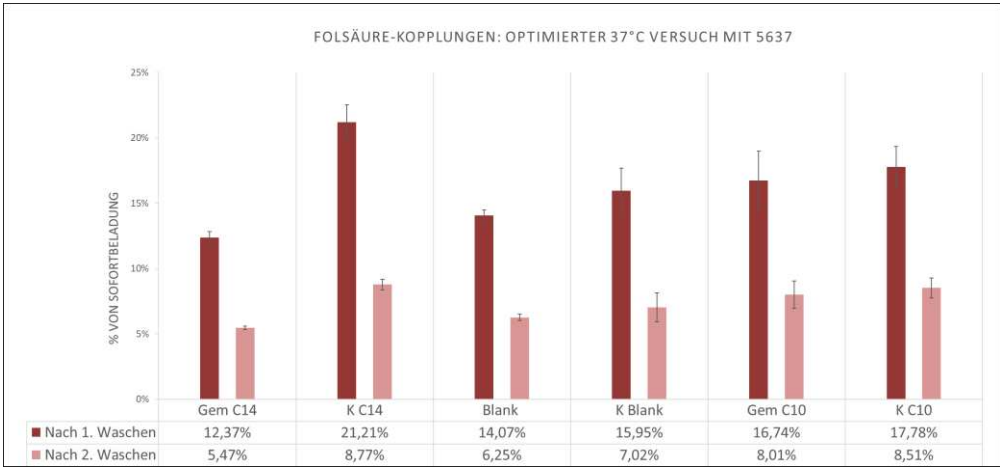


Abbildung 20: Bindungsrate von Folsäure-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an 5637-Monolayer nach einstündiger Inkubation bei 37°C nach Änderung des Versuchsprotokolls

(Gem C14...GemC14-beladene PLGA-NP, K C14... GemC14-beladene, Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP, Gem C10...GemC10-beladene PLGA-NP, K C10... GemC10-beladene, Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP, Blank...PLGA-NP, K Blank...Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP)

Auch in den Versuchen mit 5637-Zellen konnte durch Optimierung des Versuchsprotokolls eine höhere Nanopartikel-Bindungsrate durch Modifizierung der Partikeloberfläche mit Folsäure bestätigt werden. Alle Typen von funktionalisierten Nanopartikeln zeigten eine höhere Gewebsbindungsrate, wobei insbesondere die Funktionalisierung der GemC14-PLGA-Nanopartikel einen hohen Nutzen mit sich brachte. Die Fluoreszenz-Werte als Maß für die Bindungsrate dieser Partikel waren im Vergleich zu den nicht funktionalisierten Nanopartikeln nach dem ersten Waschen bei beiden Inkubationstemperaturen fast doppelt so hoch. Auch hier konnte erneut die allgemein erhöhte Bindungsrate bei 37°C im Vergleich zu 4°C verdeutlicht werden.

4.6.5. Zusammenfassung der optimierten Zellbindungsversuche

Durch die Änderung des Versuchsprotokolls erzielten die mit Folsäure modifizierten PLGA-Nanopartikel nach dem ersten Waschen eine deutlich höhere zellassoziierte Fluoreszenzintensität, was auf eine erhöhte Zellbindungsrate hinweist. In keinem dieser optimierten Versuche mit Folsäure-funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln konnte jedoch eine erhöhte Bindungsstabilität der funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln nachgewiesen werden, so wie es im Fall von WGA-funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln beobachtet werden konnte.

Damit vermittelt nach derzeitigem Stand des Wissens die Modifikation von Nanopartikeln mit Folsäure eine erhöhte Bindungsrate an artifizielles Blasengewebe. Diese Bindung ist allerdings gegenüber physikalischen Einflüssen wie der andauernden Harnproduktion und Miktion nicht unempfindlicher als die von Nanopartikeln ohne Targeter.

4.6.6. Ergebnisse der Toxizitätstests

In diesen Versuchen wurde die Zytotoxizität der unterschiedlichen GemCx-Konjugate sowie der verschiedenen Partikelchargen mit und ohne Funktionalisierung der Oberfläche untersucht. Dazu wurden Zellmonolayer der 5637- und SV-HUC-1-Zelllinie angelegt, mit den unterschiedlichen PLGA-Nanopartikel- und GemCx-Konjugat-Suspensionen inkubiert und aus der Bestimmung der Zellviabilität die Toxizität abgeschätzt. Da eine Versuchsreihe mit einer festgelegten GemCx-Konzentration (c) zu hohe, kaum auswertbare Toxizitätswerte ergab, wurde der Versuch erneut mit der halbierten Konzentration (c/2) durchgeführt.

4.6.6.1. Ergebnisse der Zellviabilitätstests von WGA-funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln

4.6.6.1.1. Viabilität von SV-HUC-1-Zellen nach Inkubation mit WGA-funktionalisierten und nicht funktionalisierten GemCx-PLGA-Nanopartikeln

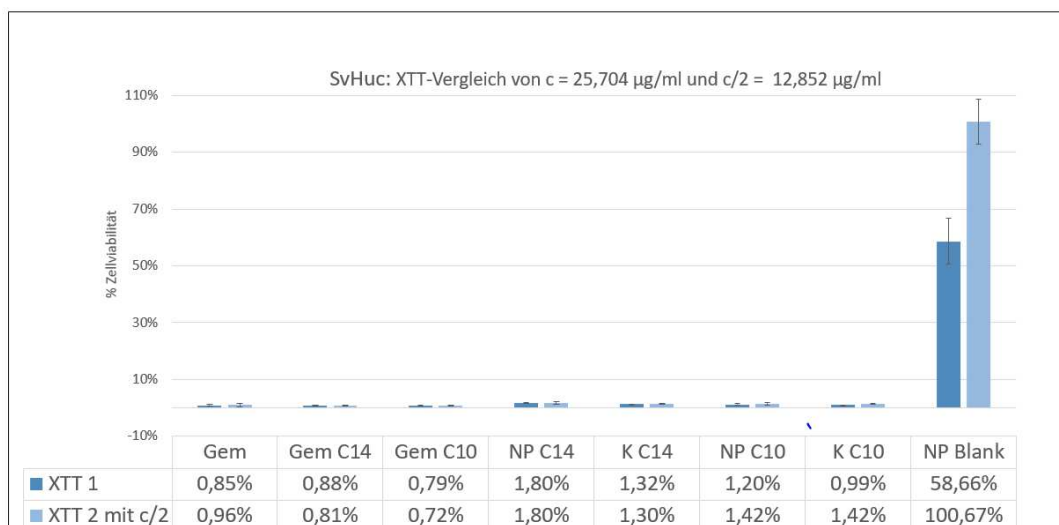


Abbildung 21: Viabilität von SV-HUC-1-Zellen nach Inkubation mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (c und c/2) von GemCx-Konjugaten und von WGA-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln

(Gem...Gemcitabin, C14...Myristyl-Gemcitabin, Gem C10... Caprinyll-Gemcitabin, NP C14...GemC14-beladene PLGA-NP, K C14... GemC14-beladene, WGA-funktionalisierte PLGA-NP, NP C10...GemC10-beladene PLGA-NP, K C10... GemC10-beladene, WGA-funktionalisierte PLGA-NP)

Der Versuch mit WGA funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an SV-HUC-1-Zellen zeigte, dass die Halbierung der Analyten-Konzentration keine Änderung der Toxizität bewirkte, was auf eine hohe Potenz der GemCx-Konjugate hinweist. Die Zellviabilität war trotz

unterschiedlichen Konzentrationen in beiden Versuchen annähernd gleich. Alle Nanopartikel-Chargen, sowohl funktionalisiert als auch nicht funktionalisiert, waren im Gegensatz zu den GemCx-Konjugaten und reinem Gemcitabin entsprechend den Zahlen weniger zytotoxisch wirksam; allerdings waren bei keiner Probe die Zellviabilität höher als 1,8% im Vergleich zu 0,96% bei reinem Gemcitabin. [Abbildung 21].

4.6.6.1.2. Viabilität von 5637-Zellen nach Inkubation mit WGA-funktionalisierten und nicht funktionalisierten GemCx-PLGA-Nanopartikeln

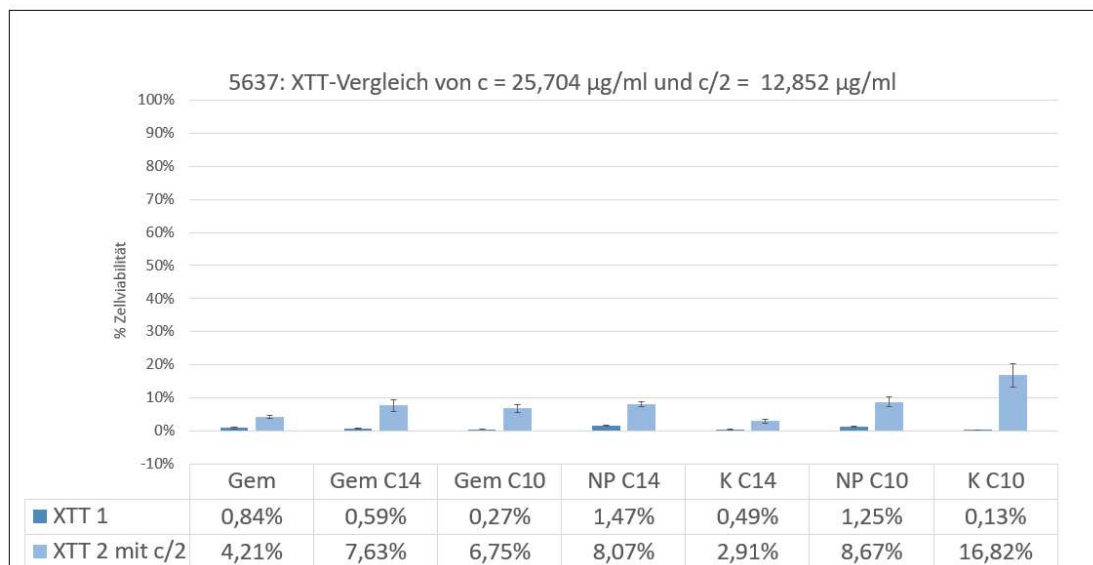


Abbildung 22: Viabilität von 5637-Zellen nach Inkubation mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (c und $c/2$) von GemCx-Konjugaten und von WGA-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln

(Gem...Gemcitabin, C14...Myristyl-Gemcitabin, Gem C10... Capriny-Gemcitabin, NP C14...GemC14-beladene PLGA-NP, K C14... GemC14-beladene, WGA-funktionalisierte PLGA-NP, NP C10...GemC10-beladene PLGA-NP, K C10... GemC10-beladene, WGA-funktionalisierte PLGA-NP)

Im Gegensatz zur Toxizitätsstudie mit SV-HUC-1-Zellen konnte an 5637-Zellen mit den unterschiedlichen Konzentrationen ein konzentrationsabhängiger Unterschied in der Zytotoxizität festgestellt werden. Interessanterweise bewirkten WGA-funktionalisierte Nanopartikel in der höheren Konzentration eine stärkere Reduktion der Zellviabilität als nicht funktionalisierte Nanopartikel.

Im zweiten Versuch mit halbiertter Konzentration der Proben waren die PLGA-Nanopartikel den GemCx-Konjugaten hinsichtlich Toxizität ebenbürtig. Insbesondere die GemC14-

PLGA-Nanopartikel senkten die Zellviabilität sehr stark und übertrafen die Toxizität des reinen Gemcitabins. [Abbildung 22]

4.6.6.2. Ergebnisse der Zellviabilitätstests von Folsäure-funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln

4.6.6.3. Viabilität von SV-HUC-1-Zellen nach Inkubation mit Folsäure-funktionalisierten und nicht funktionalisierten GemCx-PLGA-Nanopartikeln

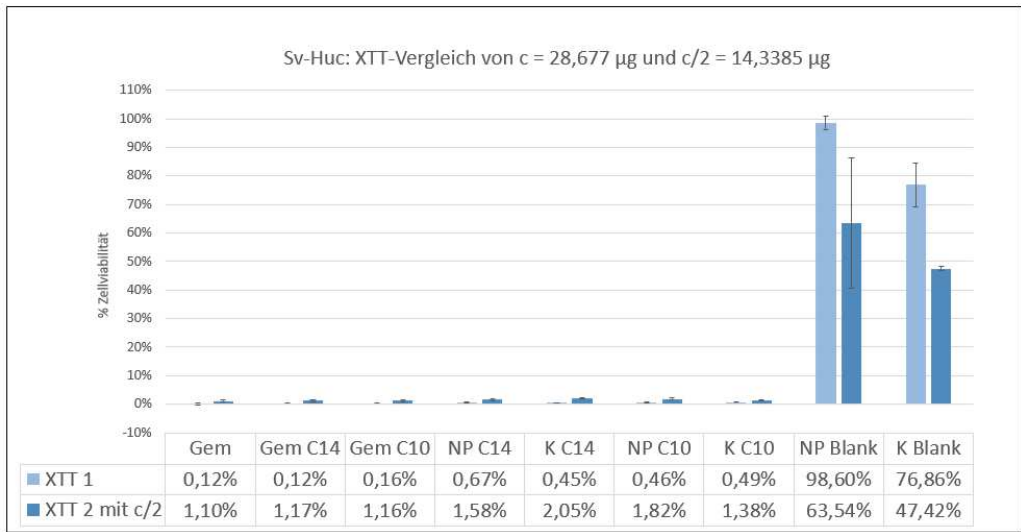


Abbildung 23: Viabilität von SV-HUC-1-Zellen nach Inkubation mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (c und $c/2$) von GemCx-Konjugaten und von Folsäure-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln

(Gem...Gemcitabin, Gem C14...Myristyl-Gemcitabin, Gem C10... Capriny-Gemcitabin, NP C14...GemC14-beladene PLGA-NP, K C14... GemC14-beladene, Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP, NP C10...GemC10-beladene PLGA-NP, K C10... GemC10-beladene, Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP, NP Blank...PLGA-NP, K Blank... Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP)

4.6.6.3.1. Viabilität von 5637-Zellen nach Inkubation mit Folsäure funktionalisierten und nicht funktionalisierten GemCx-PLGA-Nanopartikeln

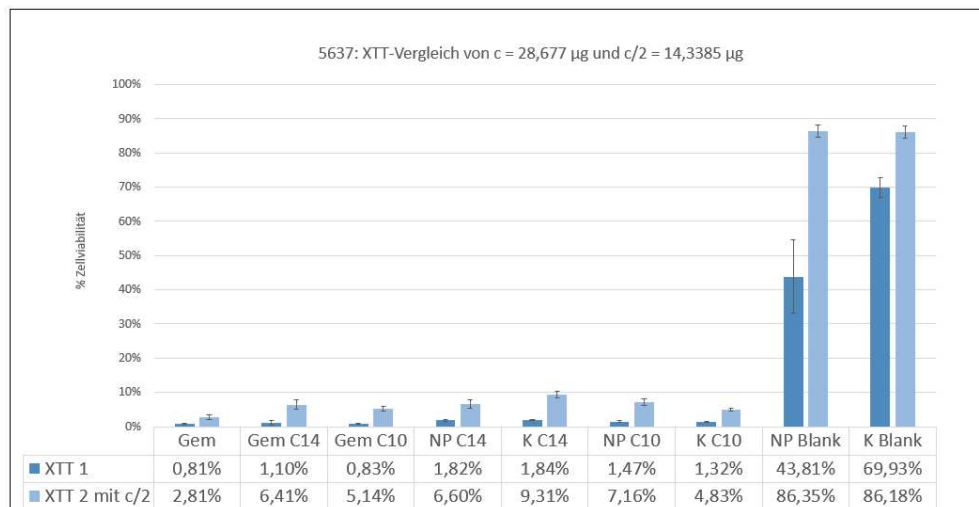


Abbildung 24: Viabilität- von 5637-Zellen nach Inkubation mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (c und $c/2$) von GemCx-Konjugaten und von Folsäure-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln

(Gem...Gemcitabin, Gem C14...Myristyl-Gemcitabin, Gem C10... Capriny-Gemcitabin, NP C14...GemC14-beladene PLGA-NP, K C14... GemC14-beladene, Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP, NP C10...GemC10-beladene PLGA-NP, K C10... GemC10-beladene, Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP, NP Blank...PLGA-NP, K Blank... Folsäure-funktionalisierte PLGA-NP)

Die beiden Versuche mit 5637-Monolayern ergaben generell eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität der mit Folsäure funktionalisierten PLGA-Nanopartikel sowie der Wirkstoffe und Wirkstoffkonjugate. Außerdem wird auch in diesen Versuchen bestätigt, dass die Funktionalisierung mit einem Targeter-Molekül die Zytotoxizität des Nanopartikels nicht einschränkt. Wie auch in den Versuchen zuvor waren die Unterschiede in den Analyt-Konzentrationen und damit in den Toxizitäten zu gering, um fundierte Aussagen über eine Priorisierung eines bestimmten GemCx-Konjugats treffen zu können. [Abbildung 24]

Der Versuch an den SV-HUC-1-Zellen bewies erneut die höhere Empfindlichkeit dieser Zelllinie auf zytotoxisch wirksame Substanzen. So sank im ersten Versuch mit der höheren Proben-Konzentration (c) die Zellviabilität auf $< 1\%$ im Vergleich zur Negativkontrolle, sodass kein Unterschied in der Toxizität zwischen Nanopartikeln und Gemcitabin-Derivaten messbar war. Im zweiten Versuch mit der halbierten Konzentration ($c/2$) lagen die Messwerte zwischen $1,10\%$ und $2,05\%$, wobei die funktionalisierten GemC10-PLGA-Nanopartikel toxischer waren als die entsprechenden nicht funktionalisierten Nanopartikel.

4.6.7. Zusammenfassung der Toxizitätstests

In allen Toxizitätsstudien konnte gezeigt werden, dass die SV-HUC-1-Zelllinie als gesunde Blasenzelllinie generell empfindlicher gegenüber zytostatisch wirksamen Nanopartikeln reagiert als die Tumorzelllinie 5637. [Abbildung 21 und 23]

Insgesamt konnte durch die Zellviabilitätstests eine meist vergleichbare Toxizität der funktionalisierten und nicht funktionalisierten GemCx-PLGA-Nanopartikel nachgewiesen werden. Für fundierte Aussagen sind jedoch weitere Toxizitätsstudien mit niedrigeren Konzentrationen der Analyten notwendig, um klare Unterschiede zwischen den funktionalisierten und nicht funktionalisierten Nanopartikeln sowie den unterschiedlichen GemCx-Konjugaten herausarbeiten zu können. Damit könnte auch der Nutzen des gezielten Targetings gezeigt werden, da die begründete Annahme besteht, dass durch die Targeter-Moleküle die Aufnahme in die Zellen erhöht und dadurch die Wirkung des Zytostatikums verstärkt wird.

Eindeutig konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Herstellung und Funktionalisierung der Nanopartikel an sich keinen großen Einfluss auf die Viabilität der Zellen ausübten. Die Blank-Werte zeigten immer eine deutlich geringere Schädigung der Zellen als alle anderen untersuchten Partikelsuspensionen. Daher beruht die Toxizität auf dem GemCx-Einbau und nicht auf etwaige Reaktionsprodukten, welche nicht ausreichend nach Herstellung oder Funktionalisierung abgetrennt werden konnten.

5. Zusammenfassung

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurde versucht die Oberfläche von Gemcitabin-Fettsäure-Konjugat-haltigen PLGA-Nanopartikeln mit Targeting Molekülen zu funktionalisieren. Für die Oberflächenmodifikation der PLGA-Nanopartikel wurden zwei verschiedene Targeter-Moleküle ausgewählt, um ein verbessertes Tumor Targeting zu erreichen: – Weizenkeimagglutinin (WGA) und Folsäure. Die Targeter wurden über Spacer-Moleküle, die den Targeter antennenartig exponieren sollen, kovalent an die Partikeloberfläche gebunden. Als Wirkstoffe wurden Gemcitabin-Fettsäure-Konjugate mit unterschiedlicher Lipophilie in die PLGA-Nanopartikel eingebaut. Der Wirkstoffgehalt der Nanopartikel lag bei etwa 9% bei Einsatz von Capriny- bzw. Myristyl-Gemcitabin und der Wirkstoffeinbau war stabil genug, um die Funktionalisierung ohne hohe Wirkstoff-Verluste zu ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Nanopartikelsuspensionen mit einem mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 190 nm und einer sehr engen Partikelgrößenverteilung hergestellt werden.

In Zellbindungsstudien wurde die Bindungsrate und Bindungsstärke der funktionalisierten PLGA-Nanopartikel anhand von Einzelzell- und Zellmonolayer-Versuchen untersucht.

Die Effekte des gezielten Targetings konnten anhand der Durchflusszytometrie von Einzelzellen nicht eindeutig bestätigt werden. Derzeit besteht die Hypothese, dass die Effizienz der Funktionalisierung durch den für die Herstellung notwendigen Stabilisator stark beeinträchtigt wird. Der Stabilisator schirmt die Carboxylgruppen an der Nanopartikeloberfläche räumlich ab, sodass deren Aktivierung und der Zugang des Targeters beträchtlich eingeschränkt wird. Mit steigender Molekülgröße nimmt dieser Effekt zu, was auch in dieser Arbeit anhand der niedermolekularen Folsäure und des hochmolekularen Weizenkeimlektin gezeigt wurde.

Erst durch viele aufwändige Versuche hat sich gezeigt, dass die quantitativ gleiche Fluoreszenzmarkierung der Nanopartikel Voraussetzung für verlässliche und reproduzierbare Zellinteraktionsstudien ist. In den optimierten Zellbindungsversuchen an Zellmonolayern konnte daraufhin eine verbesserte Bindungsaffinität für PLGA-Nanopartikel mit Folsäure als Targeter-Molekül nachgewiesen werden.

Die Zytotoxizität der Nanopartikel und Gemcitabin-Derivate sowie der Einfluss der Funktionalisierung wurde in Zellviabilitätstests an gesundem, artifiziellem Blasenepithel und artifiziellem humanem Tumorgewebe untersucht. Erste Ergebnisse zeigten, dass die PLGA-Nanopartikel sowohl funktionalisiert als auch nicht funktionalisiert und auch die

beiden Gemcitabin-Fettsäure-Konjugate dem reinen Gemcitabin in ihrer Zytotoxizität ebenbürtig sind. Für eine solide Aussage sind allerdings noch weitere Versuche mit wesentlich geringeren Probenmengen notwendig.

Insgesamt konnten im Rahmen dieser Arbeit durch erfolgreiche Optimierungsschritte sowie Zellinteraktions- und Zellviabilitätsstudien weitere Erkenntnisse gewonnen werden, die wesentliche Puzzle-Teile zur Umsetzung der Strategie einer zielgerichteten, bioadhäsiven Arzneiform zur Behandlung von Blasenkrebs in die Praxis darstellen.

6. Anhang

6.1. Abstract

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurde versucht, die Oberfläche von Gemcitabin-Fettsäure-Konjugat haltigen PLGA-Nanopartikeln mit Target-Molekülen zu funktionalisieren. Für die Oberflächenmodifikation der PLGA-Nanopartikel wurden zwei verschiedene Targeter-Moleküle ausgewählt, um ein verbessertes Tumor Targeting zu erreichen – Wheat Germ Agglutinin und Folsäure. Die Funktionalisierung der PLGA-Nanopartikel wurde durch kovalente Bindung der Targeter-Moleküle erreicht, wobei Spacer-Moleküle als Abstandhalter verwendet wurden, um die Bindung an die Partikeloberfläche zu erleichtern. Als Wirkstoff wurden Gemcitabin-Fettsäure-Konjugate in die PLGA-Nanopartikel eingebaut. Die Gemcitabin-Konjugate mit Caprinsäure und Myristinsäure zeigten hinsichtlich der Verkapselungseffizienz in die PLGA-Partikelmatrix und Stabilität vielversprechende Ergebnisse.

In Zellbindungsstudien wurden die Bindungsaffinität und -stärke der funktionalisierten PLGA-Nanopartikel anhand von Einzelzell- und Zellmonolayer-Versuchen evaluiert. Zusätzlich wurde anhand von Zellviabilitätstests die Zytotoxizität der PLGA-Nanopartikel als auch der Gemcitabin-Fettsäure-Konjugate untersucht.

In this thesis, an attempt was made to functionalize the surface of gemcitabine-fatty acid conjugate loaded PLGA nanoparticles with targeting molecules. For tumor targeted delivery of the PLGA nanoparticles two different targeters were selected – wheat germ agglutinin and folic acid for tumor targeted drug delivery. The PLGA nanoparticles were functionalized by covalently binding the targeter molecules to the particle surface, using spacer molecules in between the PLGA nanoparticles and the targeter molecules. As an active pharmaceutical ingredient gemcitabine-fatty acid conjugates were incorporated into the nanoparticles. The gemcitabine conjugates with capric acid and myristic acid revealed desirable results in terms of stability and encapsulation efficiency into the PLGA particle matrix.

In subsequent cell binding studies, the superiority of the functionalized PLGA nanoparticles in terms of binding affinity and binding strength was examined using single-cell and cell monolayer experiments. In addition, the cytotoxicity of the PLGA nanoparticles and the gemcitabine-fatty acid conjugates was examined by use of cell viability assays.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Größenverteilung und PDI der Partikelsuspensionen nach jedem Zentrifugationsschritt.....	22
Abbildung 2: EE und LC der hergestellten GemCx-PLGA-Nanopartikel.....	24
Abbildung 3: Stabilität der unterschiedlichen GemCx-Konjugate in Kunsturin pH 7.....	25
Abbildung 4: Freisetzungsprofil der GemCx-Konjugate aus PLGA-Nanopartikeln (Pellet als Probenmaterial)	26
Abbildung 5: Bindung von WGA-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an SV-HUC-1-Einzelzellen nach Inkubation bei 4°C und 37°C.....	28
Abbildung 6: Bindungsaffinität von WGA-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an 5637-Einzelzellen nach Inkubation bei 4°C und 37°C	29
Abbildung 7: Bindungsrate von WGA-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an SV-HUC-1-Monolayer nach einstündiger Inkubation bei 4°C.....	30
Abbildung 8: Bindungsrate von WGA-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an SV-HUC-1-Monolayer nach einstündiger Inkubation bei 37°C.....	31
Abbildung 9: Bindungsrate von WGA-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an 5637-Monolayer nach einstündiger Inkubation bei 4°C.....	32
Abbildung 10: Bindungsrate von WGA-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an 5637-Monolayer nach einstündiger Inkubation bei 37°C.....	32
Abbildung 11: Bindungsrate von Folsäure-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an SV-HUC-1-Einzelzellen nach Inkubation bei 4°C und 37°C	34
Abbildung 12: Bindungsrate von Folsäure-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an 5637-Einzelzellen nach Inkubation bei 4°C und 37°C	35
Abbildung 13: Bindungsrate von Folsäure-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an SV-HUC-1-Monolayer nach einstündiger Inkubation bei 4°C	36
Abbildung 14: Bindungsrate von Folsäure-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an SV-HUC-1-Monolayer nach einstündiger Inkubation bei 37°C ...	37
Abbildung 15: Bindungsrate von Folsäure-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an 5637-Monolayer nach Inkubation einstündiger bei 4°C.....	38
Abbildung 16: Bindungsrate von Folsäure-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an 5637-Monolayer nach einstündiger Inkubation bei 37°C	38

Abbildung 17: Bindungsrate von Folsäure-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an SV-HUC-1-Monolayer nach einstündiger Inkubation bei 4°C nach Änderung des Versuchsprotokolls	41
Abbildung 18: Bindungsrate von Folsäure-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an SV-HUC-1-Monolayer nach einstündiger Inkubation bei 37°C nach Änderung des Versuchsprotokolls	42
Abbildung 19: Bindungsrate von Folsäure-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an 5637-Monolayer nach einstündiger Inkubation bei 4°C nach Änderung des Versuchsprotokolls	43
Abbildung 20: Bindungsrate von Folsäure-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln an 5637-Monolayer nach einstündiger Inkubation bei 37°C nach Änderung des Versuchsprotokolls	43
Abbildung 21: Viabilität von SV-HUC-1-Zellen nach Inkubation mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (c und c/2) von GemCx-Konjugaten und von WGA-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln.....	45
Abbildung 22: Viabilität von 5637-Zellen nach Inkubation mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (c und c/2) von GemCx-Konjugaten und von WGA-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln.....	46
Abbildung 23: Viabilität von SV-HUC-1-Zellen nach Inkubation mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (c und c/2) von GemCx-Konjugaten und von Folsäure-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln.....	47
Abbildung 24: Viabilität- von 5637-Zellen nach Inkubation mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (c und c/2) von GemCx-Konjugaten und von Folsäure-funktionalisierten und nicht funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln.....	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zentrifugationsschritte zur Aufreinigung der PLGA-Nanopartikel.....	13
Tabelle 2: Durchschnittliche Partikelgröße und PDI der Nanopartikelpools.....	23
Tabelle 3: Durchschnittliche EE und LC der GemCx-PLGA-Nanopartikel	23

Literaturverzeichnis

- ¹ **Ohyama C.**; Glycosylation in bladder cancer; International journal of clinical oncology, 2008, Vol.13 (4), p.308-313
- ² **Ajmad MT.; Chidharla A.; Kasi A.**; Cancer Chemotherapy; StatPearls [Internet], 2021; [ONLINE - abgerufen am 03.02.2022 um 12:14]; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33232037/>
- ³ **Kifle ZD.; Tadele M.; Alemu E.; Gedamu T.; Ayele AG.**; A recent development of new therapeutic agents and novel drug targets for cancer treatment; SAGE Open Medicine, 2021, Vol.9, p.20503121211067083-20503121211067083
- ⁴ **Mehrmohamadi M.; Jeong, SH.; Locasale JW.**; Molecular features that predict the response to antimetabolite chemotherapies; Cancer & metabolism, 2017, Vol.5 (1), p.8-8
- ⁵ **Chabner BA.; Roberts TG.**; Timeline - Chemotherapy and the war on cancer; Nature reviews. Cancer, 2005, Vol.5 (1), p.65-72
- ⁶ **Tew WP.; Kelsen DP.; Ilson DH.**; Targeted Therapies for Esophageal Cancer; The oncologist, 2005, Vol.10 (8), p.590-601
- ⁷ **Fox E.; Curt GA.; Balis FM.; Durham NC.**; Clinical Trial Design for Target-Based Therapy; The oncologist, 2002, Vol.7 (5), p.401-409
- ⁸ **Federico C.; Morittu VM.; Britti D.; Trapasso E.; Cosco D.**; Gemcitabine-loaded liposomes; rationale, potentialities and future perspectives International journal of nanomedicine, 2012, Vol.2012, p.5423-5436
- ⁹ **Bergman AM.; Adema AD.; Balzarini J.; Bruheim S.; Fichtner I.; Noordhuis P.; Fodstad O.; Myhren F.; Sandvold ML.; Heniks HR.; Peters GJ.**; Antiproliferative activity, mechanism of action and oral antitumor activity of CP-4126, a fatty acid derivative of gemcitabine, in in vitro and in vivo tumor models; Investigational new drugs, 2011, Vol.29 (3), p.456-466
- ¹⁰ **Zraik IM.; Heß-Busch Y.**; Management von Nebenwirkungen der Chemotherapie und deren Langzeitfolgen; Urologe, 2021, Vol.60 (7), p.862-871
- ¹¹ **Immordino ML.; Brusa P.; Rocco F.; Arpicco S.; Ceruti M.; Cattel L.**; Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing lipophilic gemcitabine prodrugs; Journal of controlled release, 2004, Vol.100 (3), p.331-346
- ¹² **Apfelthaler C.; Anzengruber M.; Gabor F.; Wirth M.**; Poly – (I) – glutamic acid drug delivery system for the intravesical therapy of bladder cancer using WGA as targeting

moiety; European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, 2017, Vol.115, p.131-139

¹³ **Andreev B.; Egorov V.;** Handbook of Drug Targeting and Monitoring: Developments, Challenges and Applications; Nova Science Publishers, Incorporated; 2010, p.1-1

¹⁴ **Li R.; Zheng K.; Yuan C.; Chen Z.; Huang M.;** Be active or not: The relative contribution of active and passive tumor targeting of nanomaterials; Nanotheranostics, 2017, Vol.1 (4), p.346-357

¹⁵ **Makadia HK.; Siegel SJ.;** Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier; Polymers, 2011, Vol.3 (3), p.1377-1397

¹⁶ **Ding D.; Zhu Q.;** Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the delivery of biomacromolecular therapeutics; Materials Science & Engineering C, 2018, Vol.92, p.1041-1060

¹⁷ **Ulbrich K.; Michaelis M.; Rothweiler F.; Knobloch T.; Sithisarn P.; Cinatl J.; Kreuter J.;** Interaction of folate-conjugated human serum albumin (HSA) nanoparticles with tumour cells; International journal of pharmaceutics, 2011, Vol.406 (1), p.128-134

¹⁸ **Aapro M.; Bohlius J.; Cameron DA. et al.;** 2010 update of EORTC guidelines for the use of granulocyte-colony stimulating factor to reduce the incidence of chemotherapy-induced febrile neutropenia in adult patients with lymphoproliferative disorders and solid tumours; European Journal of Cancer, 2011, Vol. 47(1), p.8–32

¹⁹ **Morales-Cruz M.; Delgado Y.; Castillo B. et al.;** Smart targeting to improve cancer therapeutics; Drug Design, Development and Therapy, 2019, Vol. 13, p.3753–3772

²⁰ **Yau T.; Dan X.; Ng CCW. et al.;** Lectins with potential for anticancer therapy; Molecules, 2015, Vol. 20(3), p.3791–3810

²¹ **Boligan KF.; Mesa C.; Fernandez LE.; Von Gunten S.;** Cancer intelligence acquired (CIA): tumor glycosylation and sialylation codes dismantling antitumor defense; Cellular and molecular life sciences, 2014, Vol.72 (7), p.1231-1248

²² **Shen Y.; Chen J.; Liu Q.; Feng C.; Gao X.; Wang L.; Zhang Q.; Jiang X.;** Effect of wheat germ agglutinin density on cellular uptake and toxicity of wheat germ agglutinin conjugated PEG-PLA nanoparticles in Calu-3 cells; International Journal of pharmaceutics, 2011, Vol.413 (1), p.184-193

²³ **Lammers T.; Kiessling F.; Hennink WE.;** Storm G.; Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress; Journal of controlled release, 2012, Vol.161 (2), p.175-187

- ²⁴ **Hilgenbrink AR.; Low PS.;** Folate Receptor-Mediated Drug Targeting: From Therapeutics to Diagnostics; Journal of pharmaceutical sciences, 2005, Vol.94 (10), p.2135-2146
- ²⁵ **Ford Versypt AN.; Pack DW.; Braatz RD.;** Mathematical modeling of drug delivery from autocatalytically degradable PLGA microspheres — A review; Journal of controlled release, 2013, Vol.165 (1), p.29-37
- ²⁶ **Wang L.; Wang Y.; Wang X.; Sun L.; Zhou Z.; Lu J.; Zheng Y.;** Encapsulation of low lipophilic and slightly water-soluble dihydroartemisinin in PLGA nanoparticles with phospholipid to enhance encapsulation efficiency and in-vitro bioactivity; Journal of Microencapsulation, 2016, Vol. 33 (1), p.43-52
- ²⁷ **Barichello JM.; Morishita M.; Takayama K.; Nagai T.;** Encapsulation of Hydrophilic and Lipophilic Drugs in PLGA Nanoparticles by the Nanoprecipitation Method; Drug Development and Industrial Pharmacy, 1999, Vol. 25 (4), p.471-476
- ²⁸ **Burgués Gasió JP.; Jiménez Cruz JF.;** Improving Efficacy of Intravesical Chemotherapy; European urology, 2006, Vol.50 (2), p.225-234
- ²⁹ **Neutsch L.; Wambacher M.; Wirth EM.; Spijker S.; Kählig H.; Wirth M.; Gabor F.;** UPEC biomimicry at the urothelial barrier: lectin-functionalized PLGA microparticles for improved intravesical chemotherapy; International Journal of Pharmaceutics, 2013, Vol.450 (1-2), p.163-176