



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Biorekognitive Nanopartikel als neue Delivery-Strategie  
in der intravesikalen Therapie“

Verfasserin

**Sandra Mesaric**

angestrebter akademischer Grad

**Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)**

Wien, im August 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreuer:

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



## Danksagungen

„Herzlichen Dank“

### **UNIV.-PROF. MAG. DR. MICHAEL WIRTH**

... für die Ermöglichung meiner Diplomarbeit am Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, für das faszinierende Thema, die Hilfestellung bei vielen Fragen und das immer offene Ohr.

„Herzlichen Dank“

### **UNIV.-PROF. MAG. DR. FRANZ GABOR**

... für die Fürsorge und Unterstützung während meiner Diplomarbeit.

„Herzlichen Dank“

### **MAG. LUKAS NEUTSCH**

... für die tolle Betreuung während der gesamten Diplomarbeit und für das geduldige Beantworten aller Fragen.

„Herzlichen Dank“

### **AN DIE GESAMTE ARBEITSGRUPPE**

... für die freundlich Aufnahme, das wunderbare und sehr angenehme Arbeitsklima und die Freude die ich dadurch an der Arbeit hatte

„Herzlichen Dank“

### **MEINER MUTTER SVJETLANA**

... für die Unterstützung, die Geduld und das Verständnis.

„Herzlichen Dank“

### **MEINER FAMILIE UND MEINEN FREUNDEN**

... dafür; dass ihr immer da wart wenn ich euch gebraucht habe.

„Herzlichen Dank“

### **THOMAS**

... für alles.



*„In jede Arbeit ist etwas  
Unbezahlbares eingeschlossen, das  
eine Befriedigung spendet, die in  
sich selber ruht.“*

*Ernst Jünger (1895-1998)*



# INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG.....	9
ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	16
LITERATURVERZEICHNIS.....	23
ANHANG A.....	27
Publikation.....	27
ANHANG B.....	55
Ergänzungen zur Publikation.....	55
ANHANG C.....	56
Partikelherstellung – Vorversuche.....	56
ANHANG D.....	59
Partikel/Zell-Interaktionen bei HT 1376.....	59
ANHANG E.....	65
Weitere Untersuchungen.....	65
ZUSAMMENFASSUNG.....	73
LEBENS LAUF.....	75



# **EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG**

## 1. Die Harnblase - Physiologie

Die Harnblase (Vesica urinaria) liegt direkt hinter dem Schambein, im kleinen Becken. Es handelt sich dabei um ein muskuläres Hohlorgan, dessen Innenwand mit Uroepithel ausgekleidet ist, welches bei geleertem Zustand Falten bildet. Unter dem Epithel befinden sich eine Basallamina und drei Schichten glatter Muskeln [1].

Die Harnblase speichert den von der Niere ausgeschiedenen Urin. Die Blase eines Erwachsenen hat ein maximales Füllvolumen von 0,6-1,0 l; allerdings steigt der Druck in der Blase schon bei geringeren Füllvolumina etwas an, sodass bereits ab einer Ansammlung von 150-300 ml Urin in der Blase ein Gefühl der Füllung vorhanden ist. Bei weiterer Zunahme des Blasenvolumens verändert sich der Druck dann nur noch sehr wenig; es wird also ein konstanter Blasentonus aufrechterhalten. Diese Adaption ist vor allem den viskös-elastischen Eigenschaften der Blasenmuskulatur zu verdanken. Nimmt das Füllvolumen weiter zu, kommt es zur Blasenentleerung, wobei die Blase willentlich natürlich auch bereits vorher entleert werden kann [2].

Das Uroepithel, also die Innenwand der Blase, besteht aus drei Zellschichten mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad und wird deshalb oft auch als Übergangsepithel bezeichnet. Zum Lumen hin befindet sich eine Schicht mit voll ausdifferenzierten „Umbrella“-Zellen, gefolgt von mehreren Schichten Intermediär- und Basalzellen. Die Größe der „Umbrella“-Zellen ist abhängig vom Füllungszustand der Blase. Die Intermediärzellen hingegen werden bei zunehmender Füllung gegeneinander verschoben, um so die Vergrößerung der Blase zu ermöglichen. Die innerste Zellschicht weist in Richtung Blasenlumen eine Plaque-besetzte Oberfläche auf, welche durch sogenannte Uroplakine, einen membranständigen Proteintyp, gebildet wird. Uroplakine bedecken 90% der luminalen Oberfläche der Blase und haben viele verschiedene Funktionen, unter denen die Bildung einer dichten, zugleich aber auch dehnbaren Barriere zwischen dem Milieu der Blase und der zellulären Umgebung vielleicht die wichtigste ist [3].

Dank dieses speziellen Feinbaus ist das Uroepithel die dichteste und am schwierigsten zu penetrierende Gewebearriere im menschlichen Körper, wodurch die lokale Administration von Wirkstoffen erschwert wird [3]. Somit ist auch die

Wirksamkeit, zum Beispiel von Chemotherapeutika, welche direkt am Uroepithel zur Anwendung kommen sollen, stark eingeschränkt.

## 2. Pathologie des Urotheltraktes

### 2.1.Maligne Tumore der Harnblase- Inzidenz und Risikofaktoren

Der häufigste Tumor des Harntraktes ist das Blasenkarzinom; 90-95% davon sind Uroepithelkarzinome. Insgesamt machen Blasentumore 6,6% aller Tumorerkrankungen bei Männern und 2,1% aller Tumorerkrankungen bei Frauen aus [4]. Meistens tritt der Tumor zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr auf, Männer erkranken durchschnittlich 3,8-mal öfter als Frauen [4; 5]. Für Männer liegt die relative Fünfjahresüberlebensrate bei 78% und für Frauen bei 72%.

Als Risikofaktoren gelten aktives und passives Rauchen, Exposition mit chemischen Substanzen (besonders aromatische Amine, Benzen-Derivate, Aniline, Arsen), manche Wirkstoffe wie Cyclophosphamid oder Phenacetin, aber auch, Strahlentherapie im kleinen Becken, chronische Entzündungen des Harntraktes oder Bilharziose [4; 5]. Die Wahrscheinlichkeit der Tumorentstehung steigt bei 40 „Packerljahren“ Tabakkonsum auf das Vierfache und sinkt bei ehemaligen Rauchern langsamer auf das Niveau von Nichtrauchern als z.B. die Lungenkrebswahrscheinlichkeit [6].

### 2.2.Harnwegsinfektionen

Trotz der methodischen Vielfalt, die die Blase aufweist, um Infektionen zu verhindern- z.B. der reinigende Harnfluss oder antimikrobielle Moleküle- ist der Harnwegsinfekt eine der häufigsten infektiösen Erkrankungen, wobei vor allem Frauen betroffen sind. Man vermutet, dass dies auf die Anatomie des weiblichen Urogenital-Traktes zurückzuführen ist, da bei Frauen die Harnröhre kürzer ist als bei Männern und der After näher am Harnkanal liegt. 50% aller Frauen haben mindestens einen Harnwegsinfekt im Laufe ihres Lebens, rund die Hälfte von ihnen leidet an einer rezidivierenden Infektion. Generell können verschiedenste Bakterien zu einer Harnwegsinfektion führen, in bis zu 95% der Fälle werden sie jedoch durch uropathogene E. coli (UPEC) ausgelöst, die das Uroepithel infiltrieren können [7].

### 3. Therapie

Durch die großen Unterschiede zwischen den an Blasenkarzinomen erkrankten Patienten ist eine individuelle Behandlung unumgänglich. Einerseits spielen das Alter und der allgemeine Gesundheitszustand des Patienten eine Rolle, andererseits divergieren die Karzinome in Tumorstadium, Malignitätsgrad und Rezidivrate. Aber auch das Vorhandensein von Metastasen oder die Infiltration von Lymphknoten machen ein spezifisches Therapieschema notwendig.

In der Praxis werden verschiedenste Therapiearten angewendet und zum Teil auch miteinander kombiniert. Am Anfang der Therapie steht, sofern möglich, eine chirurgische Entfernung des malignen Gewebes, wenn nötig folgen Chemo-, Immunotherapie und/oder Bestrahlung [4].

Grundlegend wird bei der Therapie zwischen zwei Tumortypen unterschieden: das nicht-muskelinvasive Blasenkarzinom und das muskelinvasive Blasenkarzinom. Ersteres ist auf das Uroepithel beschränkt, während zweiteres auch die unter dem Uroepithel befindliche Muskelschicht infiltriert hat [4].

#### 3.1. Nicht-muskelinvasive Blasenkarzinome

Etwa 70% der erstmals diagnostizierten Blasenkarzinome fallen, zum Zeitpunkt der Diagnose, in diese Kategorie. Mikro- und Makrohämaturie werden als Hauptsymptome genannt, seltener kommt es zu chronisch-zystischen Beschwerden [4]. Nicht-muskelinvasive Blasenkarzinome können in drei Gruppen eingeteilt werden: niederes, intermediäres und hohes Risiko. Die Fünfjahresrezidivrate beträgt bei niedrigem Risiko 31%, bei mittleren 62 % und bei hohen 78 % [5].

Die Therapie umfasst zunächst meist die transurethrale Entfernung des Tumors. Je nach Risikostufe des Tumors erfolgt anschließend mindestens eine einmalige topische Anwendung von Chemotherapeutika (z.B.: Mitomycin C, Doxorubicin). Diese sogenannte Instillationstherapie kann auch in Form einer Immuntherapie (beispielsweise mit Bacillus Calmette-Guerin (BCG)) durchgeführt werden, was sich im Verhindern eines Rezidivs und dem Aufschieben der Progression sogar als effektiver erwiesen hat. Diese ist aber leider mit einer gewissen lokalen Toxizität gepaart und führt häufig zu unerwünschten Nebenwirkungen bis hin zum Therapieabbruch [8; 9]. Gute Ergebnisse hat man auch mit einer einmaligen adjuvanten Chemo-Instillationstherapie erzielt, die 6 Stunden bzw. spätestens 24

Stunden nach der Operation durchgeführt wurde. Die Rückfallrate konnte auf diese Weise um 39% gesenkt werden [6; 8]. Bei Patienten mit mittlerem oder hohem Risiko muss trotzdem auch eine langfristige Chemo- oder Immunotherapie durchgeführt werden [6; 8].

### 3.2. Muskelinvasive Blasenkarzinome

Ungefähr 30% der Blasenkarzinome sind bereits bei der Erstdiagnose muskelinvasiv, 10-15% sogar schon metastasiert. Nach radikaler Zystektomie rezidivieren in etwa 30%-50% der muskelinvasiven Karzinome mit Lokalrezidiven im kleinen Becken, der Rest in Form von Fernmetastasen.

Hauptsymptom ist auch hier die Hämaturie, unter Umständen begleitet von Dysurie, Drangsymptomatik, Pollakisurie und Schmerzen im kleinen Becken.

Sind keine lymphogenen oder hämatogenen Metastasen zu erkennen, ist die radikale Zystektomie mit pelviner Lymphadenektomie Goldstandard der Therapie. Adjuvante Chemotherapie vor und nach der Operation ist möglich; meist handelt es sich hier um eine Cisplatin-Kombinationstherapie. Transurethrale Resektion in Kombination mit Chemotherapie und Bestrahlung ist eine Alternative für Risikopatienten bzw. Patienten, bei denen eine radikale Zystektomie aus anderen Gesichtspunkten nicht in Frage kommt [4].

### 3.3. Harnwegsinfekt

Üblicherweise werden Harnwegsinfekte durch Antibiotikagabe therapiert; sehr oft wird Trimethoprim, das den Folsäurezyklus der Bakterien hemmt, verschrieben. Bei wiederkehrenden Infektionen wird die Antibiotikagabe verlängert oder ein anderer Wirkstoff appliziert.

Neuen Erkenntnissen zufolge bleiben intrazellulär vorliegende UPEC von der Antibiotikagabe weitestgehend unbeeinflusst, weshalb verbesserte Formulierungen oder Träger-Systeme, die das Antibiotikum effizienter in die Zelle schleusen, wünschenswert wären. Dabei muss jedoch die mikro- und makroskopische Beschaffenheit des Uroepithels berücksichtigt werden [7].

#### 4. Problemstellung und Zielsetzung

Wie bereits in der Beschreibung der derzeit bestehenden Therapieformen des Harnblasenkarzinoms erwähnt, ist die Rezidivrate hoch, die Therapie selbst unangenehm und häufig auch mit Komplikationen und Nebenwirkungen verbunden [4; 6; 8]. Die adjuvante lokale Chemotherapie, die beim nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinom zum Einsatz kommt, scheint zwar ein hohes Potential zu besitzen, das derzeit aber noch nicht voll ausgeschöpft werden kann, da die Gewebepenetration zumeist sehr gering ist. Die Gründe dafür liegen vor allem in der oben beschriebenen Makro- und Mikrostruktur des Urothels sowie der kurzen Verweilzeit am Resorptionsort. Wäre es möglich, die Gewebepenetration und -interaktion zu verbessern, könnte dieser Therapieansatz effizienter und wahrscheinlich auch mit größerem Heilungserfolg eingesetzt werden.

Wünschenswert wäre außerdem, die Interaktion zwischen Arzneistoff und Gewebe vorwiegend auf maligne Zellen zu beschränken, da dies zu einer Verbesserung der Therapieeffizienz ohne Anstieg von Toxizität und Nebenwirkungen führen sollte. Durch die Möglichkeit der lokalen Installation ist das endgültige Zielgewebe relativ einfach erreichbar. Somit könnte prinzipiell sowohl ein aktives als auch ein passives Targeting-System, das die Gewebepbarriere durchdringen kann und tumorselektiv ist, zum Einsatz gebracht werden. Erste Ansätze zur Penetrationsverbesserung konzentrieren sich derzeit auf physikalisch gestützte Konzepte wie EMDA oder lokale Hyperthermie. Eine Delivery-Strategie, die quasi selbstständig funktioniert und keiner Manipulation von außen bedarf, wäre aber vorteilhafter, weil der Arzneistoff dann in Form einer gewöhnlichen Installation verabreicht werden könnte.

Biokompatible Nanopartikel sind ein vielversprechender Ansatz für derartige Drug-Delivery/-Targeting Systeme. Dabei handelt es sich um ein partikuläres Trägersystem mit Dimensionen im Nanometerbereich, in das der Arzneistoff eingebaut wird. Meist werden zur Herstellung Polymere synthetischen oder natürlichen Ursprungs verwendet, die bioabbaubar und biokompatibel sein müssen und auch das Immunsystem nicht reizen dürfen. Beispiele dafür sind Polylactid-co-glycolid (PLGA), Polycaprolacton (PCL) oder Chitosan. Durch die Verkapselung des Arzneistoffes soll der Transport zum Zielgewebe erleichtert bzw. überhaupt ermöglicht werden; außerdem bietet diese Strategie instabilen Wirkstoffen Schutz vor dem umliegenden Milieu.

Um das Erreichen des Zielgewebes zu erleichtern und so die Bioverfügbarkeit zu verbessern, können selektionsfördernde Modifikationen an der Oberfläche der Nanopartikel eingesetzt werden. So kann zum Beispiel über Polyethylenglycol (PEG) Avidin an die Nanopartikel gebunden werden, an das wiederum ein Ligand gekoppelt wird, welcher spezifisch mit einem Rezeptor im Körper interagiert [10].

Eine weitere Möglichkeit zur Zielrichtung von Nanopartikeln besteht im Einsatz von Lektinen. Dabei handelt es sich um von Pflanzen produzierte Proteine nicht-immunogenen Ursprungs, die mit hoher Spezifität und Selektivität bestimmte Zuckerstrukturen erkennen und an sie binden können [12]. An der Zellmembran von tierischen Zellen befindet sich als äußerste Schicht die sogenannte Glykokalyx. Sie besteht aus verzweigten Oligosaccharid-Ketten, die kovalent an membranständige Glykoproteine und Glykolipide gebunden sind. Durch die Vielfalt dieser Kohlenhydrat-Ketten erhält jeder Zelltyp seine spezifische Oberfläche, wodurch eine „Erkennung“ von Zellen über „Selektine“ (zuckerbindende Proteine) möglich wird. So beruht z.B. das Blutgruppen-Antigen-System auf der Wechselwirkung zwischen Glykokalyx und Selektinen [11].

Da es im Zuge der Malignisierung von Blasen Zellen zu charakteristischen Veränderungen der Glykokalyx kommt, könnte, die Auswahl eines geeigneten Lektins vorausgesetzt, dieser Mechanismus für eine Formulierung mit gewebespezifischer Aktivität herangezogen werden. Dafür wurde in Vorstudien geklärt, ob sich analog zur Glykokalyx auch das Lektin-Bindungsprofil verändert. Weiters wurde untersucht, ob sich bestimmte Lektine identifizieren lassen, die präferentiell an malign entartete Urothelzellen binden. Hierbei wurde Erdnuss-Lektin (PNA) als effizientester „Selektionsmarker“ zwischen gesundem und kanzerösem Gewebe identifiziert. Weizen-Lektin (WGA) hingegen stellt den potentesten „Vermittler“ einer generellen Bioadhäsion dar [13].

Ziel dieser Arbeit war es, die Ergebnisse dieser Lektin-Studien auf Lektin-modifizierte Nanopartikel zu übertragen. Auf diese Weise sollte ein effizientes Drug-Targeting- und -Delivery-System entwickelt werden, das ohne großen apparativen Aufwand in der Instillationstherapie der Harnblase angewendet werden kann.

Für die Herstellung der Nanopartikel wurde PLGA als Matrixmaterial verwendet, welches biodegradabel ist, in ausreichendem Maße funktionelle Gruppen für die Kopplung aufweist und außerdem hinsichtlich Toxizität alle Voraussetzungen erfüllt,

um auch in vivo eingesetzt zu werden [14]. Die Oberflächenmodifikation mit Lektin sollte zu einer möglichst selektiven Anreicherung an den Zielzellen führen, wobei im Zuge dieser Diplomarbeit primär WGA-modifizierte Nanopartikel hergestellt wurden. Diese sollten nachfolgend hinsichtlich ihrer Interaktion mit gesunden und malignen Blasenellen näher charakterisiert werden.

# Ergebnisse und Diskussion

Im Zuge der vorliegenden Diplomarbeit wurden biodegradierbare Nanopartikel hergestellt und mit Lektin aus Weizenkeimen (WGA) modifiziert. Deren Interaktion mit einer gesunden Urothelzelllinie (SV HUC) und zwei unterschiedlich stark malign veränderten Urothelzelllinien (5637, HT 1376) wurde untersucht, um die Möglichkeit einer zukünftigen Anwendung in der intravesikalen Therapie des Harnblasenkarzinoms zu evaluieren.

## 1. Nanopartikel Herstellung

Zunächst wurden Polylactid-co-Glycolid (PLGA) Nanopartikel hergestellt, welche mit BOD markiert wurden (Herstellungsprozess siehe Anhang C). Die Nanopartikel (NP) waren 135 nm – 189 nm groß, hatten einen Polydispersitätsindex (PDI) von maximal 0,142 und ein Zeta-Potential im Bereich zwischen -33,2 mV bis -52,2 mV. Diese Charakteristika deuten auf eine ausreichende Stabilität der Nanopartikel-Suspension hin, weshalb sie zur Modifikation mit WGA weiterverwendet werden konnten.

Durch die Kopplung von WGA an die NP stieg deren Größe. PDI und Zeta-Potential wurden, wie bereits in vorhergehenden Arbeiten beschrieben [14], ebenfalls erhöht. Der Erfolg der WGA Modifikation wurde mit Hilfe eines Flow-Cytometer-Versuches nachgewiesen. Dabei wurde eine Einzelzellsuspension 30 min lang mit WGA-modifizierten Nanopartikeln (WGA-NP) oder ebenso lang mit nicht modifizierten Nanopartikeln (nmNP) bei 4°C inkubiert und nach dem Waschen fluorimetrisch analysiert. Bei erfolgreicher WGA-Kopplung war die detektierte, zellgebundene Menge an Partikeln 2-3-mal so groß wie die der an Einzelzellen assoziierten NP ohne Modifikation (siehe Anhang C, Abb.1). Dies belegt einerseits den Erfolg der Kopplung des Lektins an die Partikeloberfläche unter Erhalt der Funktionalität, und gibt andererseits bereits einen ersten Hinweis auf eine spezifische, WGA-vermittelte Assoziation der WGA-NP an die Zelloberfläche.

Aufgrund ihrer hohen Stabilität konnten nmNP-Suspensionen bei 4°C im Kühlschrank gelagert und über einen längeren Zeitraum verwendet werden, WGA-modifizierte Nanopartikel aggregierten bei denselben Lagerbedingungen jedoch viel eher. Auslöser dafür dürfte vor allem das näher am Neutralen liegende Zeta-Potential sein, wodurch die elektrische Abstoßung der Nanopartikel in Suspension untereinander

herabgesetzt wird. Um den maximal möglichen Verwendungszeitraum der WGA-NP zu verlängern, wurden die Partikelsuspensionen zu je 1,5 ml in Eppendorfgläsern bei -80°C eingefroren, und nach dem Auftauen hinsichtlich ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften, sowie ihrer Funktionalität überprüft. Wie aus Anhang A Abb.2 ersichtlich, kam es bei der eben beschriebenen Lagerungsart nach vier Tagen zu keinerlei Funktionalitätsverlust; nach drei Wochen war die Zellossociation zwar geringer, aber trotzdem noch doppelt so hoch wie bei nmNP.

## 2. Charakterisierung der WGA-NP-Bindung an drei verschiedenen Urothelzelllinien

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit konnte hinsichtlich dieser Charakterisierung zur Publikation „Lectin-modified PLGA nanoparticles as a novel delivery strategy for the improved intravesical therapy of bladder cancer“ maßgeblich beigetragen werden.

Dabei wurde an einer gesunden Zelllinie (SV HUC) und zwei malign veränderten - die eine weniger stark (5637) die andere stärker (HT 1376) - das Adhäsionsverhalten von WGA-NP im Vergleich zu nmNP untersucht. Die Untersuchungen wurden mit Einzelzellsuspensionen und anschließend auch mit Zell-Monolayern der drei Zelllinien durchgeführt. Zur besseren Visualisierung der Partikel-Zell-Interaktion wurden fluoreszenzmikroskopische Analysen durchgeführt und dokumentiert. Ein deutlicher Unterschied zwischen der Menge zellgebundener WGA-NP und jener der nmNP war sowohl bei den Einzelzellsuspensionen als auch am Monolayer aller drei Zelllinien sichtbar (Anhang D, Abb.1). Um auszuschließen, dass durch die Kopplung eine Veränderung der relativ hydrophoben PLGA-Oberfläche stattfand und die stärkere Zellbindung unter Umständen vorwiegend dadurch verursacht wurde, wurden parallel auch NP mit humanem Serumalbumin (HSA) modifiziert und getestet. Da diese dasselbe Bindungsniveau aufwiesen wie nmNP, handelte es sich bei den WGA-NP höchstwahrscheinlich um eine spezifische, rezeptor-vermittelte Bindung.

An Einzelzellen des höchsten Malignitätsgrades hefteten sich 8-mal mehr WGA-NP als nmNP, bei weniger stark veränderten Krebszellen betrug dieses Verhältnis 1:6, bei gesunden 1:3. Die Einzelzellen des niedrigen Malignitätsgrades zeigten pauschal

gesehen die höchste WGA-NP-Assoziation. Sie war etwa doppelt so hoch wie bei den beiden anderen Zelllinien. Unerwartet war, dass an gesunde Einzelzellen und stark dedifferenzierte Tumorzellen in etwa gleich viele WGA-NP banden. Somit galt für Einzelzellsuspensionen bezüglich der Lektin-vermittelten Bindung: 5637 > HT 1376 ~ SV HUV (siehe Anhang D). Schlussfolgernd könnten demnach 5637 Zellen vergleichsweise mehr zugängliche WGA-Bindungsstellen an der Zelloberfläche besitzen. Oder es befindet sich auf dieser Zelllinie zwar eine zahlenmäßig gleiche Anzahl an Bindungsstellen, diese sind aber durch eine höhere Affinität zu WGA gekennzeichnet.

Die am Monolayer gewonnen Erkenntnisse waren nur teilweise deckungsgleich mit denen der Einzelzellversuche. Eine ausgeprägt höhere Bindungskapazität für WGA-NP als für nmNP konnte auch am Monolayer festgestellt werden. Außerdem wiesen die gesunde Zelllinie und die am stärksten malign veränderte Zelllinie wieder sehr ähnliche WGA-NP Assoziations-Niveaus auf. Entgegen den Erwartungen war jedoch die WGA-NP-Adhäsion der weniger stark malign veränderten Zelllinie (5637) ebenfalls auf das Niveau der anderen beiden Zelltypen abgefallen. So galt in diesem Fall: SVHUC ~ HT1376  $\geq$  5637 (Anhang D). Auch das relative Verhältnis der WGA-NP zu nmNP hatte sich im Vergleich zu Einzelzellen verschoben. Gab es bei den Einzelzellversuchen bezüglich dieses Verhältnisses noch eine klare Abhängigkeit vom Zelltyp, so war es am Monolayer für alle drei Zelllinien weitgehend gleich. Generell banden die Zell-Monolayer doppelt so viel WGA-NP wie nmNP (Anhang D). Diese Veränderungen im Bindungsmuster deuten auf eine andere (sterische) Zugänglichkeit der WGA-spezifischen Bindungsstellen am Monolayer im Vergleich zur Einzelzelle hin oder aber auf eine ungleiche Verteilung der Bindungsstellen über die apikale und basolaterale Membranoberfläche im Monolayer. Ein weiterer Hinweis für diese These fand sich bei jenen Zellversuchen, bei denen der Bindungsprozess von WGA-NP bzw. nmNP im Zeitverlauf beobachtet wurde. Bei Einzelzellversuchen aller drei Zelltypen war schon nach 15 min ein Gleichgewicht auf maximalem Bindungsniveau erreicht, sowohl bei WGA-NP als auch bei nmNP. Im Gegensatz dazu stieg die Partikelbindung am Monolayer stetig an und erst nach einem Zeitraum von vier Stunden wurde eine Plateauphase erreicht (siehe Anhang D, Abb.6, Anhang A, Abb.8). Die schnellere Einstellung des Gleichgewichts bei Einzelzellen deutet prinzipiell auf eine gute Zugänglichkeit der WGA-spezifischen Bindungsstellen hin,

wohingegen beim Monolayer möglicherweise doch eine verstärkte sterische Hinderung vorliegen könnte. Mit längerer Inkubationszeit nahm die (unspezifische) Assoziation der nmNP an die Zell-Monolayer ebenfalls allmählich zu, allerdings stieg die Bindung von WGA-modifizierten Partikeln im selben Zeitraum um ein Vielfaches stärker an (Anhang A Abb.7; Abb.8, Anhang D, Abb.6).

Neben der Zeitabhängigkeit der Bindung wurde auch die Auswirkung der Partikelkonzentration in der Probensuspension auf die Zellassoziation getestet. Auffällig war, dass niedrige WGA-NP-Konzentrationen bei Einzelzellversuchen mit der gesunden und der niedrig malignen Zelllinie zu sehr ähnlichen Bindungswerten führten. Mit Anstieg der WGA-NP Konzentration vergrößerte sich aber der Abstand zwischen den WGA-NP-Bindungswerten der beiden Zelllinien deutlich. Das könnte auf eine schnellere Absättigung der WGA-Bindungsstellen bei SV HUC hindeuten (Anhang A, Abb.3).

Um die Spezifität der WGA-Bindung an Zellen zu belegen, wurden kompetitive Inhibitionsversuche mit N,N',N''-Triacetylchitotriose durchgeführt. N,N',N''-Triacetylchitotriose ist ein Kohlenhydrat, das eine starke Affinität zu WGA aufweist und so die Zellbindung der WGA-NP verhindern kann. An Einzelzellen wurden diese Versuche mit steigenden Konzentrationen von N,N',N''-Triacetylchitotriose durchgeführt, um graduelle Veränderungen aufzeigen zu können (Anhang A, Abb.5; Anhang D, Abb.4). Dabei wurde festgestellt, dass die maximale unspezifische Bindung, also jener Teil der WGA-NP-Assoziation, der nicht inhibiert werden konnte, bei Einzelzellen der gesunden Zelllinie 34% betrug, bei den weniger stark mutierten Krebszellen 66% und bei den stark mutierten Krebszellen 60%. Es ist aber davon auszugehen, dass bei den malignen Zellen der maximale Inhibitionslevel mit den getesteten Konzentrationen noch nicht erreicht wurde, da in der Inhibitionskurve noch keine Plateauphase zu beobachten war. Aus Gründen der Viskosität des Mediums war es jedoch nicht möglich eine noch höhere Zucker-Konzentration anzuwenden, ohne die Versuchsbedingungen entscheidend zu verändern. Am Monolayer wurde nur eine, vergleichsweise hohe, N,N',N''-Triacetylchitotriose Konzentration getestet (Anhang D, Abb.5). Lediglich bei SV HUC kam es dabei zu einer geringen Inhibition (ca. 25%), bei den malignen Zelllinien konnte hingegen keine Minderung der WGA-Bindung durch N,N',N''-Triacetylchitotriose festgestellt werden.

Um die Stabilität der WGA-NP-Adhäsion über eine längere Zeit zu erfassen, wurden Pulse-Chase-Untersuchungen (PCU) am Monolayer durchgeführt. Um dynamische Prozesse der Zelle, wie Endozytose oder Veränderungen an der Zellmembran, ausschließen zu können und möglichst nur die Bindung an die Zelloberfläche zu beobachten, wurden diese Versuche zunächst konstant bei 4°C durchgeführt. Unter diesen Voraussetzungen kam es zu keiner Veränderung der WGA-NP-Bindung und die Assoziation war stabil. Danach wurde das Experiment bei physiologischer Temperatur (37°C) wiederholt. Dabei wurden nach jedem Waschschrift sowohl die zuvor mit NP inkubierten Zellen als auch ein Aliquot aus dem Überstand fluorimetrisch analysiert. Es stellte sich heraus, dass unter diesen Bedingungen scheinbar nur ein sehr geringer Teil der WGA-NP an der Zelloberfläche haften blieb. Nach einer zweistündigen Chase-Phase bei 37°C - und insgesamt fünf Waschschriften in dieser Zeit - war die Fluoreszenz der mit WGA-NP bzw. nmNP inkubierten Monolayer um bis zu 90% gesunken (siehe Anhang E). Ein Teil der offenbar von der Zelloberfläche dissoziierten Partikel konnte im Überstand detektiert werden, bei dem mit zunehmender Inkubationszeit das Fluoreszenzsignal anstieg. So musste davon ausgegangen werden, dass WGA-NP ebenso wie nmNP bei physiologischen Temperaturen nicht stabil an Zell-Monolayer gebunden werden konnten. Allerdings mussten für die Analyse am Monolayer und im Überstand unterschiedliche Messverfahren eingesetzt werden, weshalb die Werte quantitativ nicht direkt vergleichbar waren. Ebenso konnte nicht mit Sicherheit festgestellt werden, ob die Fluoreszenz im Überstand nur von Partikeln, von Partikeln mit daran gebundenen Rezeptoren oder Membranbestandteilen oder aber auch nur vom Fluoreszenzmarker alleine stammt.

Zur weiteren Abklärung wurden deshalb fluoreszenzmikroskopische Bilder von 5637 und SV-HUC Zellen nach PCUs mit WGA-NP bei unterschiedlichen Temperaturen ausgewertet (Anhang E). Auf den Bildern, die vor dem Waschvorgang aufgenommen wurden, waren deutlich mehr zellassozierte WGA-NP zu erkennen als auf jenen, die die Situation nach Chase-Inkubation und Waschen zeigen. Trotzdem sah man auch dort eine nicht zu vernachlässigende Menge zellgebundener WGA-NP. Das hieße, dass trotz der markanten Abnahme im Fluoreszenz-Readout bei weitem nicht alle zunächst zellassozierten WGA-NP in den Überstand verloren gingen und ein Teil durchaus in stabil an die Zelloberfläche gebundener Form vorlag. Dies legte die

Vermutung nahe, dass möglicherweise das System schlichtweg übersättigt war und aus diesem Grund nicht alle WGA-NP stabil gebunden werden konnten (Anhang E, Abb.8). Ein weiterer Versuch mit zwei unterschiedlichen WGA-NP-Konzentrationen - eine im Standardbereich, die andere vielfach verdünnt - bei ansonsten gleichen Bedingungen sollte dies abklären. Dabei stellte sich heraus, dass unabhängig von der Konzentration prozentuell gesehen gleich viele WGA-NP (bzw. gleich viel Fluoreszenzintensität) verloren gingen.

Bereits in früheren Studien war die Bindung fluoreszenz-markierter Lektine an Urothelzellen untersucht worden [13]. Damals zeigte sich für F-WGA eine gestaffelte Affinität in Abhängigkeit des Malignitätsgrades: HT 1376 > 5637 > SV HUC. Da die Bindungsversuche mit WGA-NP zu anderen Ergebnisse führten, wurde unter Einbeziehung von F-WGA in einer weiteren Versuchsreihe die Zellbindung reiner Lektine mit der von Lektin-modifizierten Partikeln verglichen. Ziel war es dabei herauszufinden, ob F-WGA nun ebenfalls ein verändertes Bindungsmuster aufwies (z.B.: durch Veränderungen innerhalb der Zelllinien mit steigenden Passagen) oder ob das für WGA-NP gefundene Verhalten rein auf den Einfluss des Partikelsystems zurückgeführt werden konnte. Es stellte sich heraus, dass bei Einzelzellversuchen mit F-WGA nun auch folgende Reihenfolge für die Bindungskapazität galt: 5637 > HT 1376 > SV HUC. WGA-NP, die parallel dazu getestet wurden, zeigten das übliche Muster: 5637 > HT 1376 ~ SV HUC (Anhang E, Abb. 2). Am Monolayer wurde dieser Versuch nur mit 5637 und SV HUC durchgeführt - mit dem Ergebnis, dass 5637 eine etwas bessere F-WGA Bindung aufwies. Um die Veränderung im Bindungsmuster eventuell mit der Passage-Zahl oder der Herkunft der Zellen korrelieren zu können, wurde der Versuch mit einer länger und einer kürzer propagierten Charge von 5637 Einzelzellen aus verschiedenen Quellen (ATCC bzw. DSMZ) wiederholt. Dabei wurden zwar leichte relative Verschiebungen in Abhängigkeit der Passagezahl gefunden, jedoch nicht in einer Höhe, welche die markanten Änderungen im Bindungsverhalten der Zelllinie erklärt hätten.

Um herauszufinden, ob ein Teil der WGA-NP auch von den Zellen internalisiert werden kann, wurden am Monolayer niedrig maligner Zellen (5637) und gesunder Zellen Untersuchungen durchgeführt, bei denen oberflächlich gebundene Partikel durch Waschen mit N-Acetyl-D-Glucosamin entfernt werden sollten (Anhang E). Nicht internalisiertes WGA - unabhängig davon, ob frei oder an der NP-Oberfläche

gebunden - sollte mit dem Zucker in der Waschlösung interagieren können, wodurch sich ein größerer Fluoreszenzverlust ergeben sollte, als bei der Verwendung von Puffer als Waschflüssigkeit. Dazu wurden die Zellen nach Beladen mit Partikeln und Ablauf einer Internalisationsphase (37°C) bzw. ohne Möglichkeit zur Internalisation (konstant bei 4°C) gewaschen und anschließend fluorimetrisch analysiert (Anhang E, Abb.10). F-WGA und nmNP dienten als Referenz. Bei den mit WGA-NP inkubierten Zell-Monolayern ging zwar – analog zu allen vorherigen Versuchen – generell weniger Fluoreszenz verloren als bei jenen, die mit nmNP beladen waren, aber ein eindeutiger Unterschied zwischen der Zucker-Waschlösung und dem Puffer konnte im Gegensatz zu F-WGA nicht gezeigt werden. Es könnte aber sein, dass nicht nur ein WGA-Molekül in die Partikel-Zellbindung involviert ist und daher eine ungleich stärkere und damit schwerer zu lösende Zellbindung resultiert als bei freiem F-WGA.

### 3. Ausblick

Aufgrund der geringen Affinitätsunterschiede für WGA-NP zwischen gesunden und malignen Zellen im Monolayer scheint aus derzeitiger Sicht eine Anwendung dieses Lektins für eine zielgerichtete Drug-Delivery bei der installativen Chemotherapie des nicht-muskelinvasivem Blasenkarzinoms eher unwahrscheinlich. Allerdings war die generelle WGA-vermittelte Bioadhäsion im Unterschied zu nicht-modifizierten NP höher als erwartet. Demnach bietet sich eher ein Einsatz von WGA-NP zur Verlängerung der Verweilzeit in Form von Retardarzneiformen bei lokaler Therapie (e.g. Blasenentzündungen) an.

# LITERATURVERZEICHNIS

**[1]** Fritsch H, Kühnel W:

Taschenatlas Anatomie 2 - Innere Organe.

Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart New York, 2009; 10: 424

**[2]** Thews, Mutschler, Vaupel:

Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen.

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1999; 5: 439,440

**[3]** Khandelwal P, Abraham SN, Apodaca G:

Cell biology and physiology of the uroepithelium.

Am J Physiol Renal Physiol, 2009; 297: 1477-1501

**[4]** Scholz M, Bucher A, De Santis M, Klimpfinger M:

Leitlinie Blasenkarzinom.

J für Urol und Urogynäkol, 2010; 17: 23

**[5]** Arianayagam R, Arianayagam M, Rashid P:

Bladder cancer-current management.

Austr Fam Physic, 2011; 40: 209-213

**[6]** Sexton WJ, MD, Wiegand LR, MD, Correa JJ, MD, Politis C, MD, Dickson SI, MD, and Kang LC, MD:

Bladder cancer: A Review of Non-Muscle Invasive Disease.

Canc Cont, 2010; 17: 256-268

**[7]** Dhakal BK, Kulesus RR, Mulvey MA:

Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenetic Escherichia Coli.

Eur J Clin Invest, 2008; 38: 2-11

**[8]** Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Plaou J, Roupret M: Guidelines on non-muscle invasive bladder cancer.

Eur Urol, 2011; 59: 584-94

**[9]** Sylvester R:

Bacillus Calmette-Guerin treatment of non-muscle invasive bladder cancer - review article.

Int J of Urol, 2011; 18: 113-120

**[10]** Vauthier C, Bouchemal K:

Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles.

Pharm Res, 2009; 26: 1025-1058

**[11]** Ohyama C:

Glycosylation in bladder cancer.

Int J Clin Oncol, 2008; 13: 308.

**[12]** Nultsch:

Allgemeine Botanik.

Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 2001; 11: 50

**[13]** Neusch L, Plattner VE, Polster-Wildhofen S, Zidar A, Chott A, Borchard G, Zechner O, Gabor F, Wirth\* M:

Lectin-mediated Biorecognition as a Novel Strategy for Targeted Delivery to Bladder Cancer.

The J of Urol, Elsevier, 2011; in press

**[14]** Fillafer C, Friedl DS, Ilyes AK, Wirth M, Gabor F:

Bionanoproboscopes to study particle-cell interactions.

J Nanosci Nanotechnol, 2009; 9: 3239

**[15]** Ratzinger G, Länger U, Neutsch L, Pittner F, Wirth M, Gabor F:  
Surface modification of PLGA particles: The interplay between stabilizer, ligand size  
and hydrophobic interactions.  
Langmuir, 2010; 26: 1855-1859



# **ANHANG A:**

## **Publikation**

To be submitted.

### **Lectin-modified PLGA nanoparticles as a novel delivery strategy for the improved intravesical therapy of bladder cancer**

Lukas Neutsch, Sandra Mesaric, Franz Gabor, Michael Wirth

From the Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, University of Vienna (LN, FG, MW).

Correspondence: Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, University of Vienna, Althanstraße 14, A 1090 Vienna, Austria (telephone (0043)-1-4277-55407; FAX: (0043)-1-4277-55)

Key words: Bladder Cancer; Intravesical Therapy; Drug Delivery; Nanoparticles; PLGA; Lectin; Biorecognition

## Abstract

Adjuvant intravesical therapy has proven effective in prolonging the recurrence-free interval after resection of non-muscle-invasive cancer, which today represents the most critical challenge in the management of urothelial carcinoma from both, a clinical and economic point of view. There is, however, controversial debate on whether the still limited overall effect warrants the substantial effort associated with repeated instillations, and various device-assisted or pharmacokinetic concepts are thus under evaluation with aim of improving treatment impact by enhancing the urothelial bioavailability. Surprisingly, the potential benefit of in-situ targeted colloidal drug carriers in the micro- or nanometer regime has so far hardly been addressed as compared to other fields of oncology, and especially the use of biorecognitive principles for cytoadhesion (second-generation bioadhesive delivery systems) to improve uptake in superficial cells has not been investigated.

We hypothesized that the carbohydrate-specific binding- and uptake-mechanism utilized by uropathogenic *Escherichia coli* to invade the bladder wall can be mimicked with lectin-decorated, biodegradable nanoparticles in order to take advantage of a more intensive particle-cell contact. For this, PLGA nanoparticles containing Bodipy® as a fluorescent label were surface-modified with wheat germ agglutinin (WGA) and characterized via flow cytometry and fluorescence readout in regard to their interaction potential with urothelial cell lines of healthy and malignant origin. The beneficial impact of WGA-coating could be clearly demonstrated and allowed for enhanced, receptor-mediated binding on both, single cells and monolayers. Experiments were followed microscopically to confirm stable surface adhesion. While rate and extent of potential WGA-triggered cell internalization still require further investigation, the strong tissue binding gained by this novel strategy presents a promising approach towards improving residence time and bioavailability of intravesically applied agents in the treatment of bladder cancer.

## 1. Introduction

Non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC) is the sixth most common cancer in men, with a prevalence of male over female sex rating to 4:1 [1]. 75%-80% of the newly diagnosed urothelial tumors are NMIBC [1; 2]. It is a disease that appears in the later decades of life - the average patient's age is 70 years - and it is the eight most common cancer-related cause of death [1; 3].

Smoking tobacco, aryl amine, ionizing radiation, certain drugs (e.g.: cyclophosphamid, phenacetin), dietary factors, chlorination of drinking water, a polymorphism in detoxifying enzymes like glutathion-S-transferase and diseases like chronic cystitis or *schistosoma hematobium* infection are some of the main risk factors that can lead to NMIBC [1; 3; 4]. The use of tobacco for more than 40 pack years leads to a 4-fold increased risk and it takes longer to decline to the baseline value of someone who never smoked, than it would with lung cancer [1]. The most common symptom for NMIBC is hematuria - either microscopic or gross [1; 4].

The bladder is built of different layers, of which the urothelium is the inmost, followed by the lamia propia and muscle [1]. NMIBC is located in the urothelium and the lamia propia [1]. The urothelium itself is also built of layers of different cell types, comprising umbrella cells, intermediate and basal cell layers [5]. As an adaption to the filling status of the bladder, umbrella cells can stretch and the cells of the intermediate layers seem to slide past one another, to allow filling [5]. The urothelium separates urine from tissue and is the most difficult human tissue barrier to penetrate, what makes local application of drugs very difficult [5].

While it was possible to improve treatment and results for other cancer-types, in bladder cancer there are still three big, unsolved problems: recurrence, progression and mortality [6; 7].

The initial standard therapy for NMIBC is the transurethral resection (TUR), followed by adjuvant chemotherapy or immunotherapy installations [1; 8]. According to the WHO classification, NMIBC is stratified into three risk classes: low-risk, intermediate-risk and high-risk NMIBC [8]. Immediate postoperative intravesical therapy, which consists of one installation, best within 6 hours after the TUR, leads to 39% decreased odds for recurrence [1; 8]. The procedure has mild side effects, but is very cost effective, which is highly important, considering bladder cancer being the most expensive kind of cancer when calculated per capita [9; 10]. At that point treatment

for low risk patients is usually complete and follow-up treatment starts, consisting mainly of active surveillance [8].

Intermediate- or high-risk patient's treatment is more complex and time-consuming. 2-4 weeks after TUR, induction intravesical therapy may be initiated for up to 6 weeks, with installations being repeated weekly [1]. This is normally followed by maintenance intravesical therapy for about one year [8]. Immunotherapy with Bacillus calmette-guerin (BCG) or chemotherapy (e.g.: with Mitomycin C, Doxorubicin, Epirubicin, Thiotepa [1; 11]) is used most frequently. While from the current view there is strong indication that BCG maintenance therapy is superior in preventing recurrence and delaying progression as compared to Mitomycin C maintenance therapy, it is also more toxic [8; 11; 12; 13]. However, as recurrence rates in high-risk NMIBC are as high as 78% and 5-year progression rates range from 15-50%, BCG therapy is strongly recommended despite the likely occurrence of side effects [1; 3; 11]. For intermediate risk patients, there is currently no agreement on what specific drug should be used, but in any case instillations should be performed [8]. Side effects of BCG are hematuria (75%), non-infective cystitis (50%), and cold like symptoms (40%); sepsis is also possible [1; 11]. For high-risk patients that do not respond to BCG or have serious adverse effects, immediate radical cystectomy may be considered [1; 8].

Despite all these therapy options recurrence-rate is still high, just as tumor progression and mortality [1]. Following clinical therapy, routine close monitoring of the disease by laboratory tests, imaging studies or invasive offline procedures is needed, which is the main reason for bladder cancer having the highest lifetime treatment costs per patient of all cancers [14; 10].

All these considerations make a better, more effective therapy concept highly desirable and advocate for more translational research on this topic. One way to increase efficacy would be to optimize delivery of the chemotherapeutic drug to the malignant tissue and thus improve treatment impact and outcome [15]. There are several new approaches that are currently under investigation, some aim at using pharmacological manipulations to enhance drug delivery or they are based on bioadhesive permeation enhancers like chitosan, DMSO, or Polycarbophi [16]. Also bioadhesive microspheres, hydrogel systems or nanoparticles may serve as drug depots, prolonging the bladder's exposure to the active pharmaceutical ingredient

[16; 17; 18]. Besides, physical methods to disrupt the urothelium are in the focus of research, such as electromotive drug administration (EMDA, iontophoresis/electrophoresis) or local hyperthermia [16; 19; 20]. Moreover, Photodynamic Therapy (PDT) via 5-Aminolevulinic acid (5-ALA) seems to be an auspicious option [21]. However, all these approaches have not so far advanced beyond the investigative stage and are not widely used in clinical practice.

In the present study, we report on lectin-modified nanoparticles as a possibility to deliver pharmaceutically active agents more specifically and with increased residence time to the site of disease. Preliminary studies have shown that changes in glycosylation of urothelial membrane proteins associated with increasing malignancy, may allow for a selective targeting of cancer cells via chosen lectins, especially Peanut agglutinin (PNA) [22; 23; 24]. The intention of this study was to find out whether there is a difference in cell interaction between the free lectin solution and biodegradable nanoparticles that are surface-modified with the respective lectin. Furthermore, we wanted to evaluate if lectin-modified nanoparticles may provide a suitable platform for improving drug delivery without raising the susceptibility for side effects.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Chemicals

Lectin from *Triticum vulgare* (WGA) was purchased from Vector laboratories (Burlingame, USA). 4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (Bodipy®, BOD) was provided by Molecular Probes (Invitrogen Corp., Carlsbad, California, USA). Resomer® RG503H (PLGA; Lactide/glycolid ratio 50:50; inherent viscosity 0.32-0.44 dl/g, acid number > 3 mg KOH/g) was obtained from Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany). Hoechst 33342 was bought from Invitrogen Corp. (Carlsbad, California, USA). Bovine albumin serum (BSA), 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDAC), N-hydroxysuccinimide (NHS), Pluronic® F-68, human serum albumin (HSA) and all other chemicals were obtained from Sigma- Aldrich (Vienna, Austria).

### 2.2 Cell culture

#### 2.2.1. SV HUC cells

A human urinary bladder cell line without history of malignant transformation (SV HUC) was generously provided by Gerrit Borchard (University of Geneva, Switzerland). Cells were cultured in HAM'S NUTRIENT MIXTURE F-12 medium (Euro clone, Italy), supplemented with 10% fetal calf serum (Biochrom AG, Berlin, Germany), 1 mM L-glutamine, and 5 ml of a 10 µg/ml penicillin/streptomycin-solution in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub> air atmosphere at 37°C and used between passages 52-62.

#### 2.2.2. 5637 cells

The human urothelial carcinoma cell line 5637 was purchased from the German Collection of Microorganisms and Cell Culture (DSMZ, Braunschweig, Germany). The cells were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal calf serum (Biochrom AG, Berlin, Germany), 4 mM L-glutamine and 150 µg/ml Gentamycin in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub> air atmosphere at 37°C and used at passages 3-17. For comparison, also 5637 cells obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA) were used between passages 39-57. Culture conditions were chosen as detailed above.

All cells were propagated according to the supplier's instruction upon reaching 80-90% confluence and subcultivated by trypsination. For monolayer binding studies,  $1.7 \times 10^4$  cells were seeded on tissue culture-treated 96-well microplates (Greiner, Kremsmünster, Austria). Cells were analyzed after growing to 100% confluence. For single cell studies, 50  $\mu$ l of a cell suspension containing  $5.5 \times 10^6$  cells/ml were used after harvesting via trypsination under standard conditions. For visualization, cells were seeded on glass slides (diameter: 12 mm) that had been sterilized with 70% ethanol in 24-well plates (Greiner, Kremsmünster, Austria) at a density of  $3 \times 10^4$  cells.

### 2.3.Nanoparticles

#### 2.3.1.Preparation of plain particles

Fluorescent PLGA-nanoparticles were prepared by an o/w solvent evaporation method as described previously [25]. Briefly, 400 mg of PLGA were dissolved in 2 g ethyl acetate at 4°C while being covered with Parafilm® to prevent ethyl acetate from evaporation. Then, 250  $\mu$ l of a 1 mg/ml BOD-stock solution in ethyl acetate were added. 6 g of a 3% aqueous Pluronic® F-68 solution and 100 g of a 0.1% aqueous Pluronic® F-68 solution were prepared. The 3% Pluronic® F-68 solution was poured into the PLGA solution and emulsified by sonication (Bandelin electronic, UW 70/ HD 70, Berlin, Germany) for 40 sec at 40% output power. The resulting o/w emulsion was poured into the 0.1% aqueous Pluronic® F-68 solution. This solution was stirred mechanically (600 rpm) for an hour under light protection at room temperature to remove the organic solvent. Afterwards the process was continued under reduced pressure (30 min 100 mbar, 30 min 0 mbar). As a result the particles hardened in the surrounding water phase. Finally, the suspension was filtered through a syringe filter (1  $\mu$ m pore size) to exclude potential aggregates and stored in aliquots of 20 ml.

#### 2.3.2.Particle surface modification

The proteins WGA and HSA were covalently conjugated to the nanoparticle surface by a carbodiimide-mediated coupling procedure. Prior to surface modification, each 20 ml aliquot of the particle-suspension was purified via tangential flow filtration (Vivaflow 50; 100,00 MWCO PES, Satorius vivascience GmbH, Goettingen, Germany) using 40 ml HEPES/NaOH pH 7.0 with 0.1% Pluronic® F-68 to adjust the

optimum pH for the coupling reaction as well as to eliminate PLGA monomers and non-encapsulated BOD. Then, 20 ml of the purified nanoparticle-suspension, 240 mg of EDAC dissolved in 750  $\mu$ l of HEPES/NaOH pH 7.0 with 0.1% Pluronic® F-68 and 10 mg of NHS dissolved in 500  $\mu$ l of the same buffer were mixed and incubated end-over-end for 4 hours at room temperature under protection from light. That way, surface carboxyl groups were activated and allowed for subsequent WGA or HSA coupling via accessible amino groups of the protein. The nanoparticle-suspension was washed twice with 40 ml HEPES/NaOH pH 7.4 with 0.1% Pluronic® F-68 to remove excess cross linking agent. A solution of 1 mg/ml WGA or HSA in HEPES/NaOH pH 7.4 with 0.1% Pluronic® F-68 was prepared and 0.67 ml of the WGA or 1.24 ml of the HSA solution were added to the activated nanoparticle-suspension, respectively. After overnight incubation end-over-end at room temperature, non-reacted NHS intermediates were saturated by adding 3 ml of a 300 mg/ml glycine solution in PBS (+  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) pH 7.4 and incubation for one hour. To purify the suspension and remove unbound protein, the suspension was washed twice with 40 ml HEPES/NaOH pH 7.4 with 0.1% Pluronic® F-68. Finally, the suspension was split in 1.5 ml aliquots, ultrasonicated for 5 min (Sonorex Super, 10 P, Digital, Bandelin, Berlin, Germany, 100% power) to guarantee homogenous distribution and stored frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

### 2.3.3 Particle characterization

Particle size, Zeta potential and polydispersity index (PDI) were measured before and after surface modification by a Zetasizer (Malvern Instruments, Herrenberg, Germany). For this, the nanoparticle-suspension was diluted 1:20 (Zeta potential) or 1:100 (size, PDI) with purified water, respectively. Mean particle size and PDI were determined via dynamic light scattering, Zeta potential measurements were carried out in triplicate at  $25^{\circ}\text{C}$  in disposable capillary cells for all samples.

## 2.4. Interaction between nanoparticles and cells

### 2.4.1. Single cell analysis via flow cytometry

To analyze the association of non-modified particles (nmNP), WGA-modified nanoparticles (WGA-NP) and HSA-modified nanoparticles (HSA-NP) with SV HUC and 5637 single cells, flow cytometry (Epics XL-MLC analytical flow cytometer,

Coulter, USA) was used. At least 1000 cells were accumulated in the respective gate of the single cells for each measurement. The mean channel number of the logarithmic fluorescence intensities of the individual peaks was used for further calculations. For data analysis, Coulter System Software “EXPO 32 ADC XL 4 Colour” was used.

To enable direct comparison between the different nanoparticle-suspensions, dilutions with the same relative fluorescence intensity (FI) were used. The concentration of all suspensions was adjusted using a microplate reader (Spectrafluor Fluorometer, Tecan, Austria, gain 80), by dilution with HEPES/NaOH pH 7.4 if required.

For single cell studies, 50 µl of a freshly trypsinated cell-suspension ( $5,5 \times 10^6$  cells/ml HEPES/NaOH pH 7.4) were mixed with 50 µl of a nanoparticle-suspension (adjusted to a particular FI, between 425 – 2150) and 50 µl of either HEPES/NaOH pH 7.4 or a N,N',N''-Triacetylchitotriose solution (0,0625 µmol/ 100 µl up to 2 µmol/ 100 µl) in the same buffer in case of competitive inhibition experiments, respectively. Incubation was carried out at 4°C and incubation time varied according to the specific aim of the assay. After incubation, 50 µl HEPES/NaOH pH 7.4 were added, and unassociated or loosely bound particles were removed by centrifugation (5 min/4°C/1000 rpm). The generated cell pellet was resuspended in 150 µl fresh HEPES/NaOH pH 7.4 and analyzed by flow cytometry using a forward versus side scatter gate to detect the single cell population and exclude cell aggregates and debris.

#### 2.4.2. Monolayer analysis via fluorescence readout

For monolayer studies, confluent SV HUC and 5637 cell layers were washed thrice with 150 µl PBS (+  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) pH 7.4 prior to incubation with 50 µl of the FI adjusted nanoparticle-suspension. Incubation- and internalization-time varied according to type of assay. Also the temperature of the solutions used was adapted to the temperature needed for the respective experiment. Unbound particles were removed by washing with 150 µl PBS (+  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) pH 7.4 three times and cell associate fluorescence intensity was analyzed at 485/525 nm using a microplate reader (Spectrafluor Fluorometer, Tecan, Austria, gain 80).

### 2.4.3. Imaging of the nanoparticle/cell interaction by fluorescence microscopy

Due to the tendency of confluent monolayers to detach from the glass support during the experiment, not yet fully confluent cell layers of SV HUC and 5637 cells grown on glass slides in 24-well microplates were used for imaging. After washing three times with 1 ml HEPES/NaOH pH 7.4, cell layers were incubated with 300  $\mu$ l nanoparticle-suspension. Time and temperature of the incubation were set according to the aim of the experiment.

Following the incubation/internalization phase, the cell layers were washed with 1 ml HEPES/NaOH pH 7.4 twice and then two times with 1 ml PBS (+  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) pH 7.4. The slides were fixed with paraformaldehyde (PFA; 2% solution in PBS), washed twice and treated with 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution in PBS to saturate unreacted binding sites. Next, a 0.1% Triton X-100 solution in PBS was used to permeize cells (15 min). After washing twice, cell nuclei were stained for 30 min using Hoechst 33342 (1:20 solution in PBS (+  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) pH 7.4, + BSA 1%). Finally, cell layers were fixed with FluorSave™ Reagent (EMD biosciences Inc, Darmstadt Germany). Images were acquired using a Zeiss Epi fluorescence Axio Observer.Z1 microscopy system equipped with LD Plan-Neofluar objectives and the LED illumination system "Colibri".

### 3. Results

#### 3.1. Characterization of the nanoparticles

Size, PDI and Zeta potential were determined by Zetasizer analysis before and after surface modification, as well as prior to each experiment. Size of nmNP ranged from 152.5 nm to 185.7 nm, PDI from 0.091 to 0.142 and Zeta potential from -33.2 mV to -52.2 mV (Tab.1). Upon lectin modification, size and PDI increased as compared to nmNP and Zeta potential decreased due to the covalent surface immobilization of the targeting ligand. The mean particle size of WGA-NP ranged from 160.37 nm to 248.28 nm, PDI from 0.126 to 0.194 and the Zeta potential from -27.4 mV to -37.4 mV (Tab.2). The mean increase in particle size was 33.2 nm, while the standard deviation of this increase being 32 nm was rather high.

Name	Size [nm]	PDI	Zeta potential [mV]
CH 89	152.45±3.09	0.091±0.017	-33.2±4.7
CH 94	175.63±4.16	0.106±0.017	-45.3±3.9
CH 95	185.68±8.33	0.142±0.026	-48.2±4.0
CH 96	184.88±3.02	0.129±0.014	-52.2±0.6

Tab.1: Non-surface-modified NP (nmNP): Mean particle size, PDI and Zeta potential.

Name	Modification	Size [nm]	PDI	Zeta potential [mV]
CH 89.1	WGA	160.37±23.86	0.156±0.069	-27.8±6.7
CH 89.2	WGA	155.40±5.41	0.126±0.014	-27.4±2.4
CH 94.3	WGA	248.28±38.63	0.194±0.083	-28.8±5.8
CH 95.1	WGA	205.96±15.67	0.171±0.036	-32.6±4.4
CH 95.2	HSA	220.29±65.31	0.180±0.051	-37.4±4.5
CH 96.1	WGA	246.02±17.4	0.174±0.049	-31.3±3.0

Tab.2: Surface-modified NP: Mean particle size, PDI and Zeta potential after surface modification with either WGA or HSA.

Modification with WGA (CH 95.1) led to a smaller mean size increase of 20 nm while the change in apparent hydrodynamic diameter upon coupling of HSA (CH 95.2) amounted to 35 nm. PDI and Zeta potential showed a similar tendency (Tab.1, Tab.2).

#### 3.2. Interaction between nanoparticles and cells

For an initial characterization of the interaction between NPs and the cell surface, the binding of NPs modified with WGA was compared to the adhesion of non-modified NPs on single cells in suspension. Figure 1A shows the mean cell associated fluorescence intensity (MFI) of 5637 single cells incubated with WGA-NP, which was 6-fold higher than for cells incubated with the same concentration of nmNP. In case of SV-HUC single cells, surface association was increased by a factor of three as a

consequence of the modification with WGA. This suggests a generally higher binding capacity of WGA-NP, and confirms the functionality of the modification protocol.

In order to rule out that a change in surface hydrophobicity, induced by the modification procedure, accounts for the observed difference in binding behavior, also particles decorated with HSA instead of WGA were included in the testing. No major differences were observed between HSA-NP and nmNP, which points to a ligand-mediated specific binding in case of WGA-NP. Both, nmNP and HSA-NP show little interaction potential independent of the cell type, while lectin-modified particles revealed a notable difference with regard to malignancy. Adhesion to 5637 single cells of cancerous origin was found to be 50% higher as compared to SV-HUC (Fig.1A), indicating that malignant cells may offer a higher amount or more readily accessible WGA-reactive sites

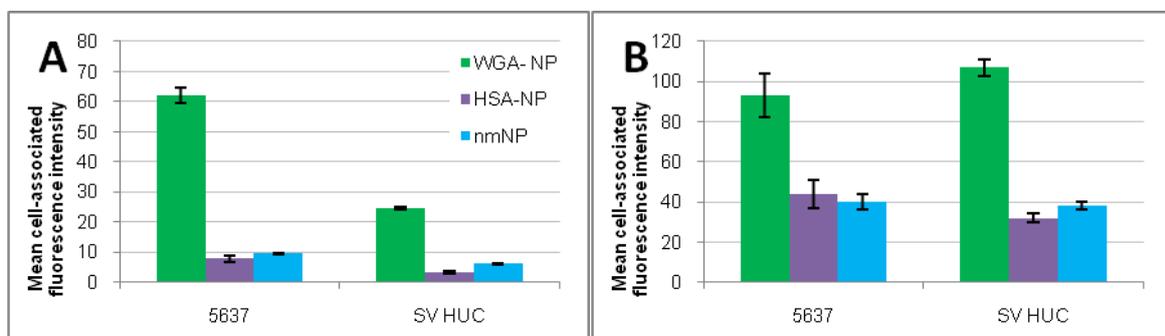


Fig.1: Particle-cell association for non-modified, HSA- and WGA-modified NP. SV-HUC and 5637 cells in single cell suspension (A) or monolayer culture (B) were incubated with nmNP, HSA-NP and WGA-NP at 4°C for 120 min. MFI was determined via flow cytometry (A) or in a fluorescence microplate reader (B)

Incubation parameters:

A: WGA-NP CH 95.1 (FI=1500), HSA-NP CH 95.2 (FI= 1500), nmNP CH 95 (FI=1500)

B: 5637: WGA-NP CH 95.1 (FI=1500), HSA-NP CH 95.2 (FI= 1400), nmNP CH 95 (FI=1580)

SV HUC: WGA-NP CH 95.1 (FI=1640). HSA-NP CH 95.2 (FI= 1500). nmNP CH 95 (FI=1700)

However, further studies indicated a notable difference in WGA-NP binding behavior depending on whether the assays were carried out with single cell suspensions or monolayer cultures. The clear preference of WGA-NP for 5637 cells could not be confirmed in monolayer assays, where the WGA-NP adhesion on carcinoma cells and non-carcinoma cells was found to be rather equal (Fig.1B).

Also, for SV-HUC the ratio between WGA-NP and HSA-NP or nmNP binding on monolayers was smaller than in single cell assays, which might either result from a higher amount of unspecific adhesion or from a reduced interaction capacity of the ligand-targeted NP (Fig.1B).

In order to enable use of the same batch of particles for a broader series of experiments, storage at -80°C was evaluated as a means of providing long term stability. To determine whether freezing the particle suspension leads to a change in critical parameters like size, PDI and Zeta potential, they were assessed prior to freezing and after defrosting. The table in Fig.2 shows the respective changes in size, PDI and Zeta potential of WGA-NP.

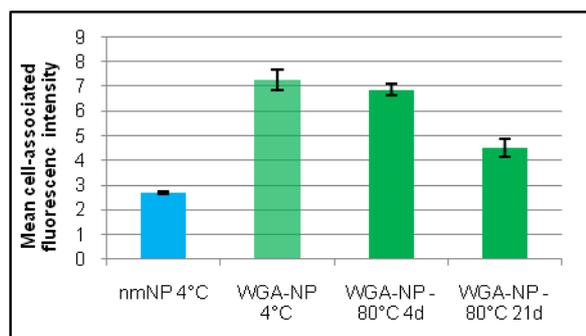


Fig.2: Storage stability of modified PLGA NP. Capacity of WGA-NP binding to single cells and effect of different storage types to the cell-adhesion are illustrated in the Figure. MFI of 5637 single cells in suspension incubated with WGA-NP and nmNP is compared as well as the impact of different kinds of WGA-NP storage on WGA-NP-single cell adhesion. WGA-NP CH 89.1, were stored frozen at -80°C for four or 21 days, WGA-NP CH 89.2 and nmNP CH 89 were kept at 4°C, prior to analysis. FI of WGA-NP CH 89.1 kept at -80°C for 21 days is 830, FI of all other NP was 900, MFI of single-cells in suspension was determined after 30 min of incubation with different types of NP at 4°C, 600000 5637 cells were accumulated for each measurement.

Timepoint	Size [nm]	PDI	Zeta potential [mV]
<b>Before freezing (CH 89.2)</b>	151.8±4.1	0.118±0.03	-31.8±2.4
<b>-80°C, 4d (CH 89.1)</b>	150.8±1.2	0.119±0.02	-29.3±1.2
<b>-80°C, 21d (CH 89.1)</b>	151.56±4.4	0.143±0.06	-23.8±1.9

Tab.3: Size, PDI and Zeta potential of WGA-NP batch 89.2 before freezing and WGA-NP batch 89.1 after storage at -80°C for 4 days and 21 days, respectively, are shown.

A single cycle of frosting and defrosting with storage at -80°C of up to four days was well tolerated, as there was hardly any difference to be detected in the physicochemical parameters of WGA-NP as well as the performance in cell binding assays.

Following 21 days of storage, PDI and Zeta potential had changed visibly, but were still within a suitable range to provide sufficient stability of the particle suspension.

However, according to single cell binding experiments, there was a definite loss in adhesion capacity of WGA-NP stored at -80°C for 21 days, although the MFI of cells incubated with WGA-NP was still clearly beyond the MFI of single-cells incubated with nmNP. Particle suspensions were thus used for experiments either immediately after preparation or following only short periods (up to 14 days) of storage at -80°C. In all cases, physicochemical parameters were checked immediately before the cell experiment to guarantee stability and uniform conditions.

### 3.3. Concentration - dependence of the NP-cell binding:

The impact of the NP concentration on cell binding was analyzed under both, single cell and monolayer conditions. For single cells, the previously observed binding preference for cancerous cells was found to strictly depend on concentration range. While there was no clear difference between SV-HUC and 5637 at lower particle concentrations, higher levels led to a pronounced contrast in surface adhesion (Fig. 3)

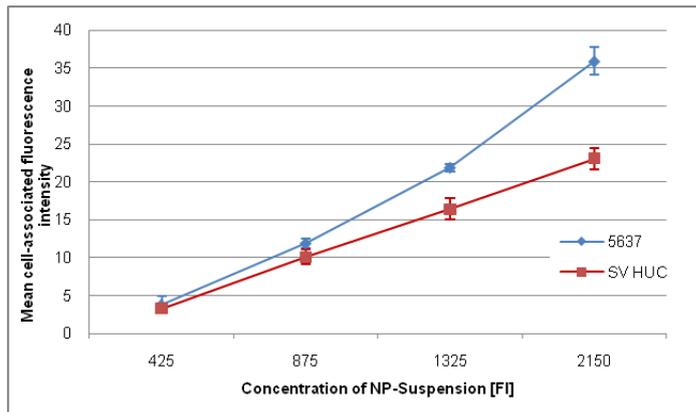


Fig.3:Concentration dependent single cell study at 4°C. MFI of 5637 and SV HUC single-cells in suspension at varying WGA-NP concentrations, after incubation for 30min at 4°C. Incubation parameters: WGA-NP CH 94.3.

WGA-NP	5637 [MFI]	k=[mean ΔFI/Δt]	SV HUC [MFI]	k=[mean ΔFI/Δt]
FI 2150	36±1.8	10.63	23±1.4	6.57
FI 1325	22±0.5		16±1.4	
FI 875	12±0.6		10±1	
FI 425	4±1.1		3±0.3	

Tab.4: MFI of single cells incubated with WGA-NP and slope of the concentration dependent binding curve, calculated from the corresponding regression line in Fig.3, are shown.

This may indicate that at the lower concentration range WGA-reactive sites at the cell surface of SV-HUC are far beyond saturation, while with rising particle concentration the number of free accessible binding sites is reduced more rapidly.

Thought malignant single-cells seem to have a better ligand-mediated adhesion to WGA-NP, which could be exploited for site-selective targeting; this effect vanished in monolayer cultures (Fig.4). Starting with the lowest concentration the healthy cell line incubated with WGA-NP had a higher MFI than the malignant one, which was the case throughout the entire concentration range. Moreover, the adhesion of nmNP to monolayer cultures is illustrated in dependence of concentration. By raising the concentration of nmNP, the increase of cell-associated MFI in monolayer culture was rather low as compared to WGA-NP.

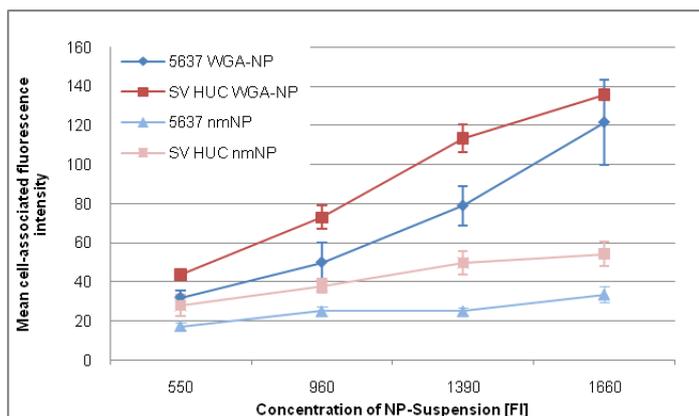


Fig.4: Concentration dependent monolayer study at 4°C. MFI of 5637 and SV HUC cell monolayers after incubation with different WGA-NP and nmNP concentrations for 90min at 4°C. Incubation parameters: WGA-NP CH 94.3/ nmNP CH 94.

5637	WGA-NP[MFI]	k=[mean ΔFI/Δt]	nmNP [MFI]	k=[mean ΔFI/Δt]
<b>FI 1660</b>	121.7±21.8	29.8	33.7±4.0	4.9
<b>FI 1390</b>	79.0±10.0		25.0±2.0	
<b>FI 960</b>	50.0±9.8		25.0±2.6	
<b>FI 550</b>	32.0±3.2		17.3±2.1	
<b>SV HUC</b>				
<b>FI 1660</b>	135.7±2.9	31.63	54.3±6.4	9.07
<b>FI 1390</b>	113.3±7.1		49.7±6.0	
<b>FI 960</b>	73.0±6.0		38.0±3.6	
<b>FI 550</b>	43.7±0.6		28.0±5.3	

Tab.5: MFI of single cells incubated with WGA-NP and slope of the concentration dependent binding curve, calculated from the corresponding regression line in Fig.4, are shown.

However, there is still a significant difference in MFI between monolayers incubated with WGA-NP and those incubated with nmNP, which points towards specific binding of WGA-NP also in monolayer culture. Corresponding to the binding observed for WGA-NP, the healthy cell line also shows a higher nmNP binding as compared to the malignant one (Fig.4). Interestingly, due to the run of the curve in case of cells incubated with WGA-NP, no saturation was detected even at the highest WGA-NP concentration used (Fig.3, Fig.4).

### 3.4. Specificity of the NP-cell binding

In order to elucidate whether the difference in binding capacity between WGA-NP, HSA-NP and nmNP is due to a higher ligand-mediated adhesion via WGA or if there are other factors of influence, the binding specificity was determined via competitive inhibition with N,N',N''- Triacetylchitotriose. The complementary carbohydrate was added in increasing amounts (0-2 μmol/100 μl) to the single cells in suspension prior to WGA-NP. The respective inhibition curves are shown in Figure 5.

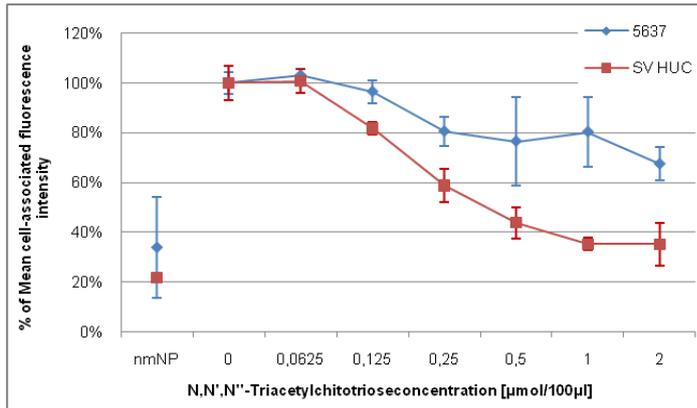


Fig.5: Specificity of the WGA-NP - single cell adhesion. MFI of single-cell suspensions of 5637 and SV HUC incubated with WGA-NP, after adding varying concentrations of N,N',N''-Triacetylchitotriose (in PBS (+ Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>)pH 7.4) to the suspension in order to allow competitive inhibition. Cells were incubated for 30 min at 4°C. Incubation parameters: 5637: WGA-NP CH 96.1 (FI= 1700); nmNP: CH 96 (FI= 1700) SV HUC: WGA-NP CH 95.1 (FI= 1700); nm NP: CH 95 (FI= 1800)

The ligand-mediated adhesion of WGA-NP to both cell lines could be significantly inhibited, though to a different extent.

The malignant cell line (5637) revealed a specific binding rate of at least 33%, while the non-malignant SV HUC seemed to have a specific binding rate that is at least twice as high. For both cell lines, there was still a significant difference between the level of inhibition at 2 µmol/100 µl and the basal value for nmNP. However, due to increasing medium viscosity it was not possible to use higher inhibitor concentrations without changing assay conditions. Thus, the maximum value of inhibition probably was not reached within the concentration range tested, especially in case of 5637 cells.

### 3.5. Time dependence of the particle-cell interaction

To gain more detailed information on the particle-cell interaction and to evaluate the potential for clinical applicability, time dependence of the WGA-NP and nmNP adhesion to single cells and monolayers was assessed. As to the single cells, for both cell types saturation of WGA-NP and nmNP binding was reached very rapidly within only 15min of incubation (Fig.6).

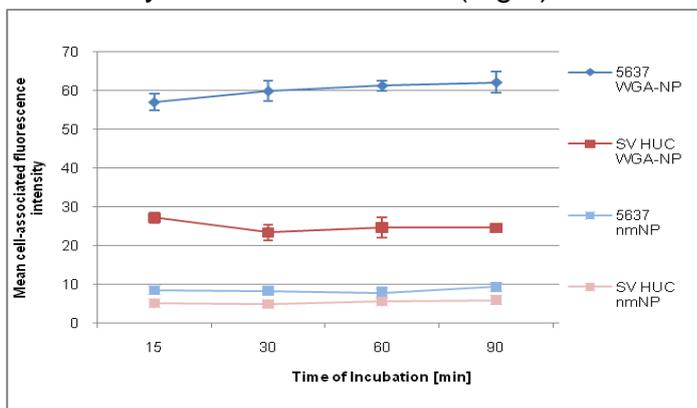


Fig.6: Time dependent single cell study at 4°C. 5637 and SV HUC single cells were incubated with WGA-NP or nmNP for various periods of time at 4°C followed by fluorescence analysis. Incubation parameters: WGA-NP CH 95.1 (FI=1500), nmNP CH 95 (FI=1500)

Again, the malignant cell line had a twofold higher WGA-NP affinity as the healthy one, though the nmNP binding was similar for both cell lines. The ratio between modified WGA-NP and nmNP was 6:1 for 5637 cells. In case of SV-HUC single cells this ratio amounted to 3:1. The experiment was repeated with malignant and non-malignant monolayers at 4°C and 37°C, respectively (Fig.7, Fig.8).

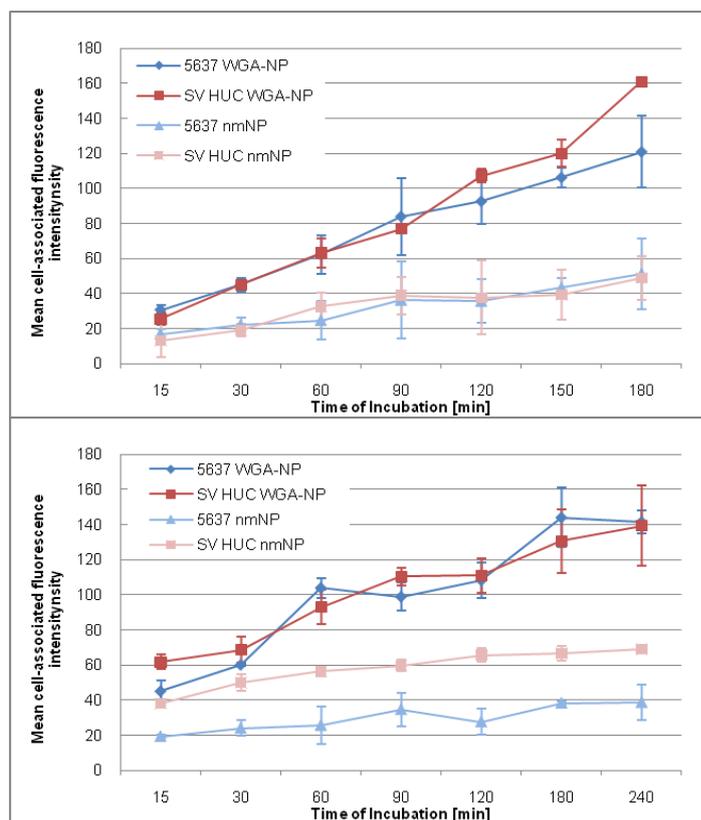


Fig.7: Time dependent monolayer study at 4°C. 5637 and SV HUC monolayers were incubated with WGA-NP or nmNP for various periods of time at 4°C followed by fluorescence analysis. Incubation parameters: 5637: WGA-NP CH 95.1 (FI=1500), nmNP CH 95 (FI=1580) SV HUC: WGA-NP CH 95.1 (FI=1640), nmNP CH 95 (FI=1700)

Fig.8: Time dependent monolayer study at 37°C. MFI of 5637 and SV HUC monolayers after incubation with WGA-NP or nmNP for various periods of time at 37°C. Incubation parameters: 5637: WGA-NP CH 96.1 (FI=1800), nmNP CH 96 (FI=1700) SV HUC: WGA-NP CH 95.1 (FI=1400), nmNP CH 95 (FI=1350)

Monolayer	k=[mean ΔFI/Δt]		Monolayer	k=[mean ΔFI/Δt]	
5637	4°C (Fig.7)	37°C (Fig.8)	SV HUC	4°C (Fig.7)	37°C (Fig.8)
WGA-NP	15.14	16.43	WGA-NP	21.46	13.39
nmNP	5.6	3.16	nmNP	5.49	4.8

Tab.6: Slopes of the time dependent binding curves, calculated from the corresponding regression lines, are shown

Independent of the temperature setting, more time was necessary to reach equilibrium as compared to the single cells. This differing behavior might be due to a higher quantity or better accessibility of WGA-reactive sites under these assay conditions. At 4°C, metabolically inactive cells grown as monolayer and incubated with WGA-NP led to more or less the same MFI data for both cell lines being at least twice as high as the MFI of monolayers incubated with nmNP. In fact, no clear sign of

saturation was detected for WGA-NP binding within an assay time of up to 240 min. Interestingly, also the amount of unspecific binding (nmNP) to monolayers increased slightly with time. At physiological temperatures, the overall binding level of WGA-NP and nmNP to malignant and healthy monolayers was also similar (Fig.8). However, the onset of WGA-mediated NP adhesion seems to be faster for healthy than for malignant cells. Also, SV-HUC cell monolayers showed a nmNP binding ratio twice as high as compared to malignant cells.

The time-dependent adhesion in monolayer cultures was confirmed by fluorescence microscopy, where increasing amounts of cell-associated NP could be clearly visualized after prolonged incubation (Fig.9).

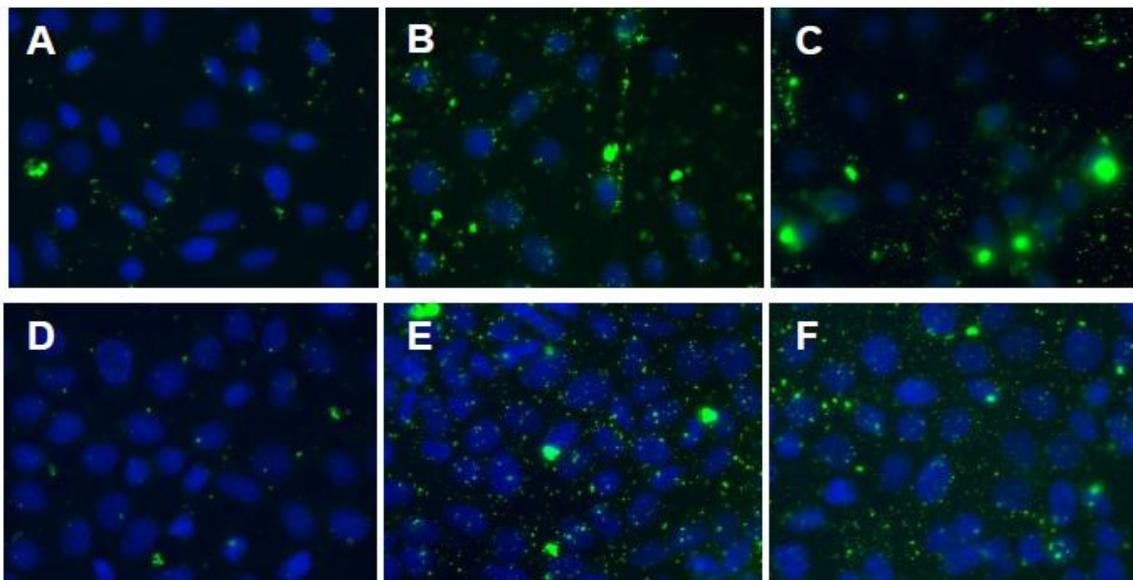


Fig.9:5637 and SV HUC monolayers after incubation with WGA-NP (green) for different time periods; cell nuclei (blue) were counterstained with Hoechst 33342. *A* shows a 5637 monolayer, *D* a SV HUC monolayer incubated for only 15 min at 4°C. The monolayers in *B/E* and *C/F* were incubated with WGA-NP for 120 min at 4°C and 37°C, respectively. After incubation all monolayers were washed with iso-HEPES/NaOH pH 7.4 three times and then cells were fixed with paraformaldehyd. Exposure time and imaging conditions were kept stable to allow for direct comparison.  
Incubation parameters:  
WGA-NP CH 96.1 (FI=720)

### 3.6 Stability of the surface association of NPs

In order to assess the stability of NP binding once they adhered to the cell surface, a pulse-chase experiment was carried out comprising initial loading of the cells with WGA-NP, thorough washing and subsequent monitoring of MFI over time.

Experiments were carried out at 4°C for an isolated characterization of surface

adhesion phenomena without influence of dynamic processes such as endocytotic uptake or membrane reorganization.

After chase incubation for one hour and two additional washing steps, there was only a minor loss in MFI for monolayers incubated with WGA-NP (Fig.10). These results are also visualized in Fig.11, which illustrates the amount and distribution of WGA-NP bound to the cell monolayer at end of the experiment.

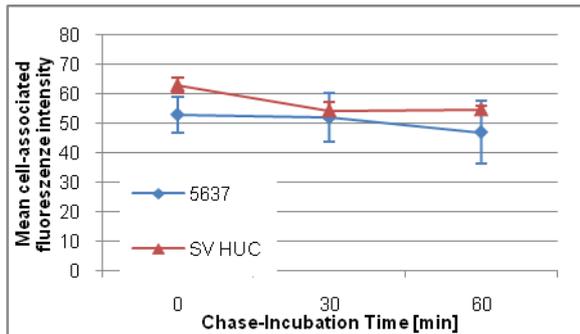


Fig.10: Pulse-chase incubation of 5637 and SV HUC monolayers with WGA-NP. Monolayers were incubated with WGA-NP for 60 min at 4°C and washed three times with HEPES/NaOH pH 7.4 before assessing the MFI of the monolayers (0 min). Chase incubation was carried out at 4°C for 30 min (30 min) and 60 min (60 min), respectively, followed by two washing steps with HEPES/NaOH pH 7.4 prior to fluorescence analysis. Incubation parameters:  
5637: WGA-NP CH 95.1 (FI=1500)  
SV HUC: WGA-NP CH 95.1 (FI=1640)

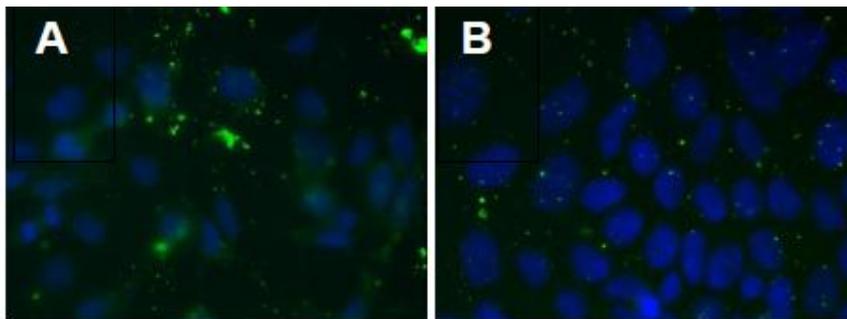


Fig.11 Pulse-chase experiment carried out with 5637 (A) and SV HUC (B) monolayers at 4°C. Cells were incubated with WGA-NP for 120 min at 4°C and washed three times with 20 mM HEPES/NaOH pH 7.4. Chase incubation was carried out for 120 min, cells were washed with 20 mM HEPES/NaOH pH 7.4 every 30 min. Finally, the cells were fixed with paraformaldehyd and cell-nuclei were stained blue with Hoechst 33342, BOD marked WGA-NP green. Exposure time and imaging conditions were kept stable to allow for direct comparison. Incubation parameters:  
WGA-NP CH 96.1 (FI=720)

#### 4. Discussion

Over the past years it was possible to improve treatment and results for many cancer-types, in bladder cancer there are still three big, unsolved problems: recurrence, progression and mortality [6; 7]. Adjuvant intravesical therapy has been effective in prolonging recurrence-free periods after resection of non-muscle-invasive cancer, especially when applied directly after the operation. However, options are still limited and many new concepts with aim of improving treatment impact by enhancing the urothelial bioavailability are tested. In the present study, we report on lectin-modified nanoparticles as a possibility to deliver pharmaceutically active agents more specifically and with increased residence time to the site of disease.

To enable the testing of the same batch of NP in several consecutive cell assays, it was necessary to guarantee similar conditions over an extended period of time. However, because of aggregation, WGA-NP suspensions were found to have a limited stability at 4°C, ranging to no more than three days. Finding a suitable storage possibility was thus of primary importance. It was shown that WGA-NP could be kept at -80°C and defrosted before use for a storage time of about two weeks without loss of functionality, as illustrated in Fig.2. After this period of time, binding capacity decreased to some extent, though it was still twice as high as the adhesion level of nmNP.

After optimizing the preparation and storage parameters for WGA-NP, the receptor-mediated binding to urothelial cells had to be validated in order to proof successful surface modification. As shown in Fig.1A, plain and surface-modified NP displayed a diverse binding behavior. Moreover, an evident difference in WGA-NP binding between healthy and cancerous single cells was observed. Thus, there might either be a quantitative excess of WGA-reactive carbohydrate moieties at the surface of malignant cells as compared to SV-HUC, or significant differences regarding lectin affinity for the respective carbohydrate residues expressed at the surface. Also, a different rate of sterical accessibility might contribute to the observed binding behavior. With regard to the single cell level, a certain targeting effect with preferential binding to cancerous tissue may thus be achievable via WGA.

However, this selective interaction could not be confirmed with monolayer samples, where the WGA-NP-cell interaction was rather similar for both cell lines. In addition, a significantly stronger unspecific adhesion of nmNP and HSA-NP was found (Fig.1B).

It is likely that the accessibility of WGA binding sites in case of monolayers is altered as compared to single cells, either because of an inhomogeneous distribution between the apical and basolateral side or due to steric obstruction. This effect seemed to be more pronounced for cancerous cells, as indicated by the shift between specific (WGA-NP) and unspecific (nmNP, HSA-NP) binding.

Due to the positive effect of WGA-modification on the particle-cell interaction, the binding process was characterized with respect to the impact of particle concentration to further evaluate the concept of receptor mediated adhesion. In single cell state, equal binding was assessed for both cell lines at low WGA-NP concentrations. However, for higher concentrations distinct differences in surface adhesion became visible (Fig.3). This might be due to the fact that enough WGA-reactive sites are available on both cell lines at lower concentrations, while gradual saturation occurs with higher concentration, which happens faster for healthy cells due to an overall lower number of lectin combining sites.

In monolayer state (Fig.4), the amount of surface-associated NP was shown to rise in parallel with particle concentration. For nmNP, only a marginal increase of cell adhesion was observed over the concentration range tested. However, no signs of saturation for the WGA-NP-cell adhesion could be observed under any of the test conditions, indicating that there were still free WGA combining sites available in case of both cell lines even at the highest concentration.

Competitive inhibition assays were used to further confirm that the differences in WGA-NP, HSA-NP and nmNP binding are due to differences in specificity of the interaction, and to gain more information about a potential contribution of the (unspecific) particle matrix to surface adhesion (Fig.5). At this, competitive inhibition with N,N',N''- Triacetylchitotriose revealed a higher remaining binding value of WGA-NP for 5637 cells as compared to SV-HUC. While the applied amount of competitor seemed to be sufficient to reduce the SV-HUC/WGA interaction to a nearly basal level, 5637 single cells are likely to present more accessible receptors and thus would require higher concentrations of N,N',N''- Triacetylchitotriose to reach complete inhibition. However, due to rising medium viscosities at higher carbohydrate concentrations it was not possible to test this without altering the assay conditions. Of course, 5637 cells might also have a higher tendency for unspecific adhesion, but this seems unlikely when comparing the results to the nmNP binding data.

Applicability of the particulate delivery system in the setting of an instillative treatment would rely on the establishing of particle-cell binding within a timeframe of approximately 120 min in order to avoid rapid washout. It was thus critical to check for the time course of the lectin-mediated cell interaction.

Single cells in suspension were shown to require only a very short time (<15 min) to reach full equilibrium, hinting towards very easily accessible WGA binding sites under these conditions (Fig.6). In contrast, the amount of WGA-NP bound to monolayers increased gradually over a period of 180 min at 4°C and 37°C, respectively, suggesting a diverse distribution/accessibility of WGA-binding sites or some kind of steric obstruction (Fig.7, Fig.8). Despite a slightly faster establishing of the binding equilibrium at 37°C, the same final levels of cell association were reached over time, independent of temperature.

As already observed in preceding experiments, unspecific binding was similar for both cell lines in the single cell level, while SV-HUC had higher unspecific adhesion when tested in monolayer configuration (Fig.8). This could also be due to an altered membrane configuration under these conditions. Incubation of particle-loaded monolayers over time which was carried out at 4°C to exclude influence of metabolic processes revealed a stable surface adhesion of particles once associated with the surface.

## 5. Conclusion

As results for WGA-NP adhesion on monolayers of both, malignant and non-malignant cell lines are similar, a use of WGA-modified nanoparticles for instillative chemotherapy in non-muscle-invasive bladder cancer seems, in this moment, unlikely. However, in general, WGA-mediated cell binding compared to unspecific association of non-modified NP was more superior than expected. Thus, usage of WGA-decorated nanoparticles as drug deposits, to prolong residence time of the active ingredient in local bladder therapy (e.g. for cystitis) would be imaginable.

## 6. References

**[1]** Sexton WJ, MD, Wiegand LR, MD, Correa JJ, MD, Politis C, MD, Dickson SI, MD, and Kang LC, MD:

Bladder cancer: A Review of Non-Muscle Invasive Disease.

Canc Cont, 2010; 17: 256-268

**[2]** vom Dorp F, Tschirdewahn S, Rübber H, Jocham D:

Nicht Muskelinvasives Urothelcarcinom: Ist die Anwendung von BCG noch notwendig?

Urologe, 2010; 49: 1274-1276

**[3]** Arianayagam R, Arianayagam M, Rashid P:

Bladder cancer-current management.

Austr Fam Physic, 2011; 40: 209-213

**[4]** Scholz M, Bucher A, De Santis M, Klimpfinger M:

Leitlinie Blasenkarzinom.

J Urol u Urogynäk, 2010; 17: 23

**[5]** Khandelwal P, Abraham SN, Apodaca G:

Cell biology and physiology of the uroepithelium.

Am J Physiol Renal Physiol, 2009; 297: 1477-1501

**[6]** Malmström PU:

Bladder Tumors: Time for a Paradigm Shift?

Biju Int, 2011; 107: 1543-1548

**[7]** De Nunzio C, Carbone A, Albisinni S, Alpi G, Cantiani A, Liberti M, Tubaro A, Iori F:

Long-term experience with early single Mitomycin C instillations in patients with low-risk non-muscle-invasive Bladder cancer: prospective, single centre randomized trial.

World J Urol, 2011; 29: 517-521

**[8]** Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Plaou J, Roupret M: Guidelines on non-muscle invasive bladder cancer.

Eur Urol, 2011; 59: 584-594

**[9]** Engel RP, Withjes JA:

Perioperativ instillation therapy in superficial bladder cancer: is it effective regarding outcome and costs?

Curr Opin Urol, 2009; 19: 511-515

**[10]** Sievert KD, Amend B, Nagele U, Schilling D, Bedke J, Horstmann M, Hennenlotter J, Kruck S, Stenzl A:

Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs?

World J Urol, 2009; 27: 295-300

**[11]** Sylvester R:

Bacillus Calmette-Guerin treatment of non-muscle invasive bladder cancer - review article.

Int J Urol, 2011; 18: 113-120

**[12]** Pineiro, Ojea A, Portillo J, Montesinos M, Gonzalez M, Pertusa C, Rodriguez-Molina J, Camacho JE, Rabadan M, Astobieta A, Isorna S, Muntanola P, Gimeno A, Blas M, Martinez-Pineiro JA, Fernandez-Gomez J, Madero R, Solsona E, Unda M, Martinez L:

The EORTC Tables Overestimate the risk of recurrence and progression in patients with non-muscle invasive bladder cancer treated with Bacillus Calmette-Guerin: External Validation of the EORTC risk tables.

Eur Urol, 2011; 60: 423-430

**[13]** Lelivled AM, Bastiaannet E, Doornweerd BHJ., Schaapveld M, de Jong IJ:

High Risk Bladder Cancer: Current Management and Survival.

Int Braz J Urol, 2011; 37: 203-10

**[14]** Gore JL, MD, MS, Porter MP, MD, MS:

Patterns of Questionable Quality Care in Nonmuscle Invasive Bladder Cancer.

Cancer, 2010; 116: 2508-2510

**[15]** Lerner SP, Grossman HB, Messing EM et al:

BCAN think tank session 3: prevention of bladder cancer.

Urol Oncol, 2010; 28: 338

**[16]** Shen Z, Shen T, Wientjes MG et al:

Intravesical treatments of bladder cancer: review.

Pharm Res, 2008; 25: 1500

**[17]** Bilensoy E, Sarisozen C, Esendagli G et al:

Intravesical cationic nanoparticles of chitosan and polycaprolactone for the delivery of mitomycin C to bladder tumors.

Int J Pharm, 2009; 371: 170-176

**[18]** Le Visage C, Rioux-Leclercq N, Haller M et al:

Efficacy of paclitaxel released from bio-adhesive polymer microspheres on model superficial bladder cancer.

J Urol, 2004; 171: 1324

**[19]** Witjes A, Hendricksen K:

Intravesical pharmacotherapy for non-muscle-invasive bladder cancer: a critical review of currently available drugs, treatment schedules, and long-term results.

Eur Urol, 2008; 53: 45

**[20]** Di Stasi SM, Giannantoni A, Stephen RL et al:

Intravesical electromotive mitomycin C versus passive transport mitomycin C for high risk superficial bladder cancer: a prospective randomized study.

J Urol, 2003; 170: 777

**[21]** Pinthus JH , Bogaards A, Weersink R et al:

Photodynamic therapy for urological malignancies: past to current approaches.

J Urol, 2006; 175: 1201

**[22]** Ohyama C:

Glycosylation in bladder cancer.

Int J Clin Oncol, 2008; 13: 308

**[23]** Liebert M, Gebhardt D, Wood C et al:

Urothelial differentiation and bladder cancer.

Adv Exp Med Biol, 1999; 462: 437

**[24]** Neusch L, Plattner VE, Polster-Wildhofen S, Zidar A, Chott A, Borchard G, Zechner O, Gabor F, Wirth\* M:

Lectin-mediated Biorecognition as a Novel Strategy for Targeted Delivery to Bladder Cancer.

J Urol., Elsevier, 2011; in press

**[25]** Fillafer C, Friedl DS, Ilyes AK, Wirth M, Gabor F:

Bionanoprobes to study particle-cell interactions.

J Nanosci Nanotechnol, 2009; 9: 3239

## 7. Abrevationes and Acronyms:

NMIBC= Non-muscle invasive bladder cancer

BCG= Bacillus Calmette-Guerin

WGA= Wheat germ agglutinin

HAS= Human serum albumin

PLGA= Poly(lactic-co-glycolic acid)

BOD= 4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (Bodipy®)

NHS= N-hydroxysuccinimide

EDAC= 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide

HEPES/NaOH pH 7.4= 20 mM HEPES/NaOH pH 7.4 buffer

HEPES/NaOH pH 7.0= 20 mM HEPES/NaOH pH 7.0 buffer

Iso HEPES/NaOH, pH 7.4 = isotonic 20 mM HEPES/NaOH pH 7.4 buffer

HEPES/NaOH pH 7.0 with 0.1% Pluronic® F-68= 20 mM HEPES/NaOH pH 7.0 0.1% Pluronic® F-68 buffer

HEPES/NaOH pH 7.4 with 0.1% Pluronic® F-68= 20mM HEPES/NaOH pH 7.4, 0.1%Pluronic® F-68 buffer

PBS (+ Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>), pH 7.4= PBS containing Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, pH 7.4 buffer

PDI= Polydispersityindex

NP= Nanoparticles

nmNP= non-modified Nanoparticles

WGA-NP= Nanoparticles modified with Wheat germ agglutinin

HSA-NP= Nanoparticles modified with Human serum albumin

FI= fluorescence intensity

MFI= Mean fluorescence intensity

PBS (+ Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) pH 7.4, + BSA 1%= PBS containing Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>, BSA 1%, pH 7.4

BSA= Bovine serum albumin

## ANHANG B:

### ERGÄNZUNGEN ZUR PUBLIKATION

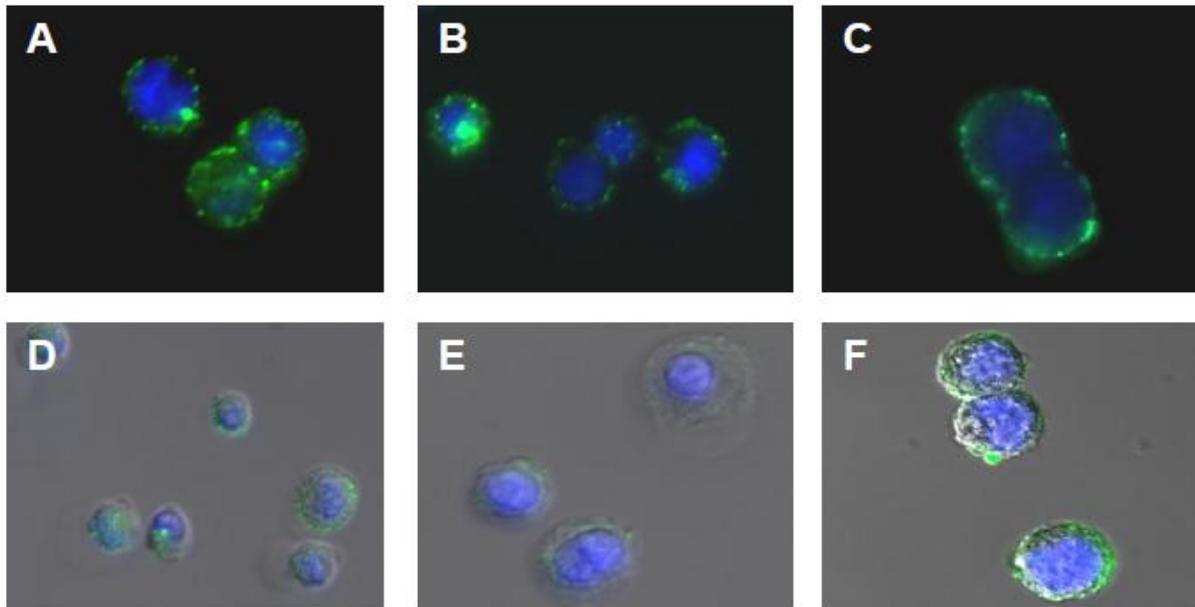


Fig.1.: Fluorescence-microscopic analysis of particle-cell interaction on SV-HUC (A, D), 5637 (B, E), and HT-1376 (C, F) single cells. Cells were incubated with WGA-NP in PBS (+  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) for 30 min at 4°C (A, B, C) washed to remove unbound particles, and then either fixed in PFA (2% in PBS) to monitor surface loading or incubated for 60 min at 37°C (D, E, F) to check for stable adhesion and potential internalization. Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 in parallel to particle incubation. Exposure time and other imaging parameters were kept stable to allow for direct comparison.

Incubation parameters:

SV-HUC, 5637, HT 1376: WGA-NP CH 96.1 (FI=1200)

## **ANHANG C:**

### **PARTIKELHERSTELLUNG – VORVERSUCHE**

Nanopartikel als Carrier für Arzneistoffe sind im Bereich des Drug-Targeting ein vielversprechendes Konzept für die Umsetzung zielgerichteter Therapien. So ist es möglich, den Arzneistoff in die Partikel einzubauen und anschließend die Partikeloberfläche zu modifizieren, um die Bindung an Rezeptoren in bestimmten Geweben bzw. eine Anreicherung an den Zielzellen zu ermöglichen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Nanopartikel wurden aus PLGA mit Hilfe eines Solvent-Evaporation (Lösungsmittelverdampfungs-) Verfahrens hergestellt. Dazu musste in Vorversuchen unter anderem evaluiert werden, welche Pluronic® F-68 Konzentration in der inneren bzw. äußeren Phase eingesetzt werden sollte, um danach eine stabile Kopplung zu erzielen. Darüber hinaus wurde untersucht, welchen pH und welche Pluronic® F-68 Konzentration der Puffer zum Aufreinigen und Lagern haben sollte.

Die allgemeine Vorschrift zur Herstellung der Partikel ist in Anhang A, Punkt 2.3 angeführt. In den Voruntersuchungen wurde zunächst die optimale Pluronic® F-68 Konzentration ermittelt.

Pluronic® F-68 ein amphiphiles Tensid, das sich an die Oberfläche der Partikel anlagert, wodurch die Suspension stabilisiert und eine Aggregation der NP verhindert wird, wenn das Tensid in entsprechender Menge verwendet wird. Während zu geringe Stabilisatorkonzentrationen sehr rasch zu Partikelaggregaten führen, besteht bei zu hoher Pluronic® F-68 Konzentrationen die Gefahr, dass die anschließende Oberflächenmodifikation sterisch behindert wird [15]. Für die Chargen CH 84, CH 85 und CH 86 wurden in der äußeren und inneren Phase vergleichsweise hohe Pluronic® F-68 Mengen verwendet (Tab.1).

Name	Innere Phase (6 ml)	Äußere Phase (100 ml)	Puffer zum Modifizieren	Hinweis
CH 84	10% wässrige Pluronic® F-68-Lösung	1% wässrige Pluronic® F-68-Lösung	20 mM HEPES/NaOH pH 7,4, 0,5% Pluronic® F-68 Puffer	Nicht WGA-modifiziert
CH 85	10% wässrige Pluronic® F-68-Lösung	1% wässrige Pluronic® F-68-Lösung	20 mM HEPES/NaOH pH 7,4, 0,5% Pluronic® F-68 Puffer	
CH 86	7% wässrige Pluronic® F-68-Lösung	1% wässrige Pluronic® F-68-Lösung	20 mM HEPES/NaOH pH 7,4, 0,5% Pluronic® F-68 Puffer	
CH 87.1 /CH 88.1	3% wässrige Pluronic® F-68-Lösung	0,1% wässrige Pluronic® F-68-Lösung	20 mM HEPES/NaOH pH 7,4, 0,1% Pluronic® F-68 Puffer	
CH 87.2	3% wässrige Pluronic® F-68-Lösung	0,1% wässrige Pluronic® F-68-Lösung	20 mM HEPES/NaOH pH 7,4, 0,05% Pluronic® F-68 Puffer	Es kam sehr schnell zu starker Aggregatbildung
CH 89 – CH 96	3% wässrige Pluronic® F-68-Lösung	0,1% wässrige Pluronic® F-68-Lösung	20 mM HEPES/NaOH pH 7,0, 0,1% Pluronic® F-68 Puffer bis zur EDAC- und NHS- Zugabe, danach wurde 20 mM HEPES/NaOH pH 7,4, 0,1% Pluronic® F-68 Puffer verwendet.	

Tab.1: : Zusammenfassung der Unterschiede in der Herstellungsweise der Nanopartikel.

Dies führte dazu, dass diese Partikel 30-70 nm kleiner waren als die der Partikelchargen CH 87 – CH 96 (Tab.2).

Name	Größe [nm]	PDI	Zeta-Potential [mV]
CH 84	135,40 ± 0,14	0,136 ± 0,002	-45,9 ± 1,7
CH 85	103,13 ± 0,87	0,092 ± 0,002	-41,2 ± 2,6
CH 86	128,45 ± 2,90	0,097 ± 0,025	-36,1 ± 0,2
CH 87	163,56 ± 2,77	0,087 ± 0,017	-41,7 ± 2,9
CH 88	174,70 ± 0,00	0,108 ± 0,012	-42,5 ± 1,9
CH 89	152,45 ± 3,09	0,091 ± 0,017	-33,2 ± 4,7
CH 93	189,67 ± 3,77	0,127 ± 0,010	-50,0 ± 1,8
CH 94	175,63 ± 4,16	0,106 ± 0,017	-45,3 ± 3,9
CH 95	185,68 ± 8,33	0,142 ± 0,026	-48,2 ± 4,0
CH 96	184,88 ± 3,02	0,129 ± 0,014	-52,2 ± 0,6

Tab.2: Größe, PDI und Zeta-Potential aller nicht modifizierter Nanopartikel, die hergestellt wurden.

In orientierenden Zellbindungsstudien konnte überdies gezeigt werden, dass für CH 85 und CH 86 eine Modifikation mit WGA nicht möglich war (Abb1).

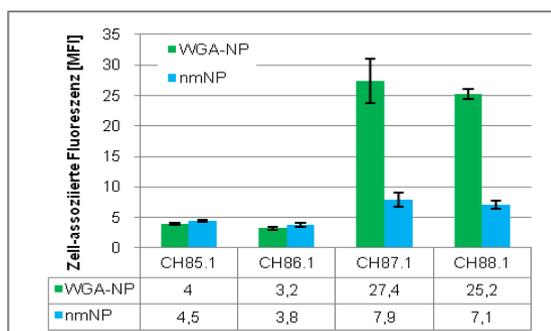


Abb.1: Zell-assoziierte Fluoreszenz von Einzelzellen nach der Inkubation mit WGA-NP oder nmNP, um zu überprüfen, ob eine WGA-Kopplung stattgefunden hat. Die Zellsuspensionen wurden 30 min bei 4°C mit der entsprechenden NP-Suspension inkubiert. Danach wurden ungebundene Partikel entfernt und die Probe flowcytometrisch analysiert. Inkubationsparameter: HT 1376: WGA-NP CH 85.1 (FI=3000), CH 86.1 (FI=1500), CH 87.1 (FI=2700), nmNP CH 85 (FI=3000), CH 86 (FI=1800), CH 87 (FI=2700) 5637: WGA-NP CH 88.1 (FI=1800), nmNP CH 88 (FI= 2000)

Durch Senken der Pluronic® F-68-Konzentration ab CH 87 (Tab.1) konnte dieses Problem behoben und WGA erfolgreich an die Partikel gekoppelt werden. Bei CH 87.2 war der Anteil an Pluronic® F-68 jedoch vermutlich zu gering, sodass sich binnen kürzester Zeit Partikelaggregate bildeten (Tab.3).

Name	Modifikation	Größe [nm]	PDI	Zeta-Potential [mV]
CH 85.1	WGA	106,5 ± 1,84	0,12 ± 0,012	-25,6 ± 1,34
CH 86.1	WGA	140,2 ± 9,84	0,12 ± 0,013	-30,9 ± 1,37
CH 87.1	WGA	222,8 ± 53,29	0,165 ± 0,057	-28,9 ± 5,1
CH 87.2	WGA	576,4 ± 138,8	0,82 ± 0,024	-13,0 ± 1,2
CH 88.1	WGA	256 ± 30,94	0,214 ± 0,071	-31,7 ± 5,3
CH 87.1	WGA	222,84 ± 53,29	0,165 ± 0,057	-28,9 ± 5,1
CH 87.3	WGA	180,28 ± 7,78	0,142 ± 0,012	-32,5 ± 2,9
CH 87.4	WGA	166,53 ± 1,96	0,138 ± 0,031	-37,9 ± 0,8
CH 88.1	WGA	255,99 ± 30,94	0,214 ± 0,071	-31,7 ± 5,3
CH 89.1	WGA	160,37 ± 23,86	0,156 ± 0,069	-27,8 ± 6,7
CH 89.2	WGA	155,40 ± 5,41	0,126 ± 0,014	-27,4 ± 2,4
CH 89.3	WGA	168,85 ± 7,39	0,110 ± 0,014	-29,4 ± 3,2
CH 89.4	WGA	184,16 ± 23,7	0,148 ± 0,055	-29,3 ± 5,8
CH 93.1	WGA	213,12 ± 15,88	0,178 ± 0,025	-34,1 ± 0,9
CH 94.2	WGA	220,58 ± 15,47	0,144 ± 0,028	-33,7 ± 3,2
CH 94.3	WGA	248,28 ± 38,63	0,194 ± 0,083	-28,8 ± 5,8
CH 95.1	WGA	205,96 ± 15,67	0,171 ± 0,036	-32,6 ± 4,4
CH 95.2	HSA	220,29 ± 65,31	0,180 ± 0,051	-37,4 ± 4,5
CH 96.1	WGA	246,02 ± 17,4	0,174 ± 0,049	-31,3 ± 3,0

Tab.3: Größe, PDI und Zeta-Potential aller mit WGA und HSA modifizierter Nanopartikel, die hergestellt wurden.

Eine weitere Anpassung im Herstellungsprozess wurde dahingehend vorgenommen, dass bei CH 89.1 für den ersten Schritt der WGA-Modifikation (bis zum Zusatz von NHS und EDAC) HEPES/NaOH pH 7,0 + 0,1% Pluronic® F-68 anstelle von HEPES/NaOH pH 7,4 + 0,1% Pluronic® F-68 verwendet wurde. Auf diese Weise sollte eine optimale Aktivierung der Carboxyl-Gruppen ermöglicht werden.

Ein Hinweis auf die erfolgreiche WGA-Kopplung ist die Größenzunahme nach erfolgter Modifikation, die beispielsweise bei CH 87.1 und CH 88.1 beobachtet werden konnte (Tab.2; Tab.3). Diese konnte aber nicht generell beobachtet werden.

Der Erfolg der Oberflächenmodifikation mit WGA konnte im Zellversuch bestätigt werden. Wie aus Abb1 ersichtlich, war bei CH 85.1 und CH 86.1 die Bindung der WGA-NP an Einzelzellen in etwa gleich stark wie die Adhäsion der nmNP CH 85 und CH86. CH 87.1 und CH 88.1 führten verglichen mit den Ausgangspartikeln jedoch zu einer deutlich erhöhten Zellbindung. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der mit WGA-NP inkubierten Einzelzellen war hier dreimal höher als die MFI der mit nmNP inkubierten Zellen.

## **ANHANG D:**

### **PARTIKEL/ZELL-INTERAKTION BEI HT 1376**

In Ergänzung zu gesunden Blasen­zellen (SV HUC) und Krebs­zellen mit niedrigem Malignitäts­grad (5637) sollte auch die Interaktion zwischen WGA-NP und stärker mutierten Zellen evaluiert werden. Aus diesem Grund wurden Untersuchungen mit HT 1376 Zellen durchgeführt.

Die HT 1376 Zelllinie wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellen (DSMZ, Braunschweig, Germany) bezogen. Die Kultivierung erfolgte unter Standardzellkulturbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Luftfeuchtigkeit) in DMEM Medium (Invitrogen; USA), wobei dem Medium 20% fetales Kälberserum sowie 2 mM L-glutamin und 5 ml einer 10 µg/ml Penicillin/Streptomycin – Lösung zugesetzt wurden. Für die Untersuchungen wurde Zellen zwischen Passage 14 und 39 eingesetzt.

Falls nicht gesondert erwähnt, wurden die Versuche analog zu den Angaben in Anhang A, Punkt 2.3 durchgeführt.

#### Bindungskapazität

Zunächst wurde untersucht, ob die zelluläre Adhäsion von WGA-NP sich von der der nmNP unterscheidet. Die Analyse der Einzelzellen erfolgte flowcytometrisch, wobei die MFI von 1000 Zellen bestimmt wurde.

Wie aus Abb.1A ersichtlich, ist die MFI der mit WGA-NP inkubierten Einzelzellen des höheren Malignitäts­grades (HT 1376) achtmal so hoch wie bei nmNP. Um auszuschließen, dass eine Veränderung an den vorwiegend hydrophoben Eigenschaften der NP-Oberfläche, hervorgerufen durch die Modifikation, zu der verstärkten Bindung von WGA-NP an Einzelzellen geführt hat, wurden parallel auch NP mit HSA modifiziert und getestet. Da diese zu nmNP vergleichbare Bindungslevel aufwiesen, kann davon ausgegangen werden, dass die WGA-Modifikation erfolgreich war und die verstärkte Bindung tatsächlich spezifisch über WGA vermittelt wird.

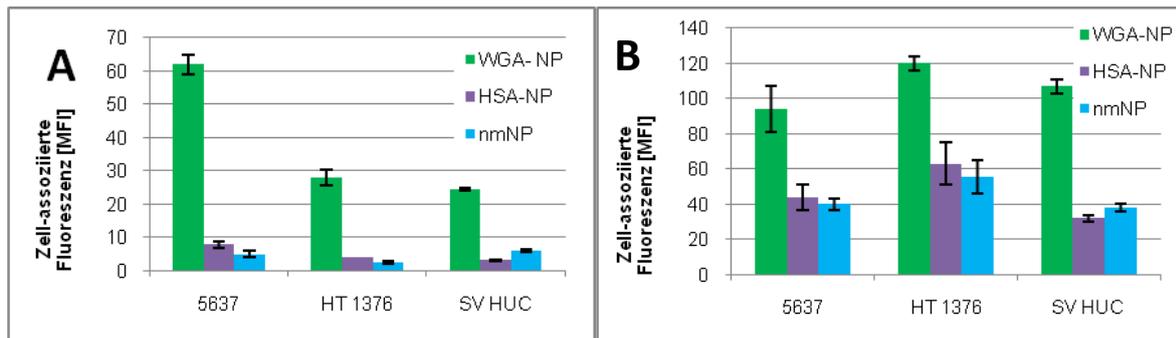


Abb.1: Unterschiede in der Zellbindung in Abhängigkeit der Nanopartikel-Modifikation. 5637-, HT 1376- und SV HUC- Einzelzellen (A) und Monolayer (B) wurden mit WGA-NP, HSA-NP und nmNP für 120 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden ungebundene Partikel entfernt und die Einzelzellen mittels FACS (A), der Monolayer mittels Fluoreszenzreader (B) analysiert.

Inkubationsparameter:

A: 5637, SV HUC: WGA-NP CH 95.1 (FI=1500), HSA-NP CH 95.2 (FI=1500), nmNP CH 95 (FI=1500)

HT 1376: WGA-NP CH 95.1 (FI=1550), HSA-NP CH 95.2 (FI=1550), nmNP CH 95 (FI=1400)

B: 5637: WGA-NP CH 95.1 (FI=1500), HSA-NP CH 95.2 (FI=1400), nmNP CH 95 (FI=1580)

SV HUC: WGA-NP CH 95.1 (FI=1640), HSA-NP CH 95.2 (FI= 1500), nmNP CH 95 (FI=1700)

HT 1376: WGA NP CH 95.1 (FI=1550), HSA-NP CH 95.2 (FI=1400), nmNP CH 95 (FI=1500)

Die stärkste WGA-Bindung zeigten niedrig maligne Zellen (5637); höher maligne Zellen (HT 1376) und gesunde Einzelzellen (SV HUC) banden WGA-NP in etwa gleichstark, aber um die Hälfte schwächer als erstgenannte. Abb.1B zeigt den analogen Versuch am Monolayer. Interessant ist, dass am Monolayer die MFIs der mit WGA-NP inkubierten Zellen nur mehr doppelt so hoch waren wie die MFIs der mit nmNP inkubierten Zellen. Auch scheint es, als würden am Monolayer alle drei Zelltypen WGA-NP in vergleichbarem Ausmaß binden.

### Konzentrationsabhängigkeit der Bindung

Im Zuge weiterführender Untersuchungen wurde auch die Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von WGA-NP an Einzelzellen (Abb. 2) bzw. von WGA-NP und nmNP an Zell-Monolayer (Abb.3) charakterisiert.

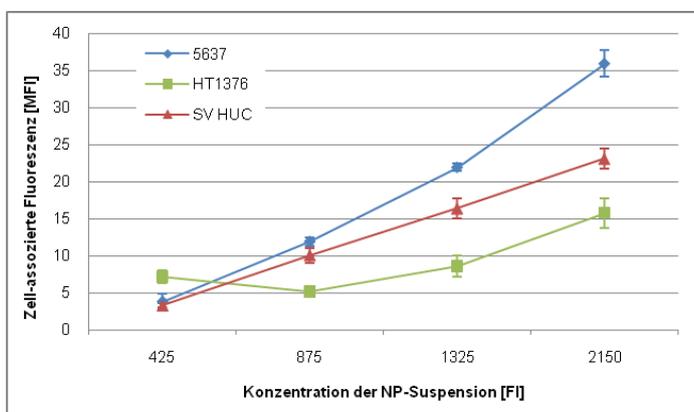


Abb.2: Konzentrationsabhängige Bindung von WGA-NP an Einzelzellen. 5637-, HT 1376- und SV HUC- Einzelzellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an WGA-NP 30 min lang bei 4°C inkubiert. Nach Entfernen ungebundener NP wurde die MFI der mit WGA-NP inkubierten Zellen flowcytometrisch analysiert. Inkubationsparameter: 5637, HT 1376, SV HUC: WGA- NP CH 94.3

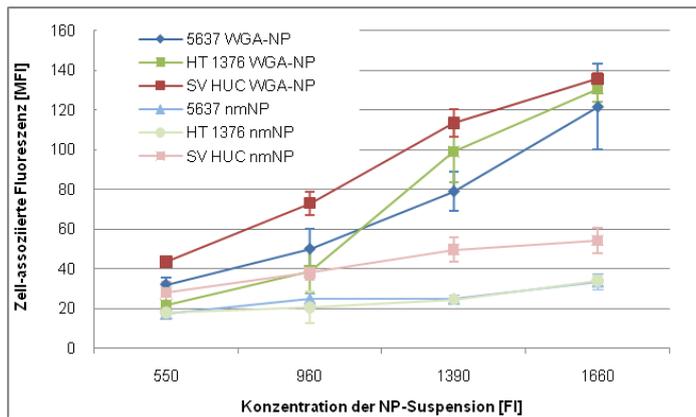


Abb.3: Konzentrationsabhängige Bindung von WGA-NP und nmNP an 5637-, HT 1376- und SV HUC-Monolayer. Die Monolayer wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an WGA-NP und nmNP 90 min lang bei 4°C inkubiert. Nach Entfernen ungebundener NP wurde die zelluläre MFI bestimmt.

Inkubationsparameter:  
5637, HT 1376, SV HUC: WGA- NP CH 94.3, nmNP CH 94

<u>5637</u>	WGA-NP [MFI]	k=[mean ΔFI/Δt]	nmNP [MFI]	k=[mean ΔFI/Δt]
<b>FI 1660</b>	121.7±21.8	29,8	33.7±4.0	4,9
<b>FI 1390</b>	79.0±10.0		25.0±2.0	
<b>FI 960</b>	50.0±9.8		25.0±2.6	
<b>FI 550</b>	32.0±3.2		17.3±2.1	
<b><u>HT 1376</u></b>				
<b>FI 1660</b>	130,7±6,4	38,7	34±2,8	5,18
<b>FI 1390</b>	99±15,6		24,5±0,7	
<b>FI 960</b>	39±11,4		20,7±7,8	
<b>FI 550</b>	21,7±2,3		18±1,7	
<b><u>SV HUC</u></b>				
<b>FI 1660</b>	135.7±2.9	31,63	54.3±6.4	9,07
<b>FI 1390</b>	113.3±7.1		49.7±6.0	
<b>FI 960</b>	73.0±6.0		38.0±3.6	
<b>FI 550</b>	43.7±0.6		28.0±5.3	

Tab.1: MFI-Werte der mit WGA-NP und nmNP inkubierten Zellen und die Steigung der Geraden „k“, berechnet mit Hilfe der Regressionsgeraden des Diagrammes in Abb. 3, sind dargestellt.

Sowohl bei Einzelzellen (Abb.2) als auch am Monolayer (Abb.3) stieg die MFI der mit WGA-NP und nmNP inkubierten Zellen proportional zur Konzentration der eingesetzten NP. Einzelzellen des höheren Malignitätsgrades schienen diesmal deutlich weniger WGA-NP gebunden zu haben (Abb.2), obgleich in vorangegangenen Untersuchungen (Abb.1A) noch mit gesunden Einzelzellen vergleichbare Bindungslevel festgestellt wurden. Am Monolayer zeigen gesunde Zellen bei niedrigen WGA-NP Konzentrationen die stärkste Zellbindung; höhere Konzentrationen führten aber bei allen drei Zelltypen zu sehr ähnlichen Ergebnissen. Dies war vergleichbar mit vorhergehenden Untersuchungen (Abb.1B). Die Zellbindung von nmNP lag für jegliche Konzentration bei maximal 50% von jener der WGA-NP. Auch war am Monolayer die Steigung der Geraden (k) der nmNP (Abb.3) deutlich flacher ausgeprägt als die der WGA-NP.

## Spezifität der Bindung

In weiterer Folge sollte sowohl für Einzelzellen (Abb.4) als auch für Monolayer (Abb.5) eruiert werden, ob und in welchem Ausmaß die WGA-vermittelte NP-Bindung tatsächlich spezifisch ist.

Dazu wurde N,N',N''-Triacetylchitotriose verwendet, die den Zellen vor der Inkubation mit der Partikelsuspension zugesetzt wurde. N,N',N''-Triacetylchitotriose ist ein Kohlenhydrat, das kompetitiv die Bindung von WGA und somit auch der WGA-NP an die Zellen inhibieren kann. Für die Einzelzellversuche wurden unterschiedliche Konzentrationen (0,00098  $\mu\text{mol}/100 \mu\text{l}$  - 0,0625  $\mu\text{mol}/100 \mu\text{l}$ ) des Zuckers eingesetzt, um graduelle Veränderungen beobachten zu können. Am Monolayer wurde hingegen nur eine relativ hohe Konzentration (0,5  $\mu\text{mol}/100 \mu\text{l}$ ) untersucht. Für diese Assays wurden pro well 50  $\mu\text{l}$  Zuckerlösung und 50  $\mu\text{l}$  WGA-NP Suspension eingesetzt. Für die Kontrollwerte wurde anstelle der Zuckerlösung HEPES/NaOH pH 7,4 Puffer verwendet.

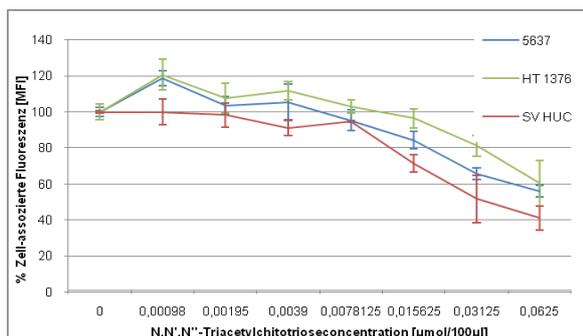


Abb.4: Spezifität der WGA-NP Bindung an Einzelzellen. Den 5637-, HT 1376- und SV HUC-Einzelzellsuspensionen wurde zunächst N,N',N''-Triacetylchitotriose (gelöst in PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) pH 7,4 in Konzentrationen zwischen 0,00098  $\mu\text{mol}/100 \mu\text{l}$  - 0,0625  $\mu\text{mol}/100 \mu\text{l}$  zugesetzt, danach wurden WGA-NP hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 4°C wurden nicht gebundene WGA-NP entfernt und die Zellen flowcytometrisch analysiert. Inkubationsparameter:  
5637: WGA-NP CH 89.1 (FI=700),  
HT 1376: WGA-NP CH 95.1 (FI=1450),  
SV HUC: WGA-NP CH 89.1 (FI=1050)

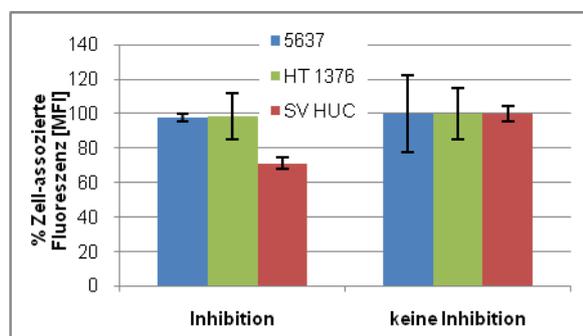


Abb.5: Spezifität der WGA-NP Bindung am Monolayer. 5637-, HT 1376- und SV HUC-Monolayer wurden 50  $\mu\text{l}$  N,N',N''-Triacetylchitotriose (0,5  $\mu\text{mol}/100 \mu\text{l}$ , *kompetitive Inhibition*) und 50  $\mu\text{l}$  WGA-NP zugesetzt; die Vergleichsprobe (*keine Inhibition*) enthielt anstelle der Zuckerlösung 20 mM HEPES/NaOH Puffer pH 7,4. Die Inkubationsdauer betrug jeweils 120 min bei 4°C, danach wurde 3x mit 20 mM HEPES pH 7,4 gewaschen, um nicht gebundene WGA-NP abzutrennen und anschließend die MFI der Zellschicht bestimmt. Inkubationsparameter:  
5637: WGA-NP CH 95.1 (FI=1550)  
HT 1376: WGA-NP CH 95.1 (FI=1500);  
SV HUC: WGA-NP CH 95.1 (FI=1640);

Im Falle der höhergradigen Krebszellen betrug die nicht inhibierbare Bindung an der Einzelzelle maximal 60%; somit lagen 40% in spezifisch gebundener Form vor

(Abb.4). Am Monolayer konnte jedoch lediglich bei der gesunden SV-HUC Zelllinie eine gewisse Inhibition beobachtet werden. Dennoch betrug die unspezifische Bindung hier bis zu 72%. Bei den malignen Zelllinien war hingegen keine Inhibition feststellbar (Abb.5). Analog zu vorangegangenen Untersuchungen war am Zell-Monolayer zwischen den einzelnen Zelllinien keine großen Unterschiede in der WGA-NP-Bindung zu erkennen.

Zeitabhängigkeit der WGA-NP- und nmNP-Bindung

Neben den Auswirkungen der NP-Konzentration auf die Zellbindung wurde auch der Faktor "Inkubationszeit" untersucht. So wurden Einzelzellen (Abb.6) und Monolayer (Abb.7) sowohl der Krebszelllinien als auch der gesunden Zelllinie unterschiedlich lange mit WGA-NP und nmNP bei 4°C inkubiert.

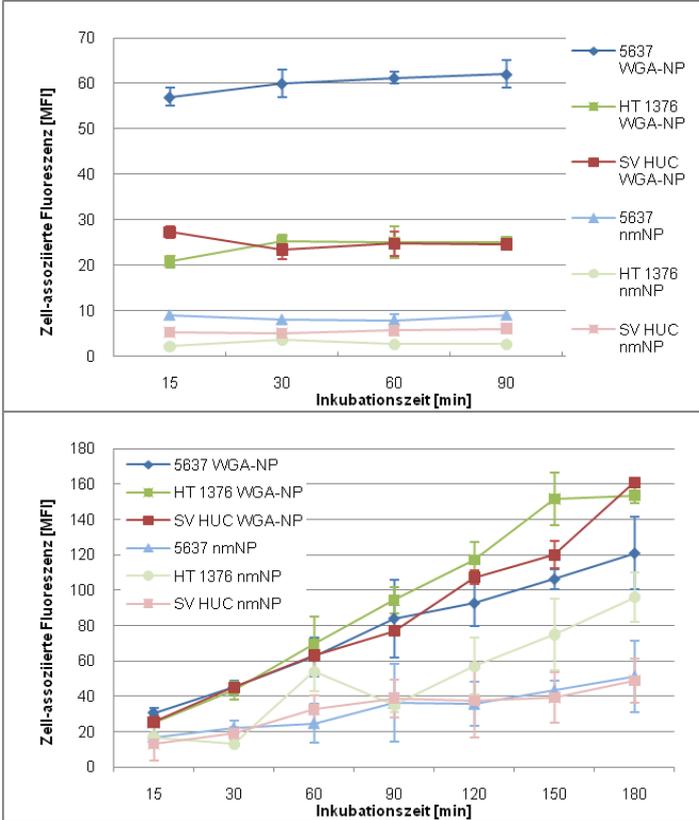


Abb.6: Zeitabhängigkeit der WGA-NP und nmNP Bindung an Einzelzellen. 5637-, HT 1376- und SV HUC-Einzelzellen wurden unterschiedlich lange (siehe „Inkubationszeit“) mit WGA-NP und nmNP bei 4°C inkubiert. Nach der Entfernung ungebundener Partikel wurde die MFI der Zellen flowcytometrisch analysiert.  
 Inkubationsparameter:  
 5637, SV HUC: WGA-NP CH 95.1 (FI=1500), HSA-NP CH 95.2 (FI=1500), nmNP CH 95 (FI=1500)  
 HT 1376: WGA-NP CH 95.1 (FI=1550), HSA-NPCH 95.2 (FI= 1550), nmNP CH 95 (FI=1400)

Abb.7: Zeitabhängigkeit der WGA-NP und nmNP Bindung an Monolayern. 5637-, HT 1376- und SV HUC-Monolayer wurden unterschiedlich lange (siehe „Inkubationszeit“) mit WGA-NP und nmNP bei 4°C inkubiert. Nach Entfernen ungebundener Partikel und Waschen mit 20 mM HEPES/NaOH pH7,4 Puffer wurden die Monolayer fluorimetrisch analysiert.  
 Inkubationsparameter:  
 5637: WGA-NP CH 95.1 (FI=1500), nmNP CH 95 (FI=1580)  
 HT 1376: WGA-NP CH 95.1 (FI=1550), nmNP CH 95 (FI=1500)  
 SV HUC: WGA-NP CH 95.1 (FI=1640), nmNP CH 95 (FI=1700)

	5637	HT 1376	SV HUC
	k=[mean ΔFI/Δt]	k=[mean ΔFI/Δt]	k=[mean ΔFI/Δt]
<b>WGA-NP</b>	15.14	23,23	21.46
<b>nmNP</b>	5.6	13	5.49

Tab.2: Die Steigung der Geraden „k“, berechnet mit Hilfe der Regressionsgeraden des Diagrammes in Abb. 7, ist dargestellt.

In dieser Versuchsreihe war zu beobachten, dass bei den Einzelzellen sehr schnell ein konstantes Bindungsniveau erzielt wurde, das dann über den gesamten Untersuchungszeitraum weitgehend konstant blieb. Dies deutet auf eine rasche Sättigung der NP-Bindung hin. An Einzelzellen höhergradiger Malignität und gesunde Einzelzellen banden die WGA-NP gleich stark, Einzelzellen niedrigerer Malignität führten zu doppelt so hohen MFI-Werten (Abb.6). Das entspricht den Ergebnissen, die auch schon in den ersten Bindungsversuchen (Abb.1A) festgestellt wurden. Verglichen mit der Bindung von nmNP war die Adhäsion der WGA-NP an die ersten beiden genannten Zelllinien dreimal höher, im Falle der Zellen des niedrigeren Malignitätsgrades sogar sechsmal höher. Am Zell-Monolayer wiederholte sich ebenfalls das bereits ermittelte Muster. Die WGA-NP Bindung war bei allen drei Zelllinien in etwa gleich stark ausgeprägt. Dabei war für die Zell-Monolayer des höheren Krebsgrades eine doppelt so hohe WGA-NP Adhäsion wie nmNP Adhäsion feststellbar, bei den anderen beiden Zelltypen lag die Zunahme nach maximaler Inkubationszeit in etwa bei einem Faktor von vier (Abb.7).

### Stabilität der Zellossoziation

Zuletzt sollte überprüft werden, ob es mit fortschreitender Inkubationsdauer eventuell wieder zum Loslösen von zunächst zellossoziierten WGA-NP kommt. Zu diesem Zweck wurde ein „Pulse - Chase“ Experiment an Monolayern aller drei Zelltypen bei 4°C durchgeführt.

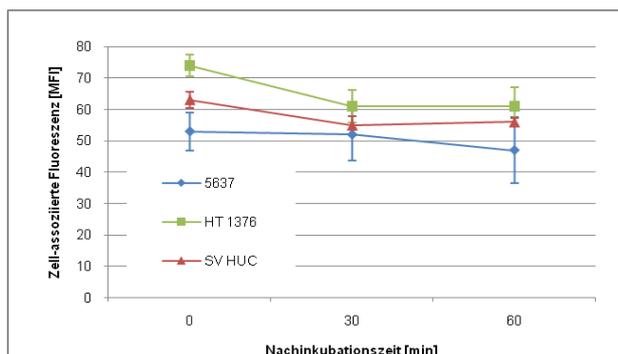


Abb.8: Pulse – Chase-Untersuchung mit WGA-NP an Monolayern bei 4°C. 5637-, HT 1376- und SV HUC-Monolayer wurden 60 min lang bei 4°C mit WGA-NP inkubiert und danach 3x mit 20 mM HEPES/NaOH Puffer pH 7,4 gewaschen. Daraufhin wurde die MFI analysiert (0 min) und die Zellen anschließend für die Chase-Phase nochmal 30 bzw. 60 min lang bei 4°C inkubiert. Nach jedem dieser Zeitpunkte wurde wieder mit demselben Puffer gewaschen und die MFI bestimmt (30 min bzw. 60 min).  
 Inkubationsparameter:  
 5637: WGA-NP CH 95.1 (FI=1500),  
 HT 1376: WGA-NP CH 95.1 (FI=1550),  
 SV HUC: WGA-NP CH 95.1 (FI=1640)

Dabei stellte sich heraus, dass bei 4°C auch bei längerer Inkubation keine nennenswerten Abnahme der Fluoreszenz erfolgte (Abb.8). Erneut lagen die einzelnen MFI-Werte der unterschiedlichen mit WGA-NP inkubierten Zelllayer sehr nahe beieinander.

# ANHANG E:

## WEITERE UNTERSUCHUNGEN

In diesen Versuchsreihen wurden die Zellen anstelle der NP-Suspension zum Teil auch mit F-WGA Lösung inkubiert. Dazu wurde eine Stock-Lösung mit einer Konzentration von 2000 pmol/l in PBS (+ Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) pH 7,4 hergestellt und den jeweiligen Anforderungen entsprechend verdünnt in einer Menge von 50 µl eingesetzt. Falls nicht gesondert angegeben, entsprach die Versuchsdurchführung den Angaben in Anhang A, Punkt 2.4:

### Vergleich der Bindungskapazität von F-WGA und WGA-NP an Krebszelllinien geringerer (5637) und höherer (HT 1376) Malignität bzw. an einer gesunden Zelllinie (SV HUC)

Wegen teilweise unerwarteter Ergebnisse in Zellversuchen mit WGA-NP sollte zu Vergleichszwecken auch das Adhäsionsverhalten von F-WGA überprüft werden. Wie in Abb.1 zu sehen, konnten dabei die bereits zuvor mit WGA-NP erzielten Resultate bestätigt werden: Einzeln vorliegende Krebszellen der niedrigeren Malignität banden F-WGA doppelt so gut wie gesunde Zellen, während für die Monolayer ein geringerer Unterschied ermittelt wurde.

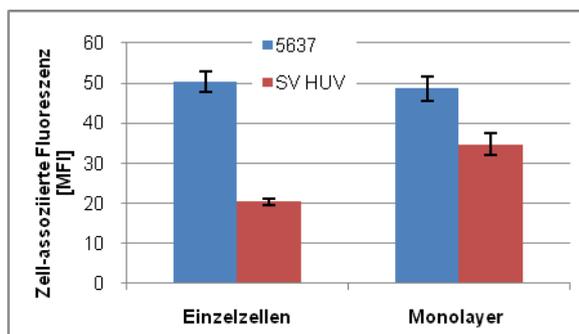


Abb.1: Vergleich der F-WGA-Bindung an Einzelzellen und Monolayer bei 4°C. 5637- und SV HUC Zell-Monolayer wurden 120 min lang bei 4°C mit 100 pmol F-WGA-Lösung inkubiert. Danach wurde ungebundenes F-WGA durch Waschen mit isotonem HEPES/NaOH pH 7,4 Puffer entfernt und die Zelllayer fluorimetrisch analysiert. Bei den 5637- und SV HUC-Einzelzellversuchen wurde 30min lang bei 4°C mit 500 pmol F-WGA-Lösung inkubiert, nicht gebundenes F-WGA entfernt und danach die Zellsuspension flowcytometrisch analysiert.

Überraschend war überdies, dass Einzelzellen mit höherer Malignität, die in früheren Versuchen die beste F-WGA-Bindung gezeigt hatten [13], im Falle der WGA-NP ein Bindungsniveau aufwiesen, das mit gesunden Zellen vergleichbar war, die theoretisch WGA-NP deutlich schlechter hätten binden sollen. Daher wurde das Bindungsverhalten von F-WGA und WGA-NP an allen drei Zelllinien verglichen (Abb.2).

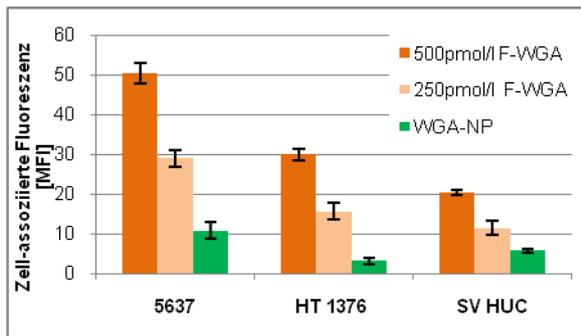


Abb.2: Vergleich der Bindung von F-WGA und WGA-NP an Einzelzellen. 5637-, HT 1376- und SV HUC-Einzelzellsuspensionen wurden mit WGA-NP bzw. F-WGA (500 pmol/l bzw. 250 pmol/l) 30 min lang bei 4°C inkubiert. Nach Entfernen ungebundener Analyten wurde die MFI analysiert.

Inkubationsparameter:

5637: WGA-NP CH 94.3 (FI=900)

HT 1376: WGA-NP CH 94.3 (FI=900)/ CH 94.2 (FI=1050)

SV HUC: WGA-NP CH 94.2 (FI=1050)

An Einzelzellen des geringeren Malignitätsgrades konnte für F-WGA und auch WGA-NP eine etwa doppelt so hohe Bindungsrate ermittelt werden wie an gesunden Einzelzellen. Dies entsprach den bisherigen Ergebnissen. Bei den HT 1376 Zellen, die ein Modell für stärker entartete Zellen darstellen, war für F-WGA das Bindungsvermögen um ein Drittel besser als bei nicht mutierten Zellen, für die WGA-NP war es hingegen in etwa gleich stark. So ergibt sich für die Bindung von F-WGA an Einzelzellen folgende Rangfolge: 5637 > HT 1376 > SV HUC; für WGA-NP an der Einzelzelle gilt 5637 > HT 1376 ~ SV HUC (Abb.2, Abb.1A in Anhang D).

Zuletzt wurde überprüft, ob die beobachtete Verschiebung der Bindungskapazitäten durch die Passage-Zahl bzw. die Herkunft der 5637 Zellen zurückgeführt werden kann. Dazu wurden 5637 Einzelzellen der Passage 3 (DSMZ) und der Passage 57 (ATCC) miteinander verglichen.

Dabei stellte sich heraus, dass für Zellen der Passage 3 zwar eine verstärkte F-WGA Bindung beobachtet werden konnte, die Bindung von WGA-NP war aber geringer als bei häufiger passagierten Zellen (Abb3).

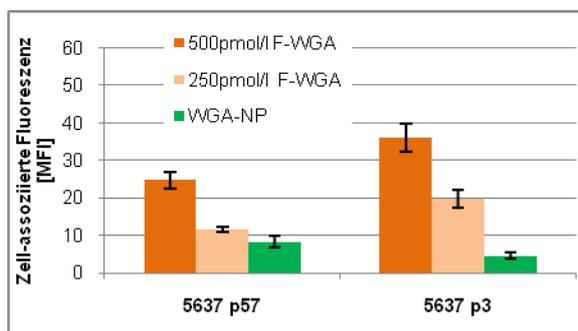


Abb.3: Vergleich der Bindung von F-WGA und WGA-NP an 5637 der Passage p57 (von „American Type Culture Collection“ erworben) und 5637 p3 (von „German Collection of Microorganisms and Cell Cultures „ erworben).

Die Einzelzell-Suspensionen wurden mit WGA-NP bzw. F-WGA (500 pmol/l bzw. 250 pmol/l) 30 min lang bei 4°C inkubiert. Nach Entfernen ungebundener Analyten wurden die Zellen flowcytometrisch analysiert.

5637 p57: WGA-NP CH 94.1 (FI=710)

5637 p3: WGA-NP CH 94.1 (FI=710)

### Weitere Pulse-Chase Untersuchungen am Zell-Monolayer

Wie bereits in Anhang D erwähnt, wurden Pulse-Chase Untersuchungen durchgeführt, um festzustellen, ob und in welchem Ausmaß oberflächengebundene

NP über die Zeit stabil zellassoziiert bleiben. Dazu wurden Monolayer aller drei Zelltypen verwendet. Bei 4°C konnten keine großen Veränderungen der Fluoreszenzintensität der mit WGA-NP inkubierten Zellen in Abhängigkeit von der Nachinkubationsdauer ermittelt werden (Abb.4).

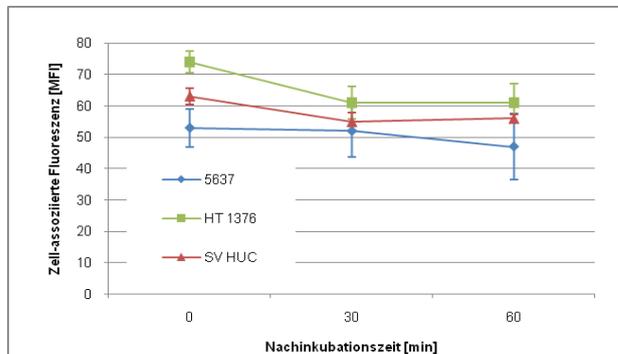


Abb.4: Pulse-Chase Untersuchungen mit WGA-NP am Monolayer bei 4°C. 5637-, HT 1376- und SV HUC-Monolayer wurden 60 min lang bei 4°C mit WGA-NP inkubiert und danach 3x mit 20 mM HEPES/NaOH Puffer pH 7,4 gewaschen. Daraufhin wurde eine Fluoreszenzmessung durchgeführt (0 min) und die Zellen für die Chase-Phase nochmal 30 bzw. 60 min lang bei 4°C inkubiert. Nach jedem dieser Zeitpunkte wurde mit demselben Puffer gewaschen und die MFI bestimmt (30min bzw. 60min).

Inkubationsparameter:  
 5637: WGA-NP CH 95.1 (FI=1500),  
 HT 1376: WGA-NP CH 95.1 (FI=1550),  
 SV HUC: WGA-NP CH 95.1 (FI=1640)

In der nächsten Versuchsreihe wurde in der Pulse-Phase die Inkubation bei 4°C, in der Chase-Phase allerdings bei physiologischer Temperatur (37°C) durchgeführt (Abb.5). Diese Untersuchung wurde auch mit nmNP am Zell-Monolayer niedriger maligner Zellen und gesunder Zellen wiederholt (Abb.6).

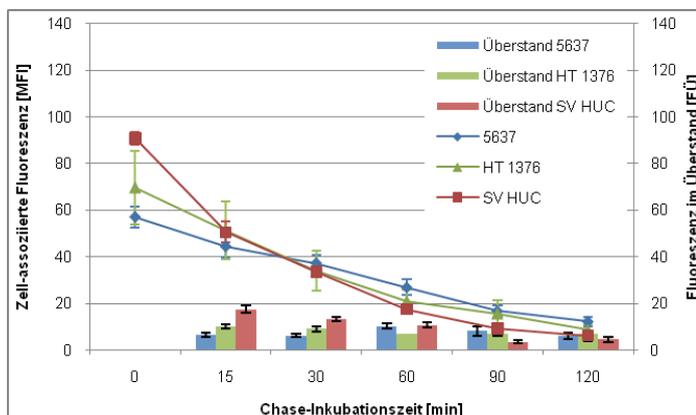


Abb.5: Pulse-Chase Versuch mit WGA-NP am Monolayer bei 4°C/37°C. 5637-, HT 1376- und SV HUC-Monolayer wurden 60 min lang bei 4°C mit WGA-NP inkubiert und danach 3x mit 20 mM HEPES/NaOH Puffer pH 7,4 gewaschen. Daraufhin wurde eine Fluoreszenzmessung durchgeführt (0 min) und die Zellen für die Chase-Phase nochmal für insgesamt 120 min bei 37°C inkubiert. Zu den Zeitpunkten 15, 30, 60, 90, 120 wurde mit demselben Puffer gewaschen, um ev. nicht mehr gebundene WGA-NP abzutrennen. Danach wurden die MFI der Zell-Monolayer bestimmt.

100µl des Zellüberstandes wurden ebenfalls analysiert, um festzustellen, ob sich darin Fluoreszenz nachweisen lässt (FU).

Inkubationsparameter:  
 5637: WGA-NP: CH 95.1 (FI=1640),  
 HT 1376: WGA-NP: CH 95.1 (FI=1550),  
 SV HUC: WGA-NP: CH 95.1 (FI=1550)

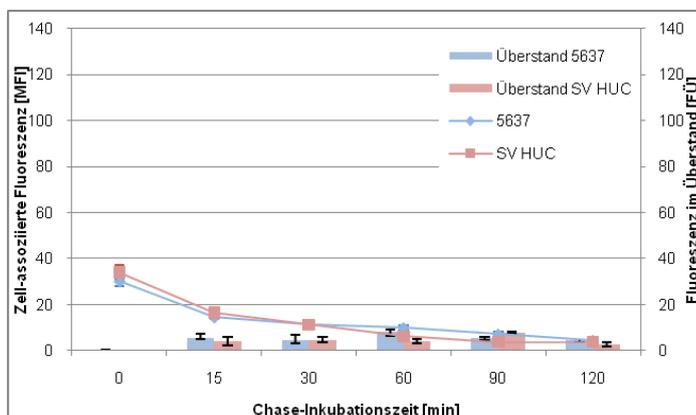


Abb.6: Pulse-Chase-Untersuchung mit nmNP am Monolayer bei 4°C/37°C. 5637- und SV HUC-Zell-Monolayer wurden 60 min lang bei 4°C mit nmNP inkubiert und danach 3x mit 20 mM HEPES/NaOH Puffer pH 7,4 gewaschen. Daraufhin wurde eine Fluoreszenzmessung durchgeführt (0 min) und die Zellen für die Chase-Phase nochmal für insgesamt 120 min bei 37°C nachinkubiert. Zu den Zeitpunkten 15, 30, 60, 90, 120 wurde mit demselben Puffer gewaschen, um ev. nicht mehr gebundene WGA-NP abzutrennen. Danach wurden die MFI der Zell-Monolayer bestimmt.

100 µl des Zellüberstandes wurden ebenfalls analysiert, um festzustellen, ob sich darin Fluoreszenz nachweisen lässt („FU“).

Inkubationsparameter:  
 5637: nmNP CH 95 (FI=1580),  
 SV HUC: nmNP CH 95 (FI=1700)

Ink.4°C/Chase. 37°C		Abnahme des MFI der mit NP inkubierten Zellen[%]			
[min]	5637 [WGA-NP]	5637 [nmNP]	SV HUC [WGA-NP]	SV HUC [nmNP]	
15	21,1	50	44	50	
30	35,1	60	62,6	97,6	
60	52,6	66,7	80,2	82,4	
90	80,7	83,3	90,1	88,2	
120	78,9	83,3	93,4	88,2	

Tab.1: Abnahme der MFI der mit WGA-NP bzw. nmNP inkubierten 5637- und SV HUC-Zell-Monolayer während der Chase-Inkubation in Prozent, bezogen auf Abb.6 und Abb.7.

Aus den Diagrammen in Abb.5 und Abb.6 bzw. Tab.1 ist unschwer zu erkennen, dass sowohl bei WGA-NP als auch bei nmNP nach einer Chase-Inkubation bei 37°C über einen Zeitraum von 120 min kaum mehr als 20% der ursprünglichen Fluoreszenzintensität erhalten bleiben. Die MFI scheint anfangs bei nmNP zwar stärker zu sinken als bei WGA-NP, bis zum Schluss der Chase-Phase gleicht sich dieser anfängliche Unterschied aber aus.

Führt man den gleichen Versuch ausschließlich bei physiologischer Temperatur durch (Pulse-Phase 37°C, Chase-Phase 37°C; Abb.7), so sind die MFI-Werte der mit WGA-NP und nmNP inkubierten Zellen direkt nach der Pulse-Inkubation (0 min) sogar etwas höher als bei 4°C (vgl. Abb.5, Abb.6, Abb.7). Am Schluss der Chase-Phase waren die MFI-Werte allerdings wieder auf ein zu den 4°C Versuchen vergleichbares Niveau abgesunken. Prozentuell gesehen gehen also in diesem Fall sogar etwas mehr WGA-NP bzw. nmNP "verloren" (vgl. Tab.1, Tab.2).

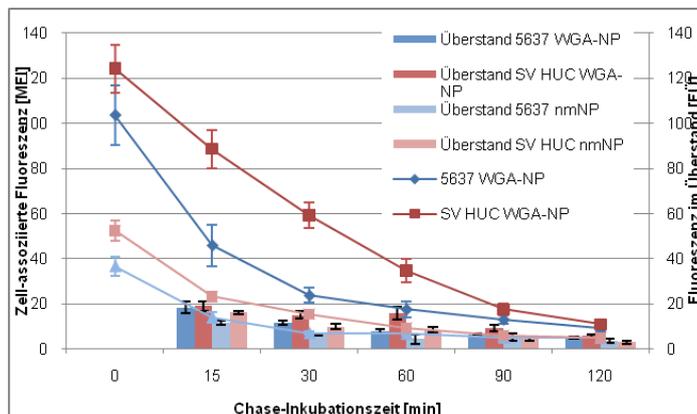


Abb.7: Pulse-Chase-Untersuchung am Monolayer mit WGA-NP und nmNP bei 37°C. 5637- und SV HUC-Monolayer wurden 120 min lang bei 37°C mit WGA-NP bzw. nmNP inkubiert und danach 3x mit 20 mM HEPES/NaOH Puffer pH 7,4. Daraufhin wurde eine Fluoreszenzmessung durchgeführt (0 min) und die Zellen für die Chase-Phase nochmal für insgesamt 120 min bei 37°C nachinkubiert. Zu den Zeitpunkten 15, 30, 60, 90, 120 wurde mit demselben Puffer gewaschen, um ev. nicht mehr gebundene NP abzutrennen. Danach wurden die MFI der Zell-Monolayer bestimmt.

100µl des Zellüberstandes wurden ebenfalls analysiert, um festzustellen, ob sich darin Fluoreszenz nachweisen lässt („FU“).

Inkubationsparameter:

5637: WGA-NP CH 96.1 (FI=1600), nmNP CH 96 (FI=1600),  
SV HUC: WGA-NP CH 96.1 (FI=1600), nmNP CH 96 (FI =1600)

Ink 37°C/ Chase 37°C		Abnahme des MFI der mit NP inkubierten Zellen[%]			
[min]	5637 [WGA-NP]	5637 [nmNP]	SV HUC [WGA-NP]	SV HUC [nmNP]	
15	55,7	62,2	28,2	56,6	
30	76,9	81,1	52,4	69,8	
60	82,7	81,1	71,8	83,0	
90	87,5	86,5	85,5	88,7	
120	91,3	86,5	91,1	90,6	

Tab.2: Die Abnahme der MFI-Werte der mit WGA-NP und nmNP inkubierten Monolayer im Verlauf der Chase-Inkubation in Prozent jeweils bezogen auf den 0 min-MFI-Wert wird dargestellt, bezogen auf Abb.7.

Am 5637-Monolayer scheint bei einer Inkubationstemperatur von 37°C die Abnahme der MFI der mit WGA-NP bzw. nmNP inkubierten Zell-Monolayer schneller zu erfolgen als bei SV HUC Monolayern (Tab.1, Tab.2). Die Endwerte nach einer Chase-Inkubationsdauer von 120 min sind aber durchaus vergleichbar.

Die ermittelten Fluoreszenzwerte legen den Schluss nahe, dass nach der Chase-Phase bei 37°C so gut wie gar keine Nanopartikel mehr in zellgebundener Form vorliegen. Um dies auch optisch verifizieren zu können, wurden die Untersuchungen mit auf Glas-Deckgläsern kultivierten Zellen wiederholt, wobei die Zellkerne vor der mikroskopischen Auswertung mit Hoechst 33342 gegengefärbt wurden.

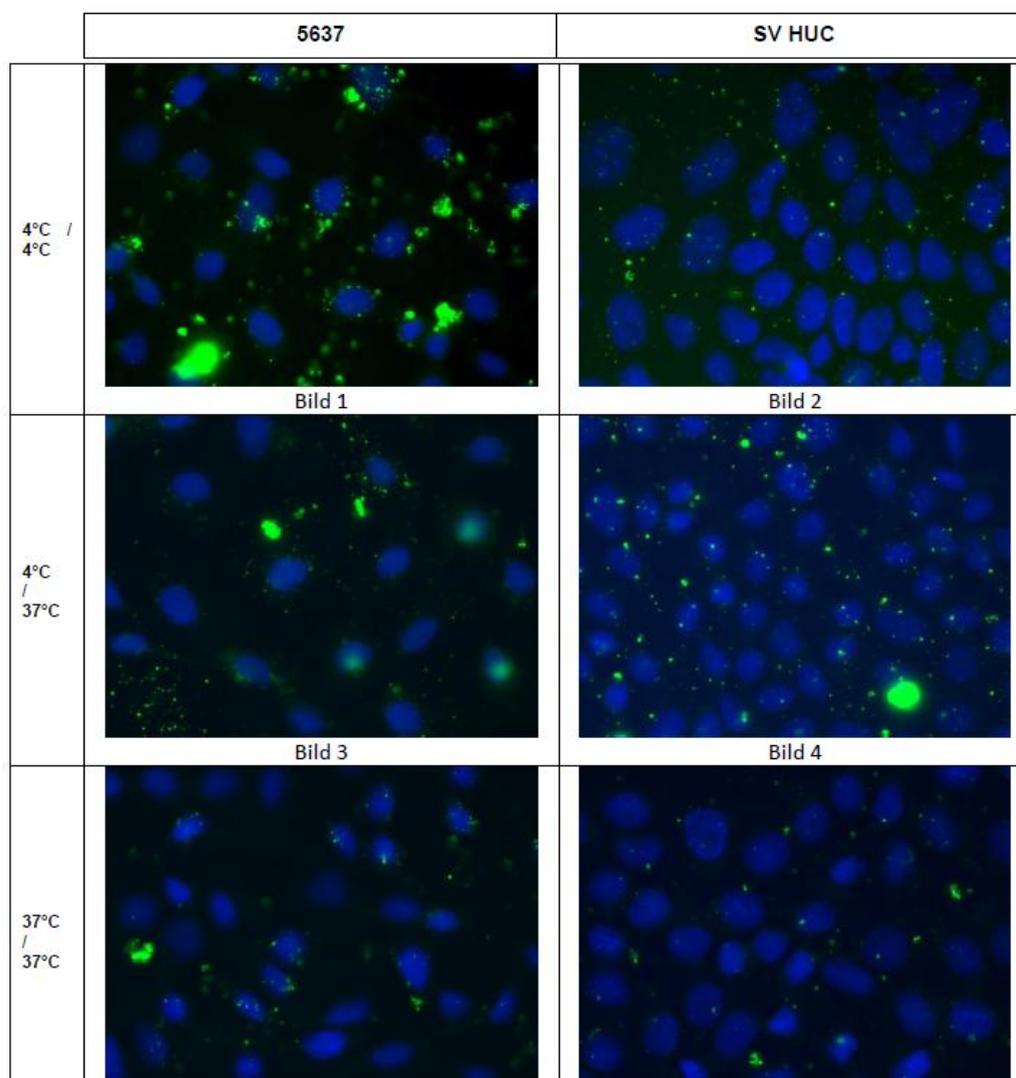


Abb.8:Pulse-Chase Versuch der WGA-NP-Bindung (grün) an 5637-bzw. SV HUC-Monolayer bei unterschiedlichen Temperaturen (*Pulse/Chase*). Die Zell-Monolayer wurden auf Glas-Deckgläsern gezüchtet, 120 min lang bei 4°C bzw. 37°C mit WGA-NP inkubiert und danach 3x mit isotonem HEPES/NaOH Puffer pH 7,4 gewaschen. In der Chase-Phase wurden die Monolayer über einen Zeitraum von weiteren 120 min bei 4°C bzw. 37°C inkubiert, wobei alle 30 min mit isotonem HEPES/NaOH Puffer pH 7,4 gewaschen wurde. Anschließend wurden die Monolayer mit Paraformaldehyd-Lösung (2%in PBS, pH 7,4) fixiert und die Zellkerne (blau) mit Hoechst 33342 gefärbt. Aufnahmeparameter: FITC-Belichtung - 200 ms bei 25% Beleuchtung , DAPI-Belichtung - 444ms bei 5% Beleuchtung  
Inkubationsparameter:  
WGA-NP: CH 96 (FI=720)

Auf Bild 1 in Abb.8, dem ausschließlich bei 4°C durchgeführten Versuch mit 5637 Zellen, sind deutlich mehr WGA-NP (grün) zu erkennen als auf Bild 3 und Bild 5 (Abb.8), bei denen die Chase-Phase jeweils bei physiologischer Temperatur (37°C) erfolgte. Überraschend war allerdings, dass auch nach Inkubation bei 37°C noch zellassozierte WGA-NP sichtbar waren. Bei den SV HUC-Monolayern sind zwischen Bild 2 (Pulse 4°C / Chase 4°C, Abb.8) und Bild 4 (Pulse 4°C / Chase 37°C, Abb.8) kaum Unterschiede in der Zellbindung zu beobachten, in Bild 6 (Pulse 37°C / Chase 37°C, Abb.8) sind aber deutlich weniger WGA-NP am Zelloberflächen zu erkennen. Auch hier lagen aber bei allen Versuchen durchaus noch NP in zellgebundener Form vor. Diese Ergebnisse führten zu der Überlegung, dass die verwendeten WGA-NP Konzentrationen eventuell zu hoch sein könnten, sodass die Gefahr der Überladung der zellulären Rezeptoren besteht.

Deshalb wurde eine weitere Pulse-Chase Untersuchung durchgeführt (Abb.9). Dabei wurden 5637- und SV HUC-Monolayer 120 min lang bei 4°C mit WGA-NP in zwei Konzentrationen inkubiert, wobei der Unterschied bei einem Faktor von etwa sechs lag (FI=280, FI=1600). Die Chase-Phase dauerte 120 min bei 37°C und die Zell-Monolayer wurden nur am Ende der jeweiligen Phasen gewaschen. Unabhängig von der Konzentration der WGA-NP Suspensionen und der Zelllinie lag die Abnahme der Fluoreszenzintensität in diesem Versuch bei einem ähnlichen Prozentsatz.

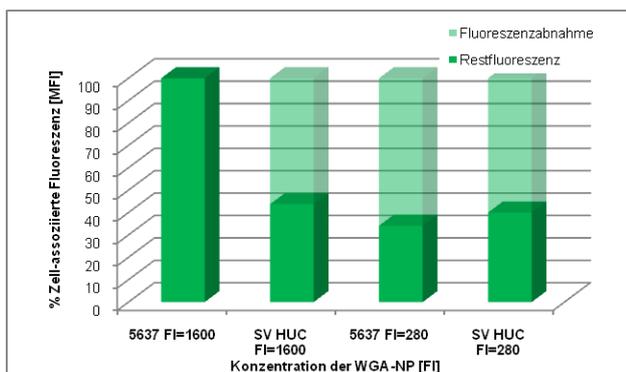


Abb.9: Pulse (4°C) / Chase (37°C)-Untersuchung mit zwei unterschiedlichen WGA-NP Konzentrationen am Monolayer. 5637- und SV HUC-Monolayer wurden 120 min lang bei 4°C mit WGA-NP inkubiert und danach 3x mit 20 mM HEPES/NaOH Puffer pH 7,4 gewaschen, um ungebundene NP zu entfernen. Daraufhin wurde eine fluorimetrische Analyse der Zell-Monolayer durchgeführt und die Zellen für die Chase-Phase nochmal für insgesamt 120 min bei 37°C nachinkubiert. Anschließend wurde wieder 3x mit demselben Puffer gewaschen um nicht mehr gebundene NP abzutrennen und die MFI der Zell-Monolayer erneut bestimmt. Die gesamte Balkenhöhe des Diagramms zeigt den 100% Wert nach der Pulse-Inkubation, der untere Teil des Balkens gibt die Restfluoreszenz nach der Chase-Phase an.  
 Inkubationsparameter:  
 5637, SV HUC: WGA-NP CH 96.1

## Untersuchungen zur Internalisation von zellgebundenen NP mit N-Acetyl-D-Glucosamin

Um festzustellen, ob und in welchem Ausmaß WGA-NP im Verlauf der Inkubation internalisiert werden, wurden an Zell-Monolayern maligner Zellen (5637) und gesunder Zellen Bindungsstudien durchgeführt, bei denen für die Waschschr

anstelle von Puffer N-Acetyl-D-Glucosamin-Lösungen eingesetzt wurden. Nicht internalisiertes WGA - unabhängig davon, ob frei oder an der NP-Oberfläche gebunden - sollte mit dem Zucker in der Waschlösung interagieren können und so zu einem größeren Fluoreszenzverlust bei mit WGA bzw.- WGA-NP beladenen Zellen führen, als bei Verwendung von Puffer als Waschflüssigkeit. F-WGA und nmNP dienten als Referenz; mit F-WGA inkubierte Zell-Monolayer sollten sich ähnlich verhalten wie WGA-NP, bei mit nmNP inkubierten Zell-Monolayern sollte kein Unterschied festzustellen sein. Für die Untersuchung wurden die Zell-Monolayer 120 min lang bei 4°C bzw. 37°C mit F-WGA, WGA-NP und nmNP inkubiert und danach entweder mit Puffer oder mit 50 mM N-Acetyl-D-Glucosamin-Lösung (in PBS (+ Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>), pH 7,4) gewaschen (Abb.10). Die Ergebnisse für F-WGA und nmNP entsprachen den Erwartungen; das Ergebnis der Zell-Monolayer, die mit WGA-NP inkubiert wurden, ähnelte aber eher jenem der nmNP als dem von F-WGA. Zwar war bei mit WGA-NP inkubierten Zellen die Fluoreszenzabnahme generell geringer als bei nmNP, ein deutlicher Unterschied zwischen Zuckerlösung und Puffer, wie bei mit F-WGA inkubierten Zellen zu beobachten, war jedoch nicht zu erkennen. Die Abnahme der MFI am Zell-Monolayer war bei 4°C geringer ausgeprägt als bei 37°C und bei den 5637 Monolayern nahm die Fluoreszenz und somit auch die Menge an zellgebundenen WGA-NP stärker ab als bei gesunden.

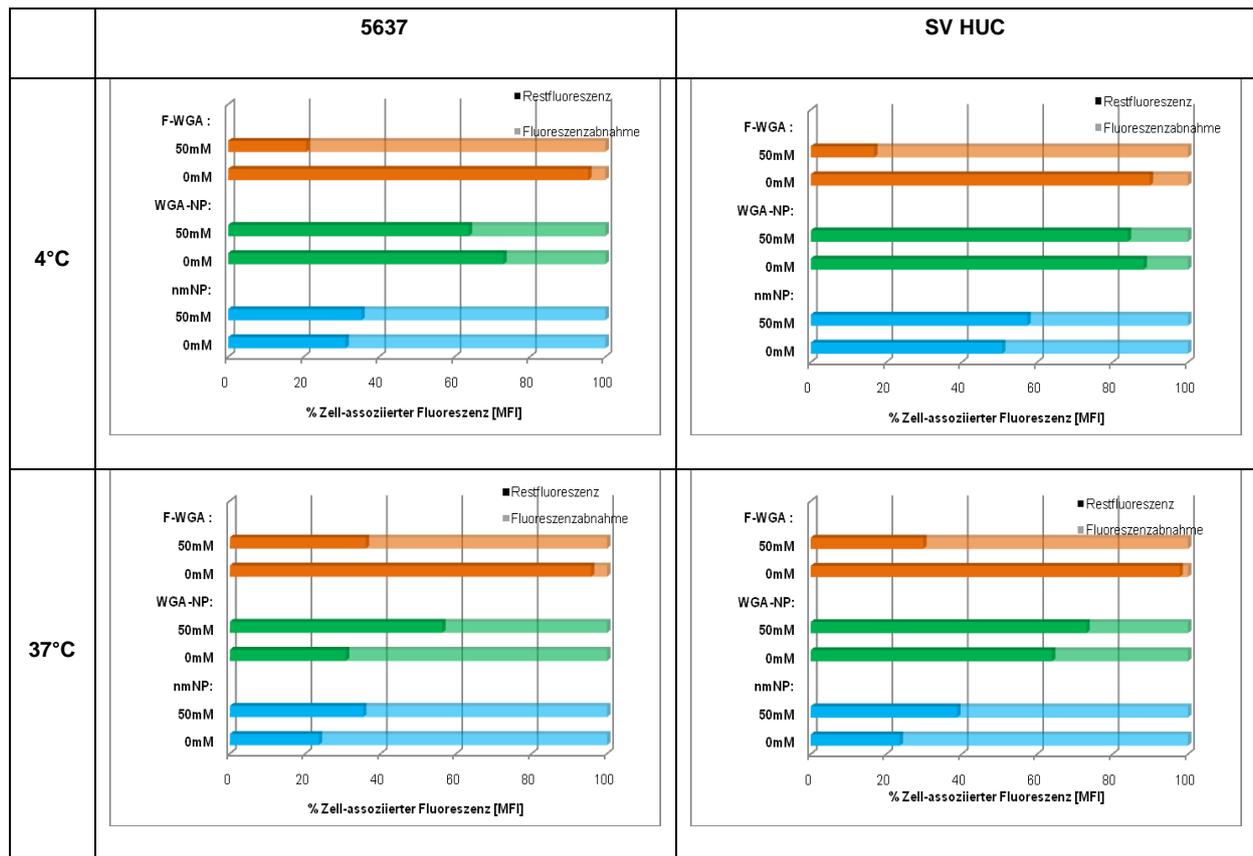


Abb.10: Untersuchung der F-WGA-, WGA-NP- und nmNP-Bindung an 5637- und SV HUC-Zell-Monolayer bei 4°C bzw. 37°C nach Entfernen des Analyten mit Puffer bzw. N-Acetyl-D-Glucosamin Lösung.

5637- und SV HUC-Zell-Monolayer wurden 120 min lang bei 4°C bzw. 37°C mit F-WGA (100 pmol/l), WGA-NP oder nmNP inkubiert. Danach wurde 3 x mit isotonem HEPES/NaOH Puffer pH 7,4 gewaschen, um ungebundene Analyten zu entfernen und die MFI bestimmt (=gesamter Balken) Danach wurde ein Teil der Zell-Monolayer 3x für je 10 min mit 50mM N-Acetyl-D-Glucosamin-Lösung (50 mM), der andere Teil mit isotonem HEPES/NaOH pH 7,4 Puffer (0 mM) gewaschen und die MFI erneut analysiert.

Die in den Diagrammen angeführte "Fluoreszenzabnahme" gibt an, um wie viel Prozent die Fluoreszenz nach dem 2. Waschschrift im Vergleich zum ersten abgenommen hat. "Restfluoreszenz" bezieht sich auf die Fluoreszenz, die nach dem 2. Waschschrift noch messbar war.

Inkubationsparameter:

WGA-NP: CH 96.1 (FI=1600), nmNP CH 96 (FI=1600)

# ZUSAMMENFASSUNG

Im Zuge der vorliegenden Diplomarbeit wurden Polylactid-co-Glycolid (PLGA)-Nanopartikel (NP) mit Wheat Germ Agglutinin (WGA), einem aus Weizen isolierten Lektin, modifiziert und deren Adhäsionsverhalten an verschiedene Blasenzelllinien untersucht, mit dem Ziel, eine neue Delivery-Strategie für lokal am Urothel applizierte Wirkstoffe zu entwickeln.

Nicht-muskelinvasiver Blasenkrebs gehört zu den häufigsten Krebserkrankungen und ist vorwiegend gekennzeichnet durch ein hohes Risiko für frühe Rezidive, welches durch intravesikale Therapie mit chemotherapeutischen oder immunmodulatorischen Substanzen in gewissem Maße gesenkt werden kann. Um die hohe Rezidivrate noch effizienter senken zu können, wäre ein neues Drug-Targeting- bzw. Delivery-System, wie z. B. Lektin-modifizierte Nanopartikel, wünschenswert.

Um die Partikel-Zell-Interaktion genau zu charakterisieren, wurden Versuche mit gesunden Urothelzellen (SV HUC) und zwei unterschiedlichen Urothel-Krebszelllinien – eine mit höherer Malignität (HT 1376) und eine mit niedrigerer Malignität (5637) – durchgeführt. Die Zellen wurden entweder in Form einer Einzelzellsuspension verwendet und flowcytometrisch analysiert, oder aber bis zur Konfluenz gezüchtet und im Monolayer mit einem „Microplate Reader“ analysiert. Zur näheren Untersuchung und Absicherung wurden die quantitativen Analysen durch fluoreszenzmikroskopische Färbungen ergänzt.

NP, die mit WGA modifiziert wurden (WGA-NP), hatten sowohl an Einzelzellen als auch am Monolayer gesunder und malign veränderter Zellen eine höhere Adhäsion als nicht modifizierte NP (nmNP). Einzelzellen niedrigerer Malignität wiesen die höchste WGA-NP-Bindung, die beiden anderen Zelllinien zeigten ein gleiches, aber signifikant niedrigeres Bindungsniveau. Am Monolayer war die WGA-NP-Adhäsion bei allen drei Zelllinien ähnlich stark. Die WGA-NP-Bindung war zudem konzentrations- und zeitabhängig, wobei sich das Sättigungsgleichgewicht bei Einzelzellsuspensionen viel schneller einstellte als am Zell-Monolayer.

Mit Hilfe von N,N',N''-Triacetylchitotriose konnte bei Einzelzellsuspensionen die spezifische WGA-NP-Adhäsion kompetitiv unterbunden werden, während das am Zell-Monolayer nur bei gesunden Blasenzellen der Fall war.

Pulse-Chase-Untersuchungen wurden auf Zell-Monolayern durchgeführt, um festzustellen, ob die initiale, WGA-vermittelte Oberflächenbindung in einer dauerhaften Zytoadhäsion und möglicherweise einer Internalisation der Partikel resultiert. Es stellte sich heraus, dass bei Ausschaltung dynamischer metabolischer Prozesse (Chase bei 4°C), das Fluoreszenzsignal der mit WGA-NP inkubierten Zellen annähernd gleich blieb. Wurde aber die Chase-Phase bei physiologischen Temperaturen (37°C) durchgeführt, so sank die Fluoreszenz innerhalb von zwei Stunden und fünf Waschvorgängen rapide auf 10% - 20% des ursprünglichen Wertes ab. Eine fluoreszenzmikroskopische Analyse nach Beendigung der Chase-Phase zeigte zwar ebenfalls weniger WGA-NP als davor, dennoch konnte auch hier eine deutliche Anzahl von stabil an den Zell-Monolayer gebundenen WGA-NP beobachtet werden.

Eine Anwendung von WGA-NP zur zielgerichteten installativen Chemotherapie des nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinoms erscheint aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse vor allem hinsichtlich des geringen Affinitätsunterschiedes zwischen gesunden und malign veränderten Zell-Monolayern derzeit zwar eher unwahrscheinlich. Ein Einsatz zur Verlängerung der Verweildauer von Arzneistoffen in Form einer Retardarzneiform z.B. zur lokalen Therapie bei Blasenentzündung ist aber durchaus vorstellbar.

# LEBENS LAUF



## PERSÖNLICHE DATEN

Name: Mesaric Sandra  
Adresse: Rosa- Jochmann Ring 54/5/3  
1110 Wien  
Geburtsdatum: 17.08.1988  
Geburtsort: Osijek, Kroatien  
Staatsbürgerschaft: Österreich  
Mutter: Mag. Svjetlana Mesaric, geb. Dupor  
Geschwister: Melita Mesaric (1990)

## AUSBILDUNG

1994-1998 Volksschule Zieglergasse, 1070 Wien  
1998-2006 Realgymnasium Stubenbastei, 1010 Wien  
Jun. 2006 Matura mit „ausgezeichnetem Erfolg“ abgelegt  
Ab. Okt. 2006 Studium der Pharmazie an der Universität Wien  
Okt. 2010 bis-Mär. 2011 Diplomarbeit am Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Universität Wien

## BISHERIGE BERFSERFAHRUNG

Jul. 2007 Ferialpraxis in der Apotheke Pottendorf.  
WS 2011 Tutor am Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Universität Wien