



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Ein Poly - (L) - Glutaminsäure Drug Delivery System mit
WGA als Targeter zur intravesikalen Therapie von
Blasentumoren“

verfasst von / submitted by

Maria Anzengruber

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

Wien, 2016 / Vienna, 2016

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

A 449

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

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

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

Danksagungen

Mein Dank gilt Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth und Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor für die Überlassung des Themas und ihre jederzeit freundlich gewährte Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Erstellung dieser Diplomarbeit.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Mag. Christina Apfelthaler für die umfangreiche Betreuung und Motivation.

Außerdem bedanke ich mich bei Clara und Julia für die guten Ratschläge und die vielen aufmunternden Worte.

Weiters danke ich der gesamten Arbeitsgruppe für die wunderbare Zusammenarbeit und ein ausgezeichnetes Arbeitsklima.

Ich danke meiner Familie und besonders meinen Eltern für die Unterstützung während meiner ganzen Studienzeit.

Schließlich möchte ich mich bei Christian für seine außerordentliche Geduld und die Hilfe bei der Formulierung dieser Diplomarbeit bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung	8
1.1. Harnblase und Urothel	8
1.2. Blasenkrebs	9
1.3. Limitationen derzeitiger Therapieverfahren	10
1.4. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	10
2. Ergebnisse und Diskussion	12
2.1. Herstellung und Aufreinigung des WGA-PGA-Fc Konjugats	12
2.2. Verhältnis Fc pro PGA - Einfluss auf die Eigenschaften des Konjugats	13
2.3. Internalisation des WGA-PGA-Fc Konjugats	15
2.4. Kolokalisationsuntersuchungen	16
2.5. Spezifität der Konjugat-Zell-Interaktion	17
3. Zusammenfassung	18
Literaturverzeichnis	19
Anhang A: Poly – (L) – glutamic acid drug delivery system for the intravesical therapy of bladder cancer using WGA as targeting moiety	21
Abstract	22
1. Introduction	23
2. Materials and Methods	25
2.1. Chemicals	25
2.2. Cell culture	25
2.3. Preparation of the WGA-PGA-Fc conjugate	26
2.4. Binding and internalisation of the fluorescence labelled PGA-WGA-conjugate	27
2.5. Colocalization analysis	28
2.6. Cleavage of the conjugate by Pronase E	28
2.7. Specificity of the conjugate-cell interaction	29
3. Results and discussion	30
3.1. Preparation and Purification of the WGA-PGA-Fc conjugate	30
3.2. Influence of the Fc/PGA ratio on the conjugate characteristics	31
3.3. Internalisation of the WGA-PGA-Fc conjugate	35
3.4. Colocalization analysis	37
3.5. Specificity of the conjugate-cell interaction	41
4. Conclusion	42
References	43
Annex 1: SEC gel filtration calibration curve	45

Annex 2: Fluorescein cadaverine quantification	46
--	----

1. Einleitung und Problemstellung

Weltweit betrachtet ist Blasenkrebs eine der zehn häufigsten Krebsarten mit einer verstärkten Häufung in Industrieländern [I]. Tendenziell treten Blasentumore eher in höherem Alter und vermehrt bei Männern auf [D]. Die Therapie von Blasentumoren ist oft sehr kostenintensiv, da trotz fortlaufender Bemühungen zur Verbesserung der intravesikalen Therapie die Rückfallrate bei Blasenkrebspatienten außergewöhnlich hoch ist [H][I]. Die unzureichende Effektivität der lokalen adjuvanten Therapie ist dabei - neben der ständigen Urinproduktion und der damit einhergehenden Verdünnung und Ausspülung der instillierten Arzneilösung - auch auf den besonderen Aufbau der Blasenwand zurückzuführen [B].

1.1. Harnblase und Urothel

In der Harnblase wird der ständig produzierte Urin gesammelt. Obwohl die Harnblase eines Erwachsenen ein Fassungsvermögen von ungefähr einem Liter besitzt, stellt sich der Harndrang schon bei weitaus geringerer Blasenfüllung von 150 bis 300 ml ein [A]. Unabhängig vom Füllungszustand stellt die Blasenwand eine hoch effektive Barriere zwischen Urin und dem umgebenden Gewebe dar, um Schadstoffe, die über den Urin ausgeschieden werden sollen, nicht wieder in den Körper zu resorbieren. Die Harnblasenwand ist aus mehreren Schichten aufgebaut. Innen wird sie von einer Epithelschicht, dem sogenannten Urothel, ausgekleidet. Daran schließt eine Bindegewebsschicht und schließlich die Muskelwand [B]. Bei entleerter Blase ist das Urothel in Falten gelegt und glättet sich mit zunehmender Füllung der Harnblase. Die besonders niedrige Permeabilität des Urothels ist durch dessen spezifischen Aufbau bedingt. Das Urothel ist aus verschiedenen Zellschichten aufgebaut. Die dem Lumen zugewandte Seite des Urothels besteht aus Superficialzellen (umbrella cells). Die apikale Membran dieser Umbrella Cells ist mit urothelialen Plaques besetzt. Diese werden aus transmembranären Proteinen gebildet, sogenannten Uroplakinen. Zusätzlich zu den Uroplakinen wird die Permeabilität des Urothels durch Tight Junctions und durch die Lipid-Zusammensetzung der apikalen Membran der Umbrella Cells weiter herabgesetzt. Der spezielle Aufbau und die langsame Erneuerung des Urothels machen die Blasenwand zu einer außergewöhnlich schwer zu durchdringenden Barriere im menschlichen Körper [C].

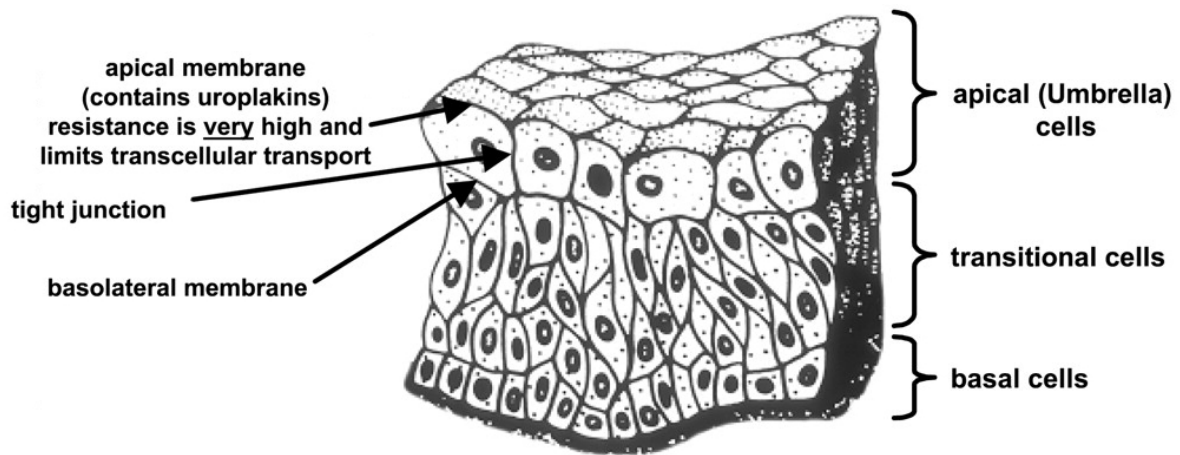


Abb. 1: schematische Darstellung des Urothels [nach R]

1.2. Blasenkrebs

Blasenkrebs gehört weltweit zu den häufigsten Krebserkrankungen. Die Ursache eines Blasentumors ist in den meisten Fällen unbekannt. Unbestritten ist jedoch, dass langjähriger Zigarettenkonsum einen erheblichen Risikofaktor darstellt [D] [E] [F]. Ein erhöhtes Vorkommen von Blasentumoren lässt sich auch nach Bestrahlung der Beckenregion und bei Patienten mit chronischer Harnblasenentzündung beobachten. Zusätzlich kann die Entstehung von Blasenkrebs auch durch Alkylantien, wie dem Chemotherapeutikum Cyclophosphamid, begünstigt werden [F]. In den meisten Fällen tritt Blasenkrebs zu Beginn als nicht muskelinvasiver Tumor auf (NMBC). Zu diesem Zeitpunkt ist eine chirurgische Entfernung des Tumors durch einen minimal invasiven Eingriff möglich. Nach chirurgischer Entfernung des Tumors dient die intravesikale Instillation von immunmodulierenden Substanzen und/oder Chemotherapeutika dazu, im Blasenlumen verbliebene maligne Zellen zu entfernen. Durch die lokale Anwendung der Arzneistoffe können Nebenwirkungen einer systemischen Gabe vermieden werden. Die für die adjuvante, intravesikale Therapie derzeit am häufigsten angewandten Substanzen sind Doxorubicin, Mitomycin C, Thiotepa, Cisplatin, Paclitaxel, Gemcitabin und das Immuntherapeutikum Bacillus Calmette-Guérin [D] [G]. Die Effektivität dieser adjuvanten Therapie ist jedoch gering und die Rückfallrate ist bei Blasenkrebspatienten außergewöhnlich hoch. Jedes erneute Auftreten eines Tumors birgt das Risiko einer Tumorprogression bis hin zu einem muskelinvasiven Tumor (MBC). Die hohe Rückfallrate erfordert eine fortlaufende medizinische Kontrolle der Patienten und häufig Nachbehandlungen. Aus diesem Grund zählt Blasenkrebs zu den teuersten Krebsarten weltweit [H] [I].

1.3. Limitationen derzeitiger Therapieverfahren

Das Urothel ist ein hoch spezifisches Gewebe, das eine schwer zu durchdringende Barriere zwischen Urin und umgebendem Gewebe darstellt [B]. Die besonders niedrige Permeabilität des Urothels führt zu einer ungenügenden Aufnahme des Wirkstoffes in Urothelzellen und somit zu einer eingeschränkten Effektivität einer lokalen intravesikalen Therapie. Die verminderte Aufnahme des Wirkstoffes in Urothelzellen ist, neben der geringen Permeabilität des Urothels, auch durch eine konstante Verdünnung des Wirkstoffs durch frisch produzierten Urin und ein unzureichendes Anhaften des Wirkstoffs an das Urothel bedingt. Verschiedene chemische und physikalische Ansätze werden verfolgt, um eine Erhöhung der Permeabilität des Urothels und eine verlängerte Verweildauer des Wirkstoffes an der Blasenwand zu erreichen [J]. Die Wirkstoffaufnahme in das Urothel kann physikalisch durch regionale Anwendung von elektrischem Strom (EMDA) oder durch lokale Hyperthermie erhöht werden. Chemisch kann die Wirkstoffaufnahme des Urothels durch permeabilitätserhöhende Substanzen wie Dimethylsulfoxid (DMSO) gefördert werden. Die Verweildauer des Therapeutikums an der Blasenwand kann durch spezielle galenische Formulierungen verlängert werden. Hydrogele und polymere Trägermaterialien wie Gelatine oder Chitosan werden für bioadhäsive Formulierungen verwendet [G] [J]. Ungeachtet aller Bemühungen bleibt ein dauerhafter Behandlungserfolg oft aus, so dass es neuer, zielgerichteter Therapiemethoden bedarf.

1.4. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Wirkstoffaufnahme in die Urothelzellen unter Ausnützung der biorekognitiven Interaktion zwischen Lektinen und der Blasenwand verbessert werden, um schließlich mit einer neuen Form der instillativen Therapie die Wirksamkeit der Zytostatika zu erhöhen. Pflanzliche Lektine sind nicht immunogene Proteine, die mit hoher Selektivität eine kleine Gruppe strukturell ähnlicher Mono- und Oligosaccharide binden [K]. Die Uroplakine an der Oberfläche der Urothelzellen weisen eine Glykokalix bestehend aus verschiedenen Zuckerresten auf [C]. In aktuellen Studien wurde gezeigt, dass bestimmte Lektine mit Zuckerkomponenten der urothelialen Glykokalix interagieren [L]. Verschiedene pflanzliche Lektine wurden auf ihr zytoadhäsives und zytoinvasives Potential hin untersucht. Weizenkeim-Lektin (WGA) aus *Triticum vulgare* lieferte besonders vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich Zellbindung und -internalisation. Zusätzlich wird WGA stärker von malignen als von gesunden Zellen gebunden und es weist keine relevante Toxizität auf. Bei physiologischem pH liegt WGA als Homodimer mit einem Molekulargewicht von ungefähr 36 kDa vor [M]. WGA bindet spezifisch an N-Acetyl-D-Glucosamin und

Sialinsäure, Zuckerkomponenten die in hohem Maß an der Oberfläche von Urothelzellen zu finden sind [L] [N].

Laut Neutsch et al. [O] konnte auch bei Biokonjugaten bestehend aus fluoreszenzmarkiertem bovinem Serumalbumin (fBSA) und WGA ein hohes zytoadhäsives und zytoinvasives Potential nachgewiesen werden. WGA selbst bietet ungefähr 25 mögliche Bindungsstellen für die Kopplung eines Wirkstoffes. Um die Menge an Wirkstoff pro WGA-Molekül zu erhöhen, wurde in dieser Studie versucht, ein Biokonjugat bestehend aus WGA und dem polymeren Träger Poly-L-Glutaminsäure (PGA) herzustellen. Das verwendete PGA besteht aus mehr als 300 L-Glutaminsäuren und sollte somit ausreichend freie Carboxylgruppen für die Kopplung adäquater Wirkstoffmengen bieten. Um sterische Hindernisse bei der Verknüpfung von WGA und PGA zu minimieren, wurde WGA über den Linker ϵ -Aminocapronsäure (ϵ -ACA) an PGA gekoppelt.

Anderen polymeren Trägermaterialien gegenüber bietet PGA mehrere Vorteile. PGA ist ein Protein und kann daher von proteolytischen Enzymen im Körper abgebaut werden. Weiters liegt PGA bei physiologischem pH-Wert als Polyanion vor und kann so bei Kopplung an einen hydrophoben Wirkstoff dessen Wasserlöslichkeit verbessern. PGA ist nicht immunogen, da es ein Homopolymer ist und somit kaum allergenes Potential besitzt [P]. Um das fluorimetrisch nicht detektierbare PGA bzw. die PGA/WGA Konjugate während Zellbindungs- und Zellinternalisationsexperimenten dennoch detektieren zu können, sollte PGA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-cadaverine (Fc) markiert werden. Die Fluoreszenzmarkierung des Biokonjugats und die damit einhergehende Detektierbarkeit könnte in weiterer Folge sowohl in Therapie als auch Diagnostik von Vorteil sein.

Ziel dieser Arbeit war demnach die Produktion eines fluorimetrisch verfolgbaren Konjugats bestehend aus WGA, PGA und Fc. Zusätzlich sollte eine mögliche, WGA abhängige, Zellbindung und -internalisation des Konjugats untersucht werden.

2. Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit konnte zur Publikation

"A Poly - (L) - glutamic acid drug delivery system for the intravesical therapy of bladder cancer using WGA as targeting moiety"

(Anhang A) maßgeblich beigetragen werden.

Dabei wurde ein Biokonjugat, bestehend aus WGA und fluoreszenzmarkiertem PGA, produziert. Das hergestellte Konjugat wurde auf Zellbindungskapazität und Internalisationspotential an sowohl Einzelzellen als auch an konfluenten Zellmonolayern getestet. Für Bindungs- und Internalisationsstudien wurden Zellen der 5637-Blasenzelllinie (Tumorgrad 2) verwendet.

2.1. Herstellung und Aufreinigung des WGA-PGA-Fc Konjugats

Die Herstellung des Konjugats erfolgte über eine Zwei-Schritt Reaktion unter Verwendung von EDAC/Sulfo-NHS. Die einzelnen Komponenten des Konjugats sind: WGA als Targetermolekül, das an die urotheliale Glykokalix bindet; weiters PGA, das, mit über 300 freien Carboxylgruppen als möglichen Bindungsstellen für den Wirkstoff, als polymeres Rückgrat fungiert; und zuletzt Fc, ein Fluoreszenzfarbstoff, um die Detektierbarkeit des Konjugats während der Kopplung sowie der Bindungs- und Internalisationsexperimente zu gewährleisten. WGA wurde über den Spacer ϵ -ACA an PGA gekoppelt, Fc wurde direkt über Carboxylgruppen des PGA gebunden.

Für die Herstellung des Konjugats wurden 5 Fc Moleküle pro PGA Molekül eingesetzt. Nach der Aufreinigung des Reaktionsansatzes durch Dialyse wurde noch eine Größen-Ausschluss-Chromatographie (SEC) durchgeführt. Für jede einzelne gesammelte Fraktion (à 1,2 ml) wurde die relative Fluoreszenzintensität bestimmt. Die in der fluorimetrischen Analyse der Elutionskurve sichtbaren Peaks deuten darauf hin, dass beim Herstellungsprozess Biokonjugate verschiedener Größe und somit unterschiedlichem Substitutionsgrad entstehen. Die einzelnen Fraktionen der jeweiligen Peaks wurden anschließend gepoolt, gegen gereinigtes Wasser dialysiert, lyophilisiert und in Puffer aufgenommen. Um in nachfolgenden Experimenten eine Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Peaks zu gewährleisten, wurde die Fluoreszenzintensität aller Peaks auf den gleichen Wert eingestellt. Die Zellbindungskapazität der einzelnen Peaks wurde in durchflusszytometrischen

Untersuchungen an Einzelzellen bestimmt. Der zwischen 60 und 80 ml eluierende Anteil des Konjugats zeigte dabei eine ausgezeichnete Interaktion mit der Oberfläche von 5637 Zellen (Fig. 1). Mit Hilfe eines Kalibrierstandards konnte für den bindenden Anteil des Konjugats eine ungefähre Größe von 160 kDa ermittelt werden. Fluoreszierende Fraktionen, die nach ungefähr 90 ml eluierten, zeigten keine Bindungskapazität (Fig. 1). Die hohe Fluoreszenzintensität und die fehlende Interaktion mit der Zelloberfläche deuten darauf hin, dass diese Fraktionen nur Konjugate bestehend aus PGA und Fc enthalten. Bestätigt wird diese Annahme durch zusätzlich durchgeführte Untersuchungen in denen Konjugate bestehend aus PGA und Fc hergestellt wurden. Diese Konjugate ohne WGA Komponente eluierten in einem Peak zwischen 90 und 120 ml und wiesen in Zellbindungsversuchen keinerlei Interaktion mit der Oberfläche von 5637 Zellen auf. Im Gegensatz dazu zeigt die hohe Zellbindungskapazität des zwischen 60 und 80 ml eluierenden Peaks eindeutig, dass dieses Konjugat die WGA Komponente enthält. Daraus lässt sich schließen, dass einzig und allein die zusätzliche Kopplung von WGA an das PGA-Fc Konjugat eine Interaktion mit der Zelle ermöglicht.

Darüber hinaus wiesen mehrere, separat produzierte WGA-PGA-Fc Konjugate vergleichbare Elutionskurven und Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Fraktionen auf. Der bindende Anteil jedes Konjugats eluierte jeweils zwischen 60 und 80 ml. Dies bestätigt, dass sowohl der Herstellungsprozess als auch die Aufreinigung des Konjugats und die Abtrennung des bindenden Anteils reproduzierbar sind.

2.2. Verhältnis Fc pro PGA - Einfluss auf die Eigenschaften des Konjugats

In weiteren Untersuchungen wurde die pro PGA eingesetzte Menge an Fc variiert, um eine optimale fluorimetrische Verfolgbarkeit des Konjugats zu erreichen und gleichzeitig nicht mehr PGA-Bindungsstellen als notwendig mit Fc zu besetzen. Es wurden Konjugate mit Ansatzverhältnissen von 30, 9 und 2,5 Fc pro PGA hergestellt, um damit Fc an jeweils 10%, 3% bzw. 0,8% der PGA Bindungsstellen zu koppeln.

Die Herstellung der Konjugate erfolgte wie unter Punkt 2.1. beschrieben. Die Notwendigkeit einer Aufreinigung des Konjugats mittels SEC wurde in Bindungsstudien an Einzelzellen überprüft. Dabei wurde das zytoadhäsive Potential des bindenden Anteils (Fraktionen zwischen 60 und 80 ml) des Konjugats mit der Bindungskapazität des entsprechenden Konjugats vor der SEC Aufreinigung verglichen. Die Ergebnisse zeigten eine zumindest 4-mal höhere zellgebundene Fluoreszenzintensität für das gereinigte Konjugat (Fig. 2).

Der Einfluss verschiedener Mengen von Fc pro PGA auf die Sichtbarkeit des Konjugats wurde durchflusszytometrisch in Bindungsstudien an Einzelzellen untersucht. Überraschenderweise wiesen Konjugate, die mit 5 Fc pro PGA hergestellt wurden, die höchste zellgebundene Fluoreszenzintensität auf. Konjugate mit einem Ansatzverhältnis von mehr als 5 Fc pro PGA zeigten eine deutlich niedrigere Zellinteraktion, ebenso wie Konjugate die mit weniger als 5 Fc pro PGA hergestellt wurden (Fig. 2). Um festzustellen, aus welchen Gründen die zellgebundene Fluoreszenzintensität jener Konjugate, die mit einem molaren Verhältnis von mehr als 5 Fc pro PGA hergestellt wurden, vermindert ist, wurden diese Konjugate mit dem Enzym Pronase E und mit unterschiedlichen chaotropen Reagenzien mehrere Tage lang bei 37°C inkubiert.

Chaotrope Substanzen stören Wasserstoff-Brückenbindungen und reduzieren damit die Ordnung der Wassermoleküle innerhalb der Hydrathülle von Proteinen. In hohen Konzentrationen führt dies zu einer Denaturierung des Proteins. Das Konjugat wurde mit wässrigen Lösungen unterschiedlicher chaotroper Substanzen (Harnstoff 8M, Guanidin Hydrochlorid 4M, Magnesium Chlorid 2M) versetzt und mehrere Tage lang bei 37°C inkubiert. Keine der verwendeten Substanzen hatte jedoch einen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität des Konjugats.

Um eventuelle Quenchingeffekte detektieren zu können, wurde das Konjugat mit Pronase E mehrere Tage lang bei 37°C inkubiert. Quenching beschreibt das Phänomen der Fluoreszenzlöschung ohne Zerstörung des Fluorophors. Es kann unter anderem vorkommen, wenn Fc Moleküle an Proteine gebunden werden. Das Enzym Pronase E spaltet Ester- und Amidbindungen des Konjugats, wodurch eventuelle Quenchingeffekte minimiert werden sollten.

Während der Inkubation des Konjugats mit Pronase E stieg die Fluoreszenzintensität deutlich an. Nach 20-tägiger Inkubationszeit erreichte die Fluoreszenzintensität ein Maximum und blieb danach weitgehend stabil (Fig. 3). Die anfängliche Fluoreszenzintensität von Konjugaten, die mit einem molaren Verhältnis von 5 Fc pro PGA hergestellt wurden, verdoppelte sich, wohingegen die Fluoreszenzintensität von Konjugaten mit einem Ansatzverhältnis von 9 Fc pro PGA auf das Vierfache anstieg. Basierend auf diesen Ergebnissen und der Annahme, dass Fc auf dem vorhandene PGA gleich verteilt vorliegt, konnte der Fc-Substitutionsgrad pro PGA mit Hilfe einer Kalibrationsgeraden berechnet werden. Konjugate, die mit 5 Fc pro PGA hergestellt wurden, wiesen eine tatsächliche Beladung von 1,2 Fc pro PGA auf; Konjugate, die mit 9 Fc pro PGA hergestellt wurden, hingegen eine Beladung von 3,2 Fc pro PGA. Um Quenching zu vermeiden, sollten laut Greg Hermanson [Q] pro Proteinmolekül nicht mehr als 4 bis 5 Fc Moleküle gebunden werden. Das hier produzierte Konjugat wies Quenching allerdings bereits bei geringerem Substitutionsgrad auf.

Wie erwähnt, zeigten Konjugate die mit 5 Fc pro PGA hergestellt wurden, die höchste zellgebundene Fluoreszenzintensität. Aus dem bei diesem Ansatzverhältnis resultierenden durchschnittlichen Substitutionsgrad von einem Fc pro PGA lässt sich schließen, dass 305 der 306 bzw. 99,6% der möglichen Bindungsstellen für die Kopplung von WGA und in weiterer Folge für die Bindung eines Wirkstoffs zur Verfügung stehen. Der Einsatz von mehr als 5 Fc pro PGA führte zu keiner verbesserten Detektierbarkeit des Konjugats, die Verwendung von weniger als 5 Fc pro PGA resultierte jedoch in einer unvollständigen Markierung der vorhandenen PGA Moleküle. Demzufolge kann ein Ansatzverhältnis von 5 Fc pro PGA als optimal angesehen werden, um das Konjugat im Verlauf von Bindungs- und Internalisationsvorgängen sichtbar zu machen. Für alle weiteren Experimente wurden daher Konjugate mit einem Ansatzverhältnis von 5 Fc pro PGA eingesetzt.

Die Hypothese, dass die verringerte zellassoziierte Fluoreszenzintensität jener Konjugate mit mehr als 5 Fc pro PGA auf eine verminderte Interaktion des Konjugats mit der Zelle aufgrund ungenügender WGA Kopplung während des Herstellungsprozesses zurückzuführen sein könnte, wurde verworfen. Selbst wenn 30 Fc Moleküle pro PGA eingesetzt und gekoppelt werden, stehen immer noch 90% der PGA Bindungsstellen (~ 275 freie Carboxylgruppen) für die Bindung von ϵ -ACA und die anschließende Kopplung von WGA zu Verfügung. Daraus lässt sich wohl ableiten, dass die verminderte zellgebundene Fluoreszenzintensität nicht durch eine reduzierte Interaktion mit der Zelle sondern rein durch Quenchingeffekte bedingt ist.

2.3. Internalisation des WGA-PGA-Fc Konjugats

Das Bindungs- und Internalisationspotential des Konjugats wurde an Einzelzellen und Monolayern überprüft. Bei 4°C befinden sich die Zellen weitgehend in einem metabolischen Ruhezustand, sodass der aktive Transport in die Zelle limitiert und so nur eine Bindung an die Zelloberfläche möglich ist. Durch Inkubation bei 37°C werden hingegen Transportprozesse der Zelle ermöglicht. Das Bindungs- und Internalisationspotential der einzelnen Peaks der jeweiligen Konjugate wurde mittels Durchflusszytometrie in Einzelzellversuchen und Fluorimetrie in Monolayerversuchen bestimmt.

Nach Aufreinigung der Konjugate mittels SEC wurde das zytoadhäsive und zytoinvasive Potential der einzelnen Konjugatpeaks analysiert. Wie bereits in früheren Versuchen gezeigt werden konnte, wird WGA von 5637 Zellen internalisiert und induziert überdies die Aufnahme hochmolekularer WGA-fBSA Konjugate [L] [O]. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte für das WGA gekoppelte Konjugat (Peak 60-80 ml) eine Internalisation beobachtet werden. In Experimenten an Einzelzellen zeigten alle getesteten WGA-gekoppelten Konjugate, unabhängig von der eingesetzten Menge an Fc pro PGA, eine deutliche, durch die Internalisation des entsprechenden Konjugats induzierte

Reduktion der Fluoreszenzintensität (Fig. 4). Eine Verminderung der zellassozierten Fluoreszenzintensität deutet darauf hin, dass das Konjugat in sauren Kompartimenten der Zelle (Lysosomen, späte Endosomen) akkumuliert, da bei saurem pH-Wert die Fluoreszenzintensität von Fc durch pH-abhängige Quenchingeffekte vermindert ist.

Bindungs- und Internalisationsstudien mit den verschiedenen Peaks an Monolayern bestätigten die Ergebnisse der Versuche an Einzelzellen (Fig. 5). Auch hier wurde zytoadhäsives und zytoinvasives Potential nur für Konjugate mit der WGA Komponente, also für den zwischen 60 und 80 ml eluierenden Anteil des Konjugats, beobachtet. Die zellassozierte Fluoreszenzintensität der Fraktionen ohne WGA Komponente war vergleichbar mit jenen der Negativkontrolle.

2.4. Kolokalisationsuntersuchungen

Um die Lokalisation des Konjugats an der Zelloberfläche und innerhalb der Zelle zu ermitteln, wurden mikroskopische Analysen an Einzelzellen und Monolayern durchgeführt. Dafür wurden Zellkern und Zellmembran mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Der Zellkern wurde mit dem DNA-spezifischen Farbstoff HOECHST 33342 blau und die Zellmembran mit Alexa-WGA (aWGA) rot gefärbt. Die Inkubation mit aWGA erfolgte stets bei 4°C, da das Lektin bei 37°C von der Zelle aufgenommen werden würde.

In den Kolokalisationsstudien wurde das Bindungs- und Internalisationspotential der einzelnen Peaks verglichen. Dafür wurden die Zellen bei 4°C (Bindung) bzw. 37°C (Internalisation) mit dem jeweiligen Konjugat inkubiert. Nach Inkubation der Zellen mit dem bindenden Anteil des WGA-PGA-Fc Konjugats bei 4°C, ist eine deutliche Grünfärbung der Zellmembran und damit eine Bindung des Konjugats an die Zelloberfläche zu beobachten (Fig. 6A, 6C). Werden alle Farbkanäle übereinander gelegt, überlagert das grüne Konjugat-Signal das rote aWGA-Signal, sodass die Zellmembran eine orange bis gelbe Färbung aufweist. Ein Pearsons Korrelationskoeffizient von 0,932 für Einzelzellen bzw. 0,703 für Monolayer bestätigte diese beinahe vollständige Überlagerung. Eine Aufnahme des Konjugats in die Zelle wurde bei einer Inkubationstemperatur von 4°C nicht beobachtet. Das legt den Schluss nahe, dass das Konjugat nicht über passive Transportmechanismen in die Zelle aufgenommen werden kann. Inkubiert man die Zellen hingegen bei 37°C, so lässt sich eine energieabhängige Internalisation des WGA gekoppelten Konjugats (60-80 ml) feststellen. Hier ist eine deutliche punktförmige Akkumulation des „grünen“ Konjugats um den blau gefärbten Zellkern und innerhalb der rot gefärbten Zellmembran zu erkennen (Fig. 6B, 6D). Die Internalisation des Konjugats konnte durch einen Pearsons Korrelationskoeffizient von 0,110 für Einzelzellen bzw. 0,383 für Zellmonolayer bestätigt werden. Für den nach 90 ml eluierenden Anteil des Konjugats konnte allerdings weder eine

Bindung noch eine Internalisation nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bekräftigen die Schlussfolgerung, dass nur der Peak zwischen 60 und 80 ml Konjugate mit der für die Interaktion mit der Zelle essentiellen WGA-Komponente enthält.

2.5. Spezifität der Konjugat-Zell-Interaktion

Die Spezifität der Interaktion zwischen der WGA-Komponente des Konjugats und der komplementären Zuckerstruktur an der Zellmembran wurde in Bindungsstudien an Einzelzellen in Gegenwart eines kompetitiven Inhibitors untersucht. Der Inhibitor N, N', N'' - triacetylchitotriose besitzt eine sehr hohe Affinität zu WGA und kann somit die Bindung des Konjugats an die Zelle minimieren. Analysiert man die zellassoziierte Fluoreszenzintensität in Gegenwart steigender Konzentrationen des Inhibitors mittels Durchflusszytometrie, lässt sich feststellen, dass bis zu 89% der Zellbindung inhibiert werden (Fig. 7). Diese Untersuchung zeigt also deutlich, dass die spezifische Interaktion zwischen WGA und der Zellmembran hauptverantwortlich für Bindungsvorgänge des Konjugats an die Zelle ist.

3. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein zielgerichtetes, bioadhesives Konjugat für die instillative Therapie von nicht-muskelinvasiven Blasen Tumoren hergestellt. Das Konjugat besteht aus drei Komponenten: Erstens WGA als Targeter, zweitens PGA als polymerer Träger mit ausreichend Bindungsstellen für den Wirkstoff, und drittens Fc, ein Fluoreszenzfarbstoff der an PGA gekoppelt wurde, um das Konjugat fluorimetrisch detektieren zu können.

In Untersuchungen an sowohl Einzelzellen als auch am Zellmonolayer konnte deutlich eine Bindung und Internalisation des Konjugats gezeigt werden. Alle Ergebnisse deuten darauf hin, dass ausschließlich die WGA Komponente des Konjugats für Zellbindung und -internalisation verantwortlich ist. Durch Optimierung der pro PGA eingesetzten Menge an Fc konnte eine effektive Substitutionsrate von einem Mol Fc pro Mol PGA erreicht werden. Da so jedes PGA Molekül markiert ist, ist das Konjugat einerseits adäquat fluorimetrisch verfolgbar und andererseits steht die überwiegende Mehrheit (~99%) der PGA-Bindungsstellen für die Kopplung eines Wirkstoffs zur Verfügung. Um die maximal mögliche Beladung von PGA mit einem Wirkstoff ohne nennenswerten Verlust von Bindungskapazität und Internalisationspotential festzustellen, sind jedoch weitere Untersuchungen nötig. In Kolokalisationsstudien konnte sowohl die Interaktion der Zellen mit dem Konjugat als auch die Internalisation des Konjugats bestätigt werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in dieser Studie ein vielversprechendes, fluorimetrisch verfolgbares Transportsystem für zytostatische Wirkstoffe mit hervorragenden Zellbindungs- und Internalisationseigenschaften hergestellt werden konnte. Dieses WGA-PGA-Fc Konjugat hat großes Potential die Aufnahme und Anreicherung eines Wirkstoffes in maligne Blasen Zellen zu erhöhen wobei die Fluoreszenzmarkierung dem Konjugat zusätzlich theranostische Eigenschaften verleiht. Insgesamt sollte damit die Effizienz der instillativen Therapie von nicht-muskelinvasiven Blasen Tumoren gesteigert werden können.

Literaturverzeichnis

- [A] Thews, Mutschler, Vaupel: Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 2007 : 6 : 494, 495
- [B] Puneet Khandelwal, Soman N. Abraham, Gerard Apodaca, Cell biology and physiology of the uroepithelium, American Journal of Physiology Renal Physiology,(2009) Dec; 297(6): F1477–F1501
- [C] Xue-Ru Wu, Xiang-Peng Kong, Angel Pellicer, Gert Kreibich, Tung-Tien Sun; Uroplakins in urothelial biology, function, and disease; Kidney International (2009) 75, 1153–1165;
- [D] Donald S. Kaufman, William U. Shipley, Adam S. Feldman, Bladder cancer, Lancet, 374 (2009) 239-249
- [E] Seth P. Lerner, H. Barton Grossman, Edward M. Messing, Adam S. Kibel, Andrew Stephenson, Jason R. Gee, Michael A. O'Donnell, Robert D. Reid, Ashish M. Kamat, Howard L. Parnes, Margaret G. House; BCAN Think Tank session 3: Prevention of bladder cancer; Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations 28 (2010) 338–342
- [F] Sommerkamp, Rutishauser, Wetterauer: Urologie; De Gruyter Lehrbuch mit Repetitorium. Berlin: De Gruyter; 1995
- [G] Shruti Guha Sarkar, R. Banerjee, Intravesical drug delivery: Challenges, current status, opportunities and novel strategies; Journal of Controlled Release; 148 (2010) 147-159
- [H] B. W. van Rhijn, M. Burger, Y. Lotan, E. Solsona, C. G. Stief, R. J. Sylvester, J. A. Witjes, A. R. Zlotta; Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy; European urology, 56 (2009) 430-442
- [I] S. J. Dovedi, B. R. Davies, Emerging targeted therapies for bladder cancer:a disease waiting for a drug, Cancer Metastasis Review, 28 (2009) 355-267
- [J] JPB Gasion, Juan Fernando Jimenez Cruz, Improving Efficacy of Intravesical Chemotherapy, European urology, 50: 225
- [K] Teuscher, Melzig, Lindequist; Biogene Arzneimittel: Lehrbuch der Pharmazeutischen Biologie; 7. Auflage (2012)

- [L] L. Neutsch, V. E. Plattner, S. Polster-Wildhofen, A. Zidar, A. Chott, G. Borchard, O. Zechner, F. Gabor, M. Wirth; Lectin-mediated biorecognition as a novel strategy for targeted delivery to bladder cancer; *Journal of Urology* 186 (2011) 1481-1488
- [M] Halina Lis and Nathan Sharon; Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition; *Chem. Rev.* 1998, 98, 637-674
- [N] C. Schubert Wright, G. E. Kellogg; Differences in hydrophobic properties of ligand binding at four independent sites in wheat germ agglutinin-oligosaccharide crystal complexes; *Protein Science*(1996). 5: 1466-1476
- [O] Neutsch L., Eggenreich B., Herwig E., Marchetti-Deschmann M., Allmaier G., Gabor F., Wirth M., Lectin Bioconjugates trigger urothelial cytoinvasion - A glycotargeted approach for intravesical drug delivery; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 82 (2012) 367-375
- [P] Jack W. Singer, B. Baker, P. de Vries, A. Kumar, S. Shaffer, E. Vawter, M. Bolton, P. Garzone; Poly-(L)-Glutamic Acid - Paclitaxel (CT-2103) [XYOTAX™], a biodegradable polymeric drug conjugate; *Advances in experimental medicine and biology*, (2003) 519: 81-99
- [Q] Bioconjugate Techniques; Greg T. Hermanson
- [R] A. Kanai, M. Epperly, L. Pearce, L. Birder, M. Zeidel, S. Meyers, J. Greenberger, W. de Groat, G. Apodaca, J. Peterson; Differing roles of mitochondrial nitric oxide synthase in cardiomyocytes and urothelial cells; *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H13-H21, (2004)

Anhang A:

To be submitted to EJPB

Poly – (L) – glutamic acid drug delivery system for the intravesical therapy of bladder cancer using WGA as targeting moiety

Apfelthaler C, Anzengruber M, Gassenbauer P, Gabor F, Wirth M*

Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, University of Vienna, Althanstraße 14, 1090 Wien, Austria

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

Keywords:

Drug Delivery, Conjugate, Lectin, Wheat Germ Agglutinin, Poly-(L)-glutamic acid, Urothelium, Intravesical Therapy

Abstract

In the management of bladder cancer, surgical resection of the tumour is usually followed by intravesical instillation of immunomodulatives and/or chemotherapeutics. The purpose of this local intravesical therapy is to eliminate residual malignant cells after surgical intervention. The main limitation of a localised adjuvant therapy is the insufficient concentration of the active pharmaceutical ingredient (API) in malignant cells due to the unique structure of the human urothelium making it an exclusively hard to overcome barrier in the human body. Different strategies such as electromotive drug administration or local hyperthermia are employed to ameliorate intravesical drug uptake. Previous studies on biorecognitive targeting showed promising results for lectin-, especially wheat germ agglutinin (WGA), mediated drug delivery. Here, we present a targeted conjugate that provides enough binding sites for a possible API as well as high cytoadhesive and cytoinvasive potential. The conjugate is composed of three components: First WGA, as the targeting moiety, second poly-L-glutamic acid (PGA) as a polymeric backbone providing more than 300 possible binding sites for an API and third fluorescein cadaverine (Fc), a fluorescent dye we coupled to PGA rendering the PGA-WGA conjugate traceable. The conjugate was purified via size exclusion chromatography (SEC) and the WGA containing and therefore binding fraction of the conjugate was isolated. In flow-cytometric and fluorimetric experiments with single cells and cell monolayers, respectively, binding and internalisation of the conjugate with a high molecular weight (>100 kDa) could be demonstrated. Fractions of the conjugate without a WGA component showed neither binding nor internalisation potential. Microscopic colocalization studies with cell monolayers and single cells confirmed the cytoadhesive and cytoinvasive potential of the conjugate. In accordance with the results of specificity studies the interaction between the conjugate and the cell surface depended solely on the WGA component of the conjugate.

With the help of this targeted drug delivery system limiting factors of intravesical adjuvant therapy could eventually be overcome and thereby treatment efficacy of instillative chemotherapy could be improved. In addition, traceable drug conjugates might bear interesting advantages for theranostic purposes in the treatment of bladder cancer.

1. Introduction

Bladder cancer is one of the most prevalent cancerous diseases. In most cases, bladder cancer first appears as a non muscle invasive bladder cancer (NMBC). At this stage the tumour is accessible for surgical intervention [1][3]. Nevertheless, the rate of early recurrence is exclusively high and each recurrence bears the risk of cancer progression to a more aggressive, muscle invasive, stage [1][3]. This requires life-long follow up care, close patient monitoring and frequent retreatment, thus rendering bladder cancer one of the most expensive neoplastic disorders [1][3]. The high rate of recurrence might be due to remaining malignant tissue in the bladder cavity after surgical removal of the tumour. Therefore surgical resection is usually followed by repeated intravesical chemotherapy. The instillation of chemotherapeutics aims to eliminate all residual malignant cells while the local therapy avoids the negative effects of systemic drug exposure. Most commonly used chemotherapeutics are mitomycin C, doxorubicin, thiotepa, cisplatin, paclitaxel and gemcitabin [2][4].

The urothelium is a highly specialised epithelial tissue, lining the bladder cavity. It forms a high resistance barrier between urinary space and surrounding tissue. The unique construction of the bladder wall combined with covering plaques consisting of transmembrane proteins, the uroplakines, make it a particularly penetration hostile interface [5]. As a consequence, the advantages of local drug administration are diminished by the very poor urothelial drug uptake [6]. The main restraint of intravesical therapy is an insufficient concentration of the active pharmaceutical ingredient (API) in malignant cells, due to both, the high resistance of the bladder wall and the constant dilution with the permanently produced urine leading to a limited interaction probability between the API and the urothelial cells. These limitations are tried to be overcome by prolonging the residence time of the drug at the bladder wall or enhancing the permeation of the API into the urothelial cells. Sustained delivery can be accomplished by applying bioadhesive formulations like hydrogels or polymeric carriers such as chitosan or gelatine at the bladder wall [6]. Permeability of the urothelial tissue can be enhanced physically by electromotive drug administration or local hyperthermia [4][6]. A chemical elevation of tissue permeability can be achieved by co-administration of penetration enhancing substances such as dimethyl-sulfoxide (DMSO) [4]. In spite of these efforts, durable treatment impact is still low, demanding new biorecognitive approaches for tissue specific drug delivery.

Recent studies showed that lectins, carbohydrate-binding proteins, interact with certain carbohydrate components of the glycocalyx (glycoproteins and glycolipids) of urothelial cells [7]. This specific interaction is comparable to the FimH-mediated process of cell-binding and -invasion of uropathogenic E.coli (UPEC) via the carbohydrate mannose [9]. Several plant-derived lectins were

tested regarding their cytoadhesive and cytoinvasive potential. Wheat germ agglutinin (WGA) showed the most promising characteristics with a high urothelial binding and internalisation potential as well as low toxicity and a significant discrimination between healthy and malignant cells [7]. WGA binds specifically to N-acetyl-D-glucosamine and sialic acid, which are both highly present in the glycocalyx of urothelial cells [7][10].

According to Neutsch et al., WGA showed high cytoadhesive and cytoinvasive potential even when conjugated to fluorescence-labelled bovine serum albumin (fBSA) [8]. WGA itself possesses around 25 binding sites for API coupling. To enhance the API amount per WGA, we tried to develop a conjugate comprising WGA and a polymeric backbone, with a high number of possible binding sites for the API of interest. In this study, poly-L-glutamic acid (PGA) with a molecular weight of 45000 served as the polymeric backbone consisting of approximately 300 L-glutamic acids and therefore having enough free carboxylic groups for API coupling. PGA was bound to WGA via the spacer ϵ -aminocaproic acid (ϵ -ACA).

Compared to other polymeric backbone molecules in development, PGA has several advantages. Since PGA is a protein, it is biodegradable and therefore cleaved by proteolytic enzymes [11]. At physiological pH, PGA is a polyanion and after coupling of hydrophobic drug molecules PGA should enhance the water solubility of the resulting conjugate due to its ionic properties. Furthermore, PGA is non immunogenic, since it is a homopolymer and presents minimal antigenic epitopes [11]. PGA itself is fluorimetrically not detectable. In order to trace the intended WGA/PGA conjugate during cell-binding and internalisation experiments, we labelled PGA with the fluorescent dye fluorescein cadaverine (Fc). Moreover, by rendering the conjugate traceable, it could gain theranostic features bringing further advantages for patient treatment.

Here, we aim to successfully develop a traceable conjugate consisting of WGA and Fc-labelled PGA. Additionally, cell-binding capacity and potential internalisation of the conjugate to malignant urothelial cells are investigated.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Wheat germ agglutinin (WGA) from *Triticum vulgare* was obtained from Vector laboratories (Burlingham, USA), Alexa Fluor® 594-labeled WGA (aWGA) and HOECHST 33342 (HOECHST) from Invitrogen (Paisley, UK). Fluorescein-cadaverine ((5-((5-aminopentyl)-thioureidyl)-fluorescein, trifluoroacetate salt) was purchased from Biotium (Hayward, USA), poly-L-glutamic acid (PGA) from Alamanda Polymers, Inc. (Huntsville, Alabama, USA), N-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS) from Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonic acid (HEPES) from Th. Geyer GmbH&Co. KG (Renningen, Germany). 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDAC) and glycine were acquired from Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany). RPMI-1640 cell culture medium and dialysis tubing cellulose membrane (cut-off 12 kDa) were bought from Sigma Aldrich (USA). The gel filtration standard used for size exclusion chromatography was purchased from Bio-Rad Laboratories (USA) and Pronase E was obtained from Merck Millipore. Monensin sodium salt, ϵ -amino-n-caproic acid (ϵ -ACA) and all other chemicals used were obtained from Sigma Aldrich (Vienna, Austria). Phosphate buffered saline 3 mM (PBS) with Ca^{2+} and Mg^{2+} is composed of 0.13 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g KCl, 0.2 g KH_2PO_4 , 0.1 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 8.0 g NaCl, 0.764 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ diluted in 1000 ml purified water.

2.2. Cell culture

The 5637 cell line, established from a human urothelial carcinoma, was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, USA) and used between passages 38 and 70. Cells were cultivated in RPMI-1640 fortified with 10% fetal calf serum (Biochrom AG, Berlin, Germany), 0.5 mM L-glutamine and antibiotics at 37°C in a humidified 5% CO_2 /95% air atmosphere. According to supplier's instruction, cells were subcultivated using 0.25% trypsin/0.038% EDTA.

For monolayer studies, cells were seeded in 96-well microplates (Greiner, Kremsmünster, Austria) or on flexiPERM® (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) mounted glass coverslips at a density of 17 000 cells per well.

2.3. Preparation of the WGA-PGA-Fc conjugate

The conjugate was synthesised according to an optimised protocol as described by Greg T. Hermanson [14]. The conjugate produced consists of three components. The first component is wheat germ agglutinin (WGA), a lectin which serves as a targeter, the second is fluorescein cadaverine (Fc), a fluorescent dye to visualize and track the conjugate, and the third is poly-L-glutamic acid (PGA) which serves as the backbone of the conjugate. Fc is bound to the carboxylic-groups of the PGA backbone. WGA is connected to PGA via the carboxylic groups of a linker (ϵ -aminocaproic acid). The conjugate was synthesised via a two step reaction using an EDAC/sulfo-NHS method [14].

First, the 300 carboxylic-groups (binding sites) of PGA (45000 g/mol) were activated using EDAC/sulfo-NHS to subsequently bind Fc as well as ϵ -aminocaproic acid (ϵ -ACA) to provide sufficient carboxylic groups with adequate accessibility for subsequent WGA coupling. Briefly, 1 mg PGA was dissolved in 250 μ l 20 mM HEPES/NaOH (HEPES), pH 7.0 and activated with 4 mg EDAC (3.8-fold molar excess referring to the amount of binding sites of PGA) and 1.4 mg sulfo-NHS. The reaction mix was stirred for one hour.

Next, different amounts of Fc were coupled to find the optimal amount necessary to visualise PGA. For this reason it was tried to couple Fc to 10%, 3%, 1.6% or 0.8% of the PGA binding sites. Therefore, 0.49 mg, 0.147 mg, 0.0799 mg or 0.039 mg Fc, respectively, were dissolved in 80 μ l HEPES, pH 8.6 each and added to the activated PGA. ϵ -ACA was coupled to the remaining activated carboxylic groups and served as binding site for the subsequent WGA coupling. Therefore, ϵ -ACA (0.8 mg) was dissolved in 50 μ l HEPES, pH 8.6 and added to the reaction mix. If necessary the reaction mix was adjusted to a pH ≥ 8 and stirred for two hours. To saturate all activated carboxylic groups, an excess of ϵ -ACA was added to the reaction and stirred for another hour. To remove excessive coupling agents, the reaction mix was dialysed against HEPES, pH 7.0. After dialysis, the free carboxylic groups of the before coupled ϵ -ACA were activated using the same activation procedure and amounts of EDAC/sulfo-NHS as described before. In the following coupling step, a 2.5-fold molar excess of WGA (2 mg) referring to the amount of PGA was dissolved in 500 μ l HEPES, pH 8.6 and added to the reaction mix. Again the pH-value was adjusted to pH ≥ 8 . The reaction mix was stirred for at least two hours. For final saturation of still reactive carboxylic groups, 3 mg of glycine were dissolved in 50 μ l HEPES, pH 8.6 and added to the reaction mix. One hour of saturation was followed by exhaustive dialysis against HEPES, pH 7.0.

Purification of the final conjugate was achieved by size exclusion chromatography (SEC). Therefore, 1 ml of conjugate was applied to a HiLoad 16/600 Superdex 200 pg column and eluted with isotonic

HEPES, pH 7 at a flow rate of 1 ml/min. Fractions of a volume of 1.2 ml each, were collected and the relative fluorescence intensity (RFI) of each fraction was assessed at 485/525 nm (ex/em) using a microplate reader (InfinitePro M200 Fluorometer (TECAN, Gröding, Austria)). According to the elution profile and the corresponding RFI of each fraction, peaks were pooled, dialysed against distilled water and subsequently lyophilised. The lyophilised peaks were dissolved in isotone HEPES, pH 7.0 and adjusted to an RFI of 7300 for comparison reasons. For further experiments, the conjugate was used before and after SEC purification. To prevent bleaching of the fluorophore all reactions were carried out under protection from light at room temperature.

2.4. Binding and internalisation of the fluorescence labelled PGA-WGA-conjugate

Binding properties and potential internalisation of the conjugate were examined using both, 5637 single cells and monolayers. Binding studies were performed at 4°C to keep cells in a metabolically quiescent state; hence active transport into the cells is limited. Whereas internalisation studies were performed at 37°C to enable active transport of the conjugate into the endosomal and/or lysosomal compartments of the cells.

For the single cell assay, 100 µl cell suspension (6×10^6 cells/ml) were incubated with the same volume of the respective conjugate (RFI 7300) for 30 minutes at 4°C (pulse incubation). Unbound conjugate was removed by washing three times with 400 µl of cold PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$), subsequent centrifugation (1000 rpm, 5 min) and careful aspiration of the supernatant. The suspension was divided in two equal parts and chase incubated for 30 minutes either at 4°C or 37°C. The RFI was assessed at 488/525 nm using flow cytometry (Gallios, Beckman Coulter, Brea, USA). A forward versus side scatter gate was used to confine analysis of single cells only and exclude aggregates and debris.

For monolayer experiments, 5637 cells were cultivated in 96-well plates. Confluent cell layers were washed three times with 100 µl cold PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) to remove cell medium. Subsequently, each well was loaded with 50 µl of the respective conjugate or isotonic HEPES, pH7.0 as a negative control. Monolayers were pulse incubated for 30 minutes at 4°C. Unbound conjugate was removed by washing with cold PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$). Cell-bound RFI was assessed at 485/525 nm (ex/em) via fluorimetry using a microplate reader (InfinitePro M200 fluorometer (TECAN, Gröding, Austria)) followed by chase incubation for 30 minutes at 37°C. Prior to each RFI measurement, the supernatant was exchanged by fresh, cold PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$).

2.5. Colocalization analysis

For colocalization analysis, 5637 cells were used as single cells and monolayers. To allow discrimination between potential binding and internalisation of the conjugates, cell membrane and cell nucleus were labelled with fluorescent markers. Cell nucleus and the cell membrane were stained with the DNA-specific fluorescent dye HOECHST 33342 and alexa-WGA (aWGA), respectively. For monolayer imaging studies, cells were grown to confluence on flexiPERM® mounted glass coverslips. Once confluent, the monolayers were washed with cooled buffer (PBS with $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) and then loaded with 50 μl of the respective conjugate including the HOECHST 33342 dye (final concentration 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), followed by incubation for 30 minutes at 4°C. For single cell imaging studies, the cell suspension was adjusted to a concentration of 6 million cells per millilitre. Subsequently, 50 μl of cell suspension and the same volume of conjugate were mixed and incubated together with HOECHST 33342 (final concentration 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 30 minutes at 4°C.

A potential internalisation was then analysed as follows: single cells and monolayers were thoroughly washed with cold buffer then chase incubated at 37°C for 30 minutes to enable active transport of the conjugate into the cells. After another washing step, cells were cooled prior to incubation with the membrane stain aWGA (final concentration 130 pmol/ml) for further 30 minutes at 4°C. Colocalization was analysed after a final washing step using a Zeiss Epifluorescence Axio Observer.Z1 deconvolution microscopy system (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

For analysis of mere binding to the cell surface, aWGA (final concentration 130 pmol/ml) was added to the first incubation step and incubated together with the single cell suspension or monolayer, the respective conjugate and HOECHST 33342 at 4°C for 30 minutes. Incubation was followed by a thorough washing step and subsequently the cytoadhesive capacity of the conjugate was determined using a Zeiss Epifluorescence Axio Observer.Z1 deconvolution microscopy system.

2.6. Cleavage of the conjugate by Pronase E

Pronase E is a mixture of proteolytic enzymes isolated from *Streptomyces griseus*. Pronase E hydrolyses proteins into individual amino acids. It cleaves ester and amide bonds [12][13]. According to the supplier, one unit is defined as the amount of enzyme that will liberate a digestion product equivalent to 25 μg of tyrosine per minute at 40°C, pH 7.5. One gram of Pronase E contains about $4 \cdot 10^6$ proteolytic units [16].

An aliquot (100 μl) of the conjugate was incubated at 37°C over a period of 47 days with a 50-70 fold excess of Pronase E referring to the amount needed by definition. Therefore, 95 μg of Pronase E

were dissolved in 95 μ l isotonic HEPES, pH 7 and added to the conjugate. Peptide bonds are thereby cleaved and potentially masked Fc can be quantified. RFI of the sample was assessed via fluorimetry in regular intervals. Cleavage experiments were carried out in triplicates. Possible effects of Pronase E on the fluorescence intensity of Fc were monitored by incubating 100 μ l of an Fc solution ($0.000208 \text{ M} \pm 0.15 \text{ mg/ml}$) with the same amount of dissolved Pronase E as used for the samples.

2.7. Specificity of the conjugate-cell interaction

Sugar specificity of the conjugate-cell interaction was verified via binding studies in presence of the competitive inhibitor N,N',N''-triacylchitotriose, a carbohydrate with highest affinity for WGA. 25 μ l of a 5637 cell suspension (12×10^6 cells/ml) were incubated with 50 μ l of the conjugate and 25 μ l of PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) containing different amounts of inhibitor (0.2 mM - 4 mM) for 30 minutes at 4°C. PBS without inhibitor served as positive control. RFI was assessed via flow cytometry.

3. Results and discussion

3.1. Preparation and Purification of the WGA-PGA-Fc conjugate

For conjugate preparation, WGA was coupled to fluorescence labelled PGA. In previous studies WGA showed a high binding and internalisation potential to malignant urothelial cells (5637-cells) even when coupled to fluorescence-labelled bovine serum albumin (fBSA) [8]. To elucidate the potential of WGA for rendering the PGA-Fc conjugate cytoadhesive, a conjugate with WGA and a molar ratio of 5 Fc per PGA was produced via an EDAC/sulfo-NHS method as described above (see section 2.3), then purified by dialysis, fractionated via SEC (à 1.2 ml) and finally each fraction was fluorimetrically analysed (Fig. 1).

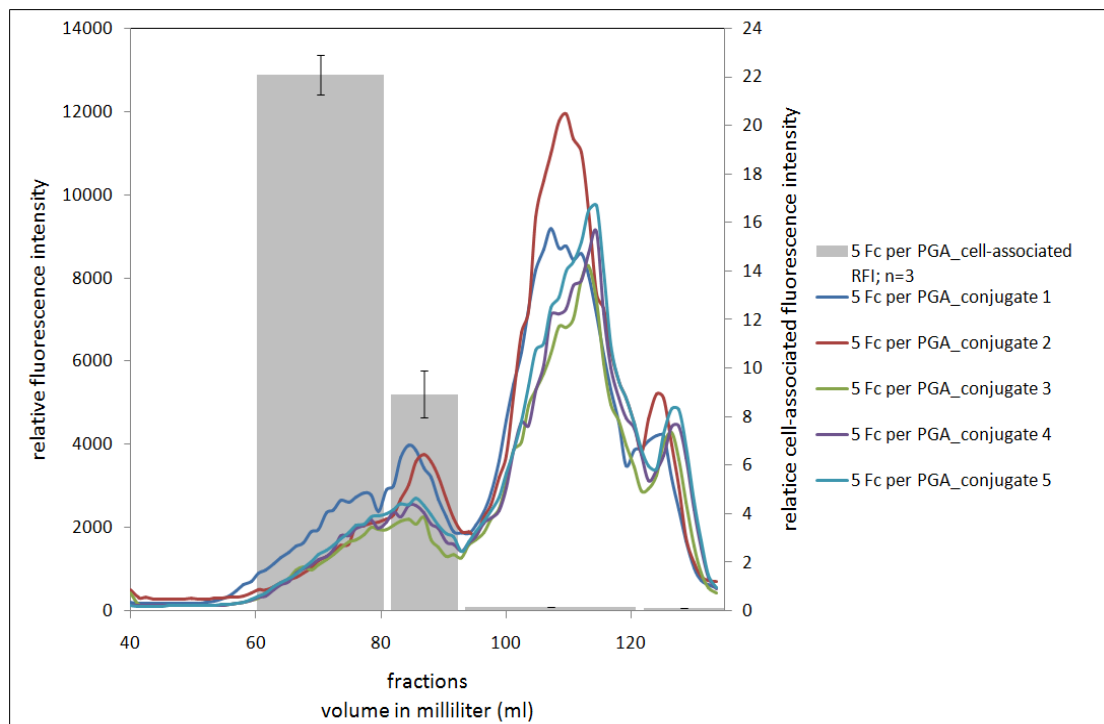


Figure 1: RFI profile of the individual fractions (1.2 ml) after purification via SEC and cytoadhesive potential of, according to elution profile and RFI, pooled fractions. Conjugates prepared with 5 Fc per PGA were purified via SEC and the RFI of the individual fractions was assessed fluorimetrically. Fractions were pooled according to their elution profile. Binding potential was determined via 5637-single cell binding studies (n=3).

The fluorimetric analysis of the individual fractions showed different peaks, suggesting a heterogeneous grade of modification. Considering the fluorescence intensities of the elution profile, fractions were pooled and treated as described above (see section 2.3). Cell-binding potential of each peak was analysed via flow cytometry as described in section 2.4. Results showed clearly that fractions eluting between 60 and 80 ml have an auspicious potential to interact with the cell surface (Fig. 1). According to a calibration standard (Gel Filtration Standard; Bio-Rad), this binding peak corresponds to an approximate size of 160 kDa (see annex 1). Fractions eluting from 90 ml onwards did not show any interaction with the cell surface. This indicates that fractions eluting after 90 ml consist only of PGA and Fc, which explains the missing binding potential despite its fluorescence. This hypothesis was confirmed by additionally prepared conjugates with only PGA and Fc, which eluted in one single peak between 90 and 120 ml and did not show any cell binding ability. On the contrary, fractions eluting between 60 and 80 ml seem to contain the additional WGA component owing to the promising results of cell-binding assays. Therefore solely the additional coupling of WGA enabled the PGA-Fc conjugate to interact with the cell surface.

Moreover, according to the akin elution profile of individually produced conjugates as well as the comparable RFI values of the fractions collected, separately prepared conjugates presented a high reproducibility for both, preparation and purification of the conjugates (Fig. 1).

3.2. Influence of the Fc/PGA ratio on the conjugate characteristics

To determine the number of Fc per PGA necessary for optimal traceability, we produced further conjugates with 30, 9 and 2.5 Fc per PGA. With these amounts 90%, 97%, and 99.2% of PGA binding sites, respectively, are still available for subsequent WGA and prospective API coupling.

Conjugates were produced and purified as described earlier (see section 2.3). The benefit of SEC purification was evaluated via single cell binding assays (see section 2.4). In these studies, the cytoadhesive capacity of the isolated binding peak (60-80 ml) of each conjugate was analysed and compared to the binding ability of the respective conjugate prior to SEC purification. The results present an at least fourfold higher cell-bound RFI for the purified conjugates compared to the non-purified conjugates, hence the isolation of the binding fraction via SEC purification is essential (Fig. 2).

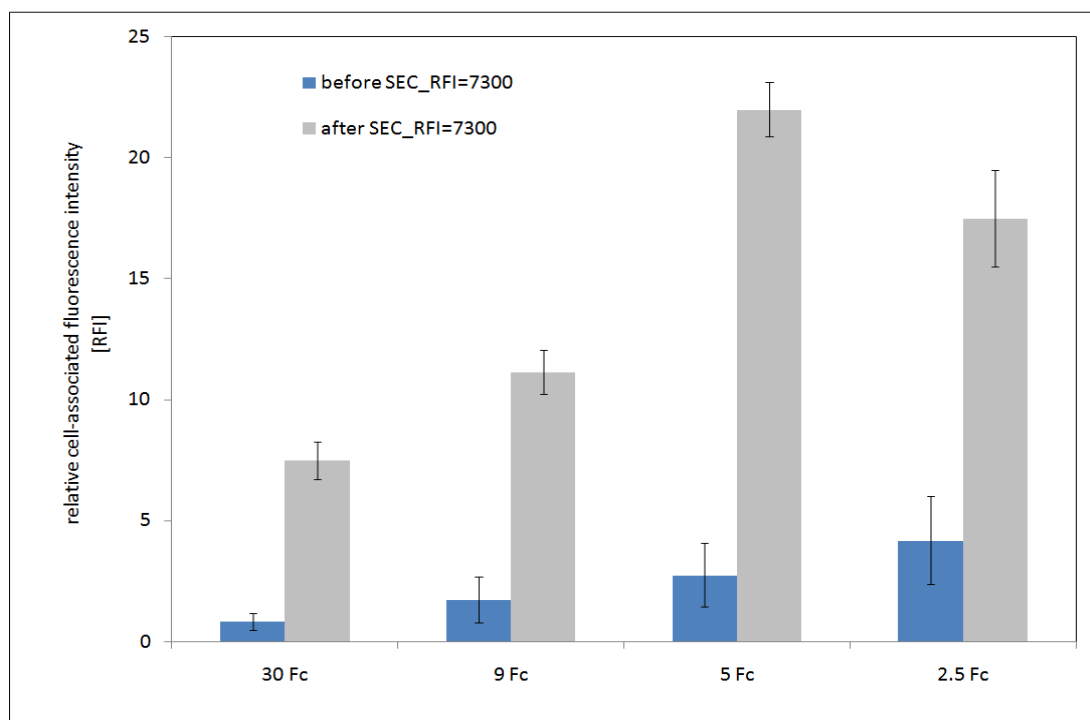


Figure 2: Comparison of cytoadhesive potential of conjugates before and after SEC and of conjugates with a different Fc/PGA ratio. Binding capacity of conjugates was assessed via flow cytometry in 5637-single cell binding assays. The cytoadhesive potential of conjugates prepared with varying amounts of Fc per PGA was compared before and after purification via SEC. RFI of all conjugates was adjusted to 7300.

The influence of different amounts of Fc per PGA on conjugate visibility was analysed in flow cytometric experiments. Surprisingly, conjugates prepared with more than 5 Fc molecules per PGA showed a significantly lower cell-bound RFI (Fig. 2). Conjugates with 5 Fc molecules per PGA showed the highest cell-bound RFI (22.1 ± 0.8). Cell-associated RFI of conjugates with 2.5, 9 and 30 Fc per PGA was 17.5 ± 1.9 , 11.2 ± 0.9 and 7.5 ± 0.8 , respectively (Fig. 2).

To clarify why the fluorescence intensity of conjugates prepared with more than 5 Fc per PGA was reduced, the conjugates were incubated with Pronase E as well as with different chaotropic agents for several days at 37°C.

Chaotropic agents disrupt the hydrogen bonding network and thereby reduce the amount of order among water molecules in the hydration shell around proteins. The structure of proteins strongly depends on hydrogen bonds and hydrophobic interactions. By interfering with these effects, chaotropic agents lead to destabilization and in higher concentration to denaturation of the native state of the protein [15]. To restore potentially masked fluorescence, conjugates were treated for four days with aqueous solutions of selected chaotropic agents, in particular Urea 8M, Guanidinium

hydrochloride 4M and Magnesium chloride 2M. None of them had any effect on the fluorescence intensity of the conjugate.

To detect any possible quenching effects, conjugates without SEC-purification were incubated with the enzyme Pronase E. Quenching describes the phenomenon of deletion of fluorescence without destruction of the fluorophore and might occur for instance when Fc molecules are coupled to proteins. The dimension of the quenching effect depends on the degree of substitution [14]. As described above (see section 2.6), Pronase E cleaves ester and amide bonds and therefore might reduce the quenching effect by minimizing the degree of substitution and cleaving the PGA molecules.

During incubation of the conjugate with Pronase E at 37°C, the fluorescence intensity raised strongly proving the presence of more Fc molecules per PGA than initially detectable (Fig. 3).

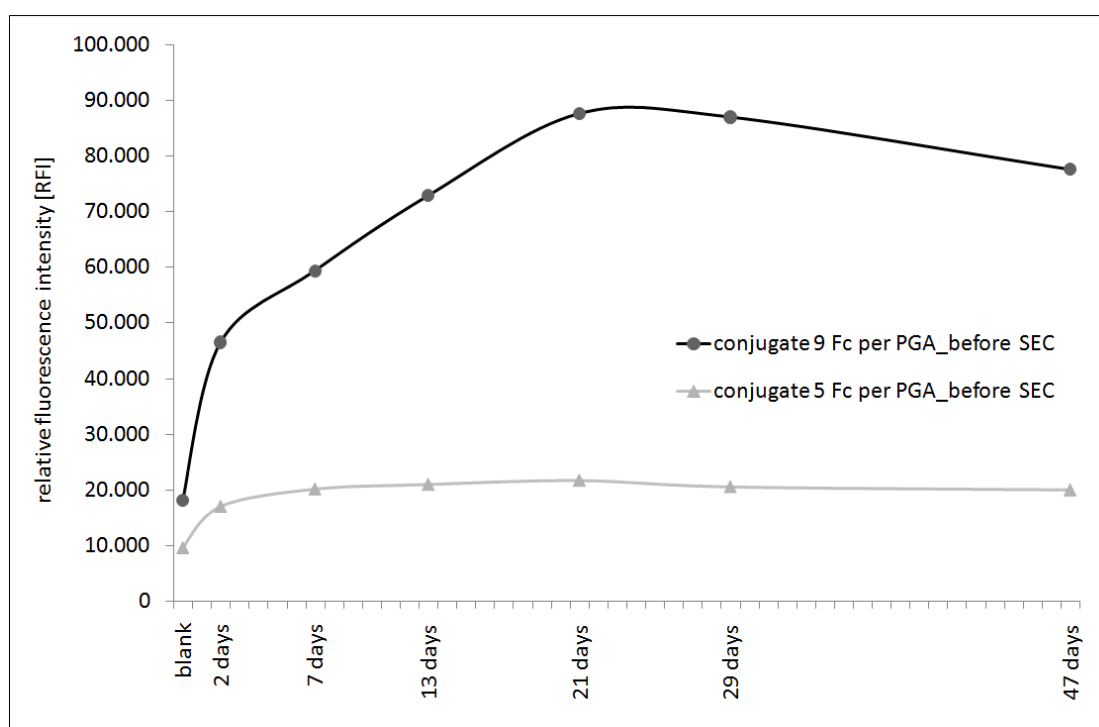


Figure 3: Elevation of RFI due to enzymatic cleavage of conjugate with Pronase E. To detect a possible reduction in fluorescence intensity due to quenching effects, conjugates prior to SEC were incubated with Pronase E at 37°C for several days. Fluorescence intensity was assessed in intervals over a period of 47 days. Based on the initial RFI values, the fluorescence intensity of conjugates prepared with 5 Fc per PGA doubled and RFI of conjugates prepared with 9 Fc per PGA quadruplicated.

The fluorescence intensity of conjugates produced with 5 Fc per PGA doubled whereas the RFI of conjugates prepared with 9 Fc per PGA quadruplicated and generally reached a maximum after 20 days of incubation. Based on the results of the Pronase experiment and the premise that Fc is equally distributed among the PGA molecules, the quantity of Fc molecules bound to PGA was calculated using an Fc calibration curve (Fig. 8) (calculation see annex 2).

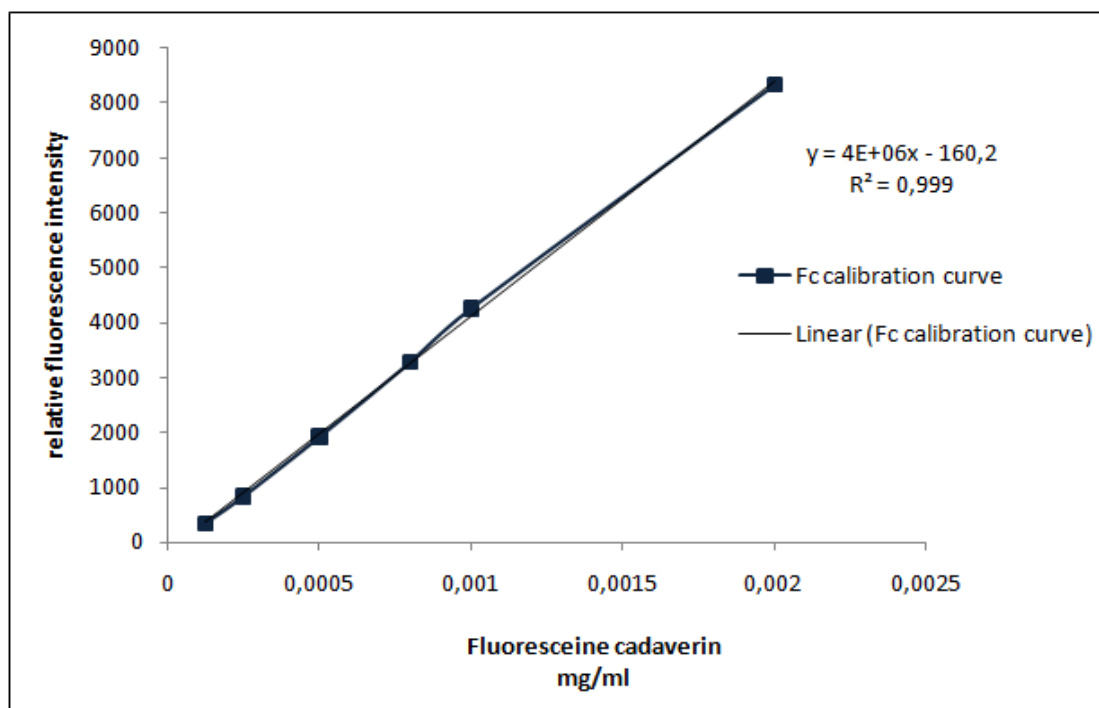


Figure 8: Fluorescein cadaverine calibration curve

The actual number of Fc molecules coupled per PGA molecule was 3.2 and 1.2 for conjugates with a molar ratio of 9 Fc and 5 Fc molecules, respectively. As stated by Hermanson et al. quenching occurs when more than 5 Fc molecules are bound to a protein [14], however, the WGA-PGA-Fc conjugates produced in this work exhibited quenching at an even lower degree of substitution.

Any speculations that the cell-associated RFI of conjugates produced with more than 5 Fc per PGA is reduced due to inferior conjugate-cell interaction because of insufficient WGA coupling during conjugate preparation can be excluded. Considering, that 30 Fc per PGA lead to a maximum occupation of only 10% of PGA binding sites during conjugate preparation and therefore leaving 90% (275 binding sites) of the carboxyl groups for ϵ -ACA binding and subsequent WGA coupling, we conclude, that the reduction of cell-associated RFI results solely from quenching effects as described above.

All in all, conjugate preparation with 5 Fc per PGA leads to an average substitution rate of 1.2 Fc per PGA thus labelling every single PGA molecule. In addition, these conjugates also revealed prominent cell binding characteristics as demonstrated by the highest cell-bound RFI. Using more than 5 Fc per PGA for conjugate preparation does not result in an improved traceability, using less than 5 Fc per PGA leads to a reduced cell-associated RFI probably due to an insufficient labelling of PGA molecules. Furthermore, since only one PGA binding site is occupied by Fc, 99.6% of the carboxyl groups are available for API coupling. Accordingly, conjugates with 5 Fc per PGA were used for detailed experiments.

3.3. Internalisation of the WGA-PGA-Fc conjugate

After purification of the conjugate through SEC, the different peaks were analysed regarding their cell binding capacity and potential internalisation into single cells and monolayers. An internalisation induced quench would suggest an uptake of the conjugate into acidic compartments (late endosomes/lysosomes). Accordingly, cytoinvasion of the conjugate was assessed by measuring any decrease of fluorescence intensity via fluorimetry and flow cytometry for monolayers and single cells, respectively.

Previous experiments revealed that WGA is able to internalise into 5637 cells and moreover induces endocytosis of coupled conjugates even with high molecular weight [7] [8]. In accordance with these findings, cytoinvasive properties were detected for the WGA containing peak (60-80 ml) only. Fractions of the conjugate eluting from 90 ml onwards showed neither binding nor internalisation properties indicating that these fractions contain conjugates without the WGA component. In single cell experiments, internalisation of the WGA-PGA-Fc conjugate was observed irrespective of the Fc amount per PGA (Fig. 4). After incubation at 37°C, to allow for active transport of the conjugate into the cell too, the cell-associated RFI of each conjugate was reduced by $21\% \pm 1.1\%$ compared to the cell-associated RFI after incubation at 4°C. As described before (see section 3.2) conjugates prepared with a molar ratio of 5 Fc per PGA showed a higher cell-associated RFI than conjugates with 30, 9 or 2.5 Fc per PGA.

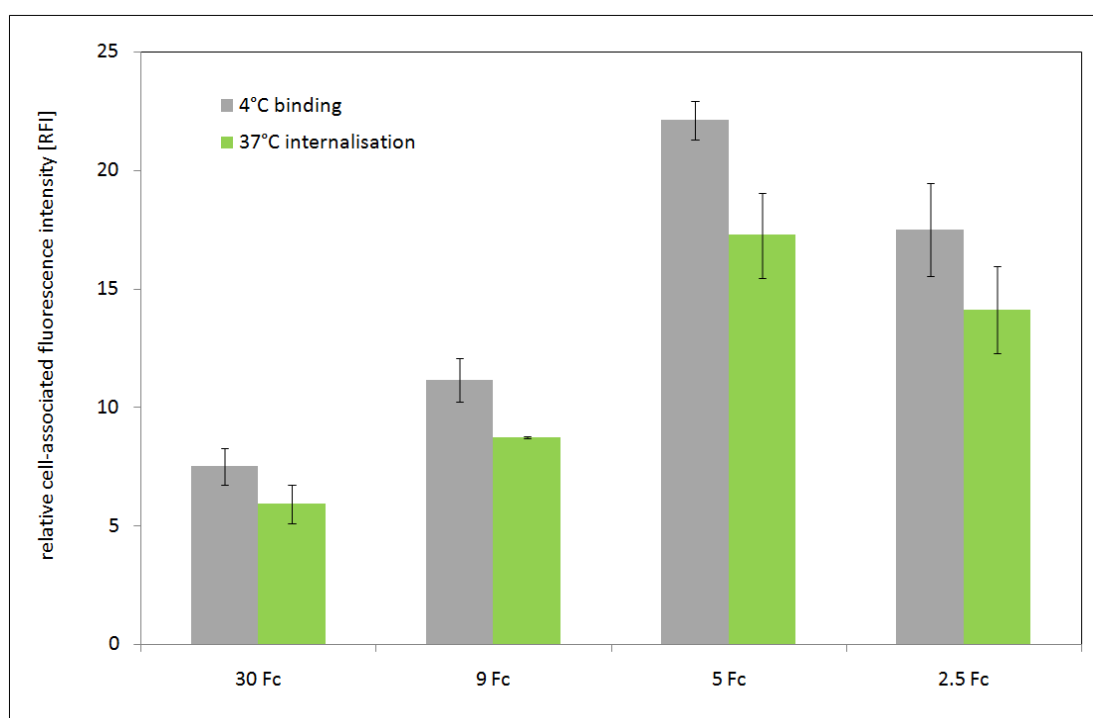


Figure 4: Single-cell assay of cytoadhesive and cytoinvasive potential of the binding peak of conjugates with a different Fc/PGA ratio. After purification of conjugate via SEC and pooling of the binding fractions (60-80 ml), the cytoadhesive and cytoinvasive potential of conjugates with a different Fc/PGA ratio was compared. Cell binding (30 min, 4°C) and internalisation (30 min, 37°C) was determined in 5637-single cell assays and cell-associated fluorescence intensity was assessed via flow-cytometry.

Monolayer binding and internalisation studies with the different peaks of the conjugate corroborated the results of single cell experiments. Again, only the WGA containing peak of the conjugate showed significant cytoadhesive and cytoinvasive capacity with a cell-associated fluorescence intensity of 1221 ± 87 at 4°C and 910 ± 52 at 37°C. Cell-associated fluorescence intensity of fractions without the WGA component (cytoadhesion 96 ± 2 , cytoinvasion 80 ± 2.5) was comparable to the RFI of cells incubated with isotonic HEPES, pH 7 (83.7 ± 1.7 at 4°C and 73 ± 1.5 at 37°C) (Fig. 5).

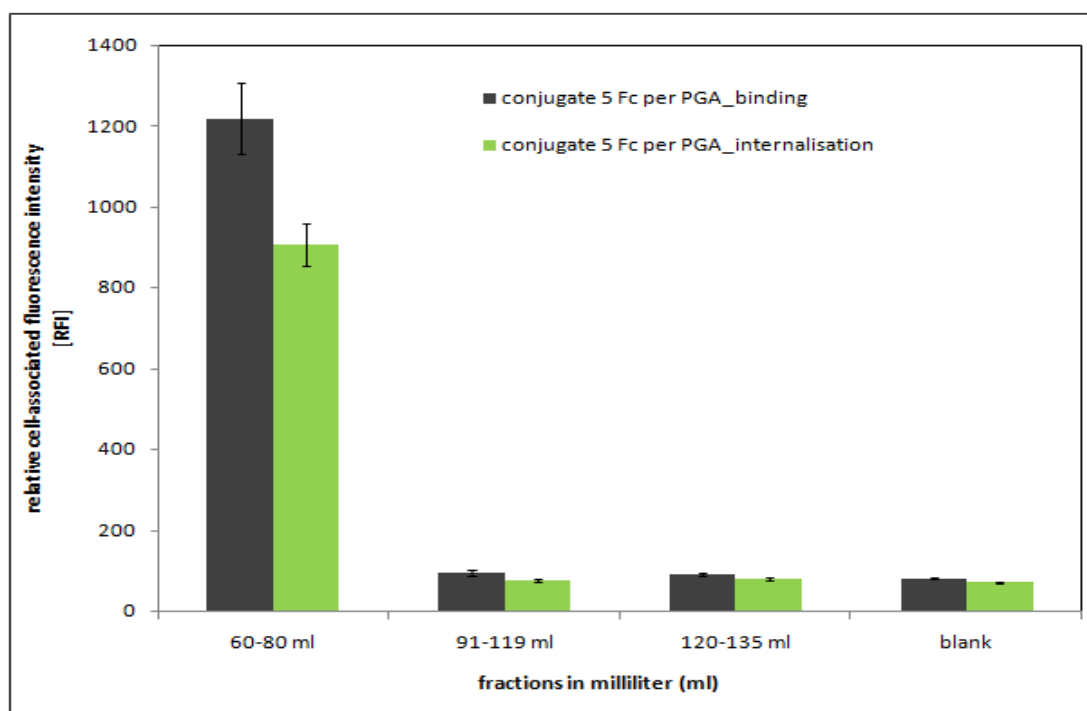


Figure 5: Determination of cell binding and internalisation potential in 5637 cell monolayer experiments. Cytoadhesive and cytoinvasive potential of the different peaks of conjugates (5 Fc per PGA) was assessed in 5637 cell monolayer binding (30 min, 4°C) and internalisation (30 min, 37°C) assays. The biologically active fraction of the conjugate elutes between 60 and 80 ml. (n=3)

Restoration of the acidic quench of fluorescence can be achieved by equilibrating the pH-gradient between cytoplasm and acidic compartments via treatment of cells with the ionophore monensin (final concentration 16 µg/ml - 23 µM). In single cell as well as cell monolayer experiments only a modest restoration of the fluorescence intensity was observed, indicating also other uptake routes in addition to the acidic pathway via late endosomes and/or lysosomes. Thus, the conjugate is most likely not exclusively accumulated within acidic compartments of the cell.

3.4. Colocalization analysis

Imaging studies were carried out for further investigation of the binding and internalisation properties of the conjugate using single cells and monolayers. According to the protocol described previously (see section 2.5), cells were incubated with the respective conjugate at either 4°C or 37°C. Cell membrane and nucleus were stained with aWGA (red) and HOECHST 33342 (blue), respectively. For each experiment the membrane stain aWGA was incubated at 4°C to keep active transport processes to a minimum and restrict internalisation. Again the pooled peaks of the conjugate were tested regarding their binding capacity and potential internalisation. In microscopic analysis,

incubating cells with the WGA-containing fraction of the respective conjugate at 4°C resulted in binding of the conjugate to the cell surface as indicated by the green colour of the cell membrane (Fig. 6). When channels are merged, the green colour of the conjugate overlapped with the red colour of the membrane stain, aWGA, resulting in a yellow coloured cell membrane. A Pearson's correlation coefficient of 0.932 and 0.703 for single cell and monolayer experiments, respectively, was calculated indicating an almost complete overlay of the red aWGA and the green conjugate. This clearly shows that the peak between 60 and 80 ml is able to bind to the cell surface at 4°C. No internalisation was detectable at this temperature, suggesting that active transport processes are required for the internalisation of the conjugate into the cell. However, when the binding fraction was incubated with cells at 37°C, the conjugate accumulated in the cytosol as demonstrated by the green intracellular clusters located around the nucleus and inside the red stained cell membrane. A Pearson's correlation coefficient of 0.110 and 0.383 for single cells and monolayer, respectively, indicates a minimal degree of overlay and therefore confirms the internalisation of the conjugate into the cell. Hence, active transport processes facilitated the internalisation of the conjugate. Conversely, when cells were incubated with fractions of the conjugate eluting from 90 ml onwards, neither binding nor internalisation were detected. Solely the binding fraction exhibited cytoadhesive and cytoinvasive potential, all other pooled fractions showed no conjugate-cell interaction. These findings further support the conclusion that only the peak between 60 and 80 ml contains the WGA component which is crucial for cytoadhesion and subsequent cytoinvasion of the conjugate.

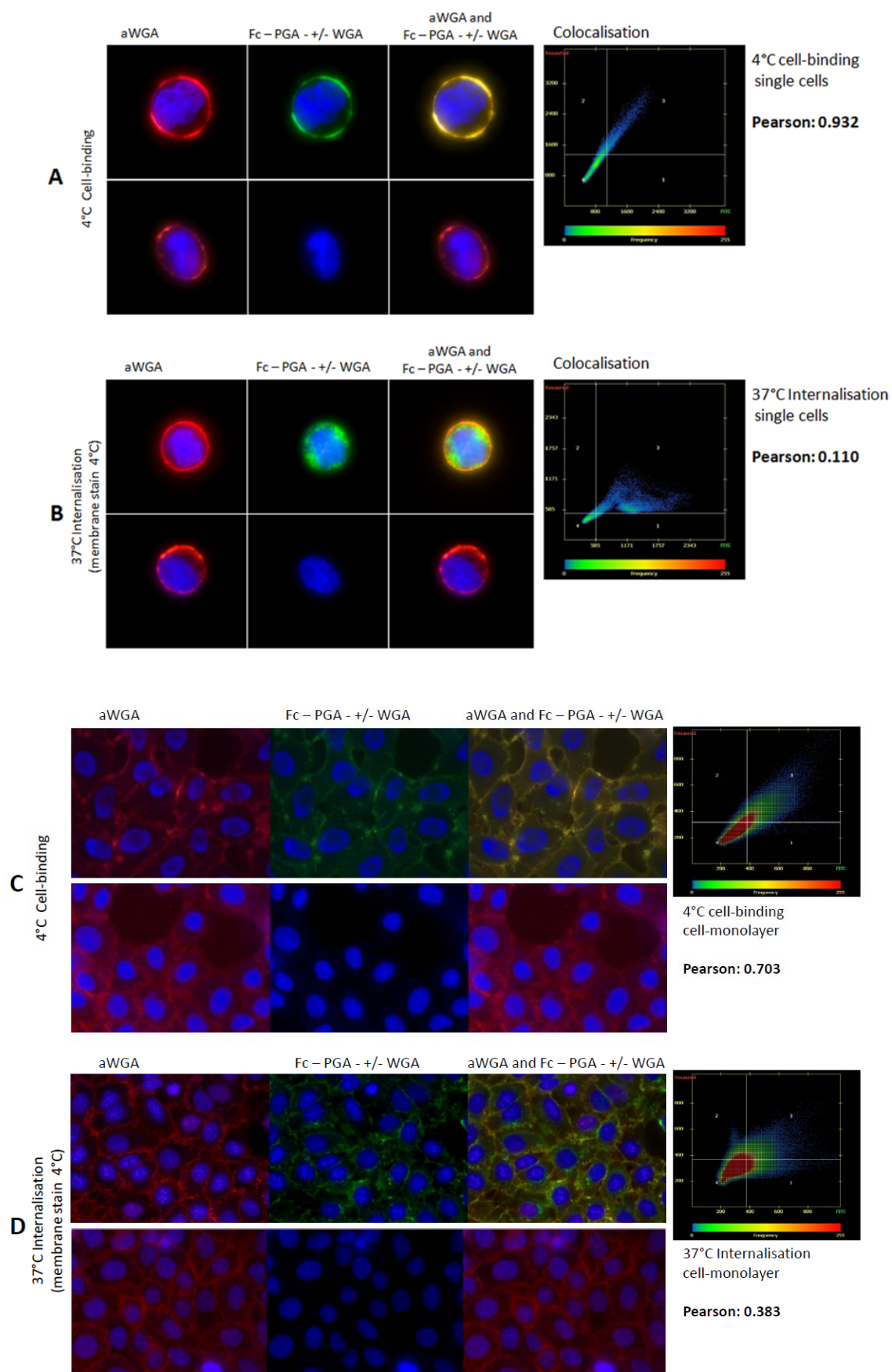


Figure 6: Microscopic analysis of conjugate binding and internalisation in 5637 single cells and cell monolayer. Pulse/chase experiments were carried out with the WGA containing peak and a peak

without the WGA component of the same conjugate. For cell-binding studies (A and C), single cells (A) and cell monolayers (C) were incubated with the respective peak of the conjugate, the nucleus stain HOECHST 33342 (blue) and the membrane stain aWGA (red) at 4°C for 30 minutes. Cytoadhesion is visible for the WGA containing peak of the conjugate (green). When channels are merged, the green colour, indicating the conjugate, overlaps with the red aWGA at the cell membrane. To determine energy-driven uptake of the conjugate (B and D), single cells (B) and confluent cell monolayers (D) were incubated with the respective conjugate and HOECHST 33342 at 4°C for 30 minutes followed by a washing step and further incubation for 30 minutes at 37°C. Cells were subsequently incubated with aWGA at 4°C for 30 minutes. The WGA containing peak was readily internalised (green) whereas the peak without the WGA component showed no internalisation potential. Colocalization of the conjugate was evaluated by calculating Pearson's correlation coefficient.

3.5. Specificity of the conjugate-cell interaction

The specificity of the conjugate-cell interaction was assessed in single cell binding studies in presence of a competitive inhibitor. N, N', N'' - triacetylchitotriose has a very high affinity to WGA and can thereby specifically inhibit the WGA dependent conjugate-cell interaction. In presence of rising concentrations of the inhibitor, the cell associated fluorescence intensity decreased exponentially from an RFI around 25 to an RFI below 4 (Fig. 7).

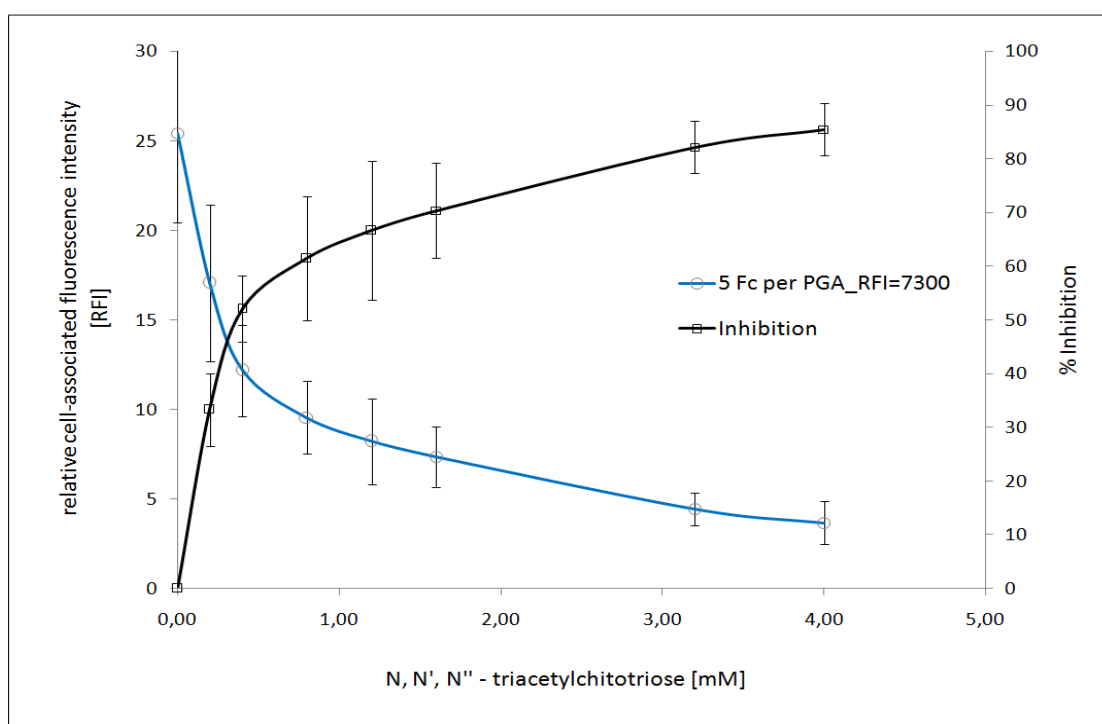


Fig. 7: Specificity of WGA cell interaction. The specificity of conjugate-cell interaction via the WGA component was assessed in 5637-single cell binding assays in presence of raising concentrations of the inhibitor N, N', N'' - triacetylchitotriose. The decreasing cell-associated fluorescence intensity was determined via flow-cytometry (n=3).

This corresponds to an inhibition of binding of up to 89%. Specific interactions between the WGA component of the conjugate and the complementary carbohydrate component at the cell membrane are therefore the main reason for the binding process and only a small amount of conjugate is bound via non-specific interactions.

4. Conclusion

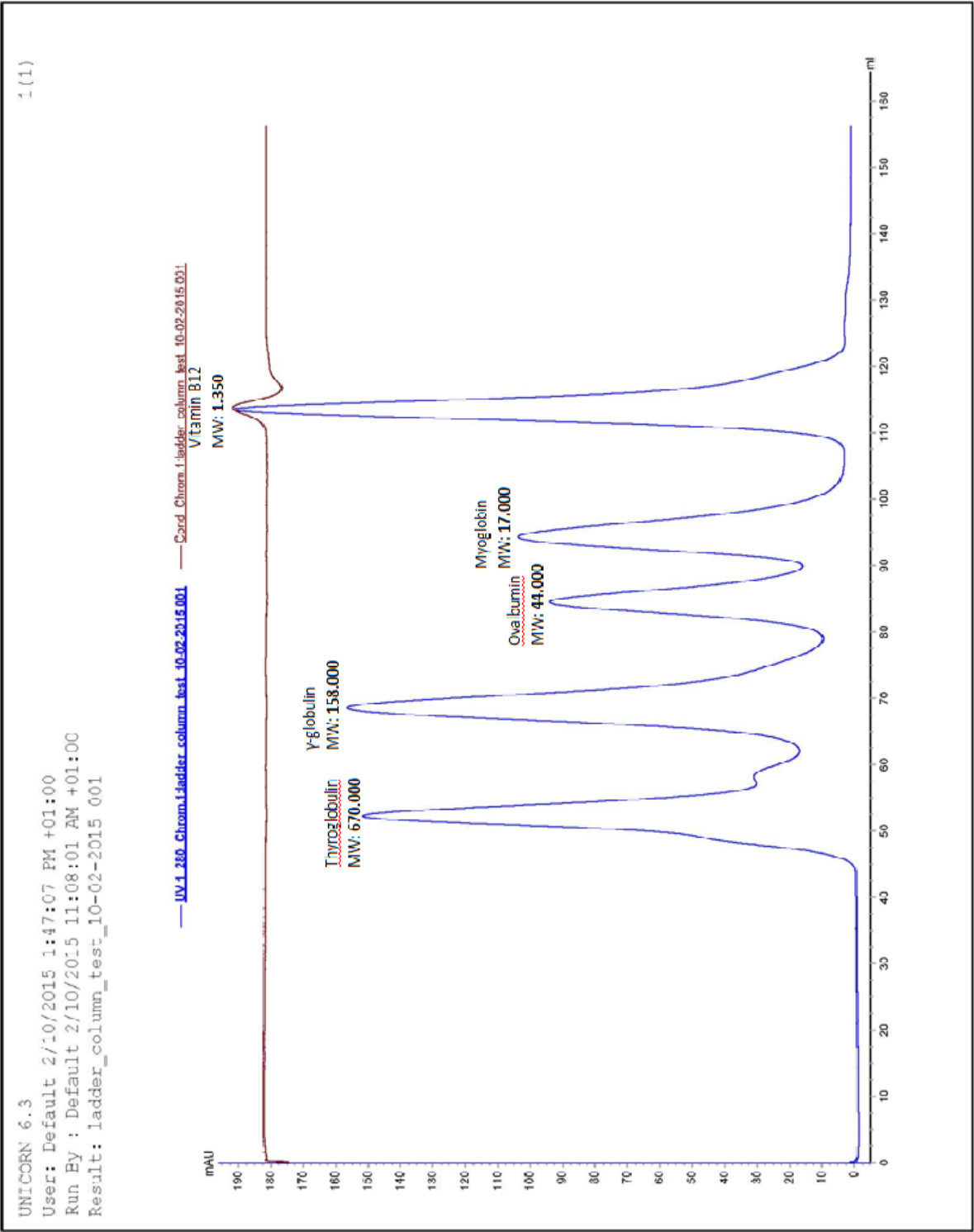
In the adjuvant intravesical therapy of bladder cancer, limiting factors, such as the high resistance of the bladder wall and the dilution with permanently produced urine, are the main reasons for insufficient accumulation of API in malignant cells. As a consequence treatment impact of current intravesical therapy is still low requiring innovative biorecognitive treatment strategies for tissue specific drug delivery. In this work we present a traceable drug delivery system of high molecular weight comprising WGA as the targeter, PGA as the backbone and Fc to render the conjugate traceable. In cell culture studies, successful binding and internalisation of the conjugate could be demonstrated. Our results indicate that the WGA component facilitates cytoadhesion and cytoinvasion of the conjugate and is therefore crucial for conjugate-cell interaction. Furthermore, the amount of Fc per PGA used for conjugate preparation was optimised which resulted in an average substitution rate of one Fc molecule per PGA. Thereby, the conjugate bears theranostic features since every PGA molecule is potentially traceable and, at the same time, the majority of PGA coupling sites is still available for WGA and API conjugation. Further experiments need to be conducted to evaluate the amount of API that can be loaded onto the PGA backbone of the conjugate without significant loss of binding and internalisation capacity. Due to its promising cytoadhesive and cytoinvasive characteristics as well as its theranostic potential, this Fc-labelled PGA-WGA drug delivery system represents an auspicious tool to overcome the limiting factors of intravesical therapy thereby leading to an enhanced efficacy of the drug. Moreover, this conjugate might even lower recurrence rates due to its targeting features.

References

- [1] B. W. van Rhijn, M. Burger, Y. Lotan, E. Solsona, C. G. Stief, R. J. Sylvester, J. A. Witjes, A. R. Zlotta; Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy; *European urology*, 56 (2009) 430-442
- [2] Donald S. Kaufman, William U. Shipley, Adam S. Feldman, Bladder cancer, *Lancet*, 374 (2009) 239-249
- [3] S. J. Dovedi, B. R. Davies, Emerging targeted therapies for bladder cancer: a disease waiting for a drug, *Cancer Metastasis Review*, 28 (2009) 355-267
- [4] Shruti Guha Sarkar, R. Banerjee, Intravesical drug delivery: Challenges, current status, opportunities and novel strategies; *Journal of Controlled Release*; 148 (2010) 147-159
- [5] Puneet Khandelwal, Soman N. Abraham, Gerard Apodaca, Cell biology and physiology of the uroepithelium, *American Journal of Physiology Renal Physiology*, (2009) Dec; 297(6): F1477-F1501
- [6] JPB Gasion, Juan Fernando Jimenez Cruz, Improving Efficacy of Intravesical Chemotherapy, *European urology*, 50 (2006) 225-234
- [7] L. Neutsch, V. E. Plattner, S. Polster-Wildhofen, A. Zidar, A. Chott, G. Borchard, O. Zechner, F. Gabor, M. Wirth; Lectin-mediated biorecognition as a novel strategy for targeted delivery to bladder cancer; *Journal of Urology* 186 (2011) 1481-1488
- [8] Neutsch L., Eggenreich B., Herwig E., Marchetti-Deschmann M., Allmaier G., Gabor F., Wirth M., Lectin Bioconjugates trigger urothelial cytoinvasion - A glycotargeted approach for intravesical drug delivery; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 82 (2012) 367-375
- [9] B. K. Dhakal, R. R. Kulesus and M. A. Mulvey; Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*; *European Journal of Clinical Investigation* 2008; 38 (S2): 2-11
- [10] C. Schubert Wright, G. E. Kellogg; Differences in hydropathic properties of ligand binding at four independent sites in wheat germ agglutinin-oligosaccharide crystal complexes; *Protein Science* (1996) 5: 1466-1476

- [11] Jack W. Singer, B. Baker, P. de Vries, A. Kumar, S. Shaffer, E. Vawter, M. Bolton, P. Garzone; Poly-(L)-Glutamic Acid - Paclitaxel (CT-2103) [XYOTAXTM], a biodegradable polymeric drug conjugate; *Advances in experimental medicine and biology*, (2003) 519: 81-99
- [12] <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/pronase/53965>
- [13] http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Pronase-E,MDA_CHEM-107433
- [14] Bioconjugate Techniques; Greg T. Hermanson
- [15] Giovanni Salvi, Paolo De Los Rios, Michele Vendruscolo; Effective Interactions Between Chaotropic Agents and Proteins; *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* 61: (2005) 492-499
- [16] <http://www.merckmillipore.com>

Annex 1: SEC gel filtration calibration curve



Annex 2: Fluorescein cadaverine quantification

Conjugate prepared with 5 Fc per PGA	
Total volume of conjugate	3,5 ml
RFI after 20 days of incubation with Pronase E (corrected by the dilution factor)	21713,3
Fc calibration curve	$y = 4 * 10^6 * x - 160,21$ $x (Fc) = 0,005468 \text{ mg/ml}$
Amount of Fc in total volume (3,5 ml)	0,01914 mg/3,5ml
Fc quantity used for conjugate preparation	0,0799 mg Fc $\triangleq$ 5 Fc per PGA
Fc yield	23,95% (0,01914 mg)
Actual amount of Fc per PGA	1,2 Fc per PGA
Conjugate prepared with 9 Fc per PGA	
Total volume of conjugate	2,4 ml
RFI after 20 days of incubation with Pronase E (corrected by the dilution factor)	87608
Fc calibration curve	$y = 4 * 10^6 * x - 160,21$ $x (Fc) = 0,021942 \text{ mg/ml}$
Amount of Fc in total volume (2,4 ml)	0,05266 mg/2,4 ml
Fc quantity used for conjugate preparation	0,147 mg Fc $\triangleq$ 9 Fc per PGA
Fc yield	35,82% (0,05266 mg)
Actual amount of Fc per PGA	3,2 Fc per PGA

