

MASTERARBEIT | MASTER'S THESIS

Titel | Title

Darstellung von BrijS20-Oligopeptid-Konjugaten zur
Oberflächenmodifikation von PLGA-Nanopartikeln

verfasst von | submitted by

Lore Mötz BSc

angestrebter akademischer Grad | in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra pharmaciae (Mag. pharm.)

Wien | Vienna, 2024

Studienkennzahl lt. Studienblatt | Degree
programme code as it appears on the
student record sheet:

UA 066 605

Studienrichtung lt. Studienblatt | Degree
programme as it appears on the student
record sheet:

Masterstudium Pharmazie

Betreut von | Supervisor:

ao. Univ.-Prof. i.R. Mag. Dr. Franz Gabor

Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor und ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth für die Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe zu arbeiten und für die äußerst freundliche Aufnahme in diese bedanken. Besonderer Dank gilt ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor für die Betreuung meiner Arbeit.

Außerordentlich bedanke ich mich bei Mag. Dr. Maria Anzengruber für ihre durchgehende Unterstützung, ihre kompetenten Ratschläge und ihr engagiertes Betreuen während der gesamten Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei Mag. Maria Lummerstorfer, BSc und Mag. Dr. Katharina Skoll bedanken, die mir ebenfalls immer sehr bemüht und hilfsbereit zur Seite gestanden sind.

Ich bedanke mich bei jedem in der Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft, vor allem bei meiner Schicksalsgefährtin Johanna für ihren seelischen Beistand.

Das angenehme Arbeitsklima, das zu jeder Zeit in der Gruppe herrschte, das viele gemütliche Beisammensein und die lustigen Momente, die wir zusammen hatten, werden mich immer freudig an die Zeit meiner Masterarbeit zurückblicken lassen.

Zuletzt möchte ich mich zutiefst bei meiner Familie, meinen Freunden und meinem Freund bedanken, die während meines Studiums für mich da waren, mich aufgeheitert und motiviert haben. Ich danke insbesondere meinen Eltern, die mir durch ihre finanzielle Unterstützung das Studium der Pharmazie ermöglicht haben. Ohne euch alle wäre es mir nicht möglich gewesen, dieses Studium zu absolvieren.

Abstract

Aufgrund der dichten Barrierefunktion der Harnblase gestaltet sich die Therapie von Harnblasenerkrankungen wie Harnwegsinfektionen oder Blasenkrebs als schwierig. Auch bei der intravesikalen Verabreichung von Therapeutika stellen die Verdünnung der Arzneistofflösung durch den ständig produzierten Urin und die geringe Permeabilität des Harnblasenepithels große Limitationen dar. Die Entwicklung neuer Arzneiformen, die selektiv an Strukturen in der Harnblase binden, somit die Aufnahme in die erkrankten Zellen verbessern und damit Nebenwirkungen reduzieren, ist daher essenziell. Diese zielgerichtete Wirkstoffabgabe könnte durch funktionalisierte Nanopartikel, die als Wirkstoffreservoir fungieren und deren Oberfläche mit bestimmten Targeting-Liganden modifiziert wurde, realisiert werden.

Im Zentrum dieser Masterarbeit steht die Herstellung von BrijS20-Oligopeptid-Konjugaten und die Herstellung von PLGA-Nanopartikeln, die dieses Konjugat als Oberflächenmodifikation enthalten. Es wurde ein Linker aus dem nicht-ionischen Tensid BrijS20 und Propargylamin, einem Alkin, hergestellt. Oligopeptide, wie das Tripeptid RGD und Teilpeptide aus der kohlenhydratbindenden Domäne des FimH von Escherichia Coli, dienten als Targeting-Liganden. Diese wurden mit einem Azid modifiziert, um die Peptide über eine Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition an den BrijS20-Alkin-Linker binden zu können. Mit dem so dargestellten BrijS20-Oligopeptid-Konjugat wurden oberflächenmodifizierte PLGA-Nanopartikel hergestellt, die Partikel anschließend charakterisiert sowie ihre Zellinteraktion untersucht. Die RGD-modifizierten PLGA-Nanopartikel zeigten im Vergleich zu nicht-modifizierten PLGA-Nanopartikeln eine höhere Zellbindungsrate. Zudem wurden die spezifischen Endozytosewege untersucht, mit denen PLGA-Nanopartikel in unterschiedliche Zellen aufgenommen werden, wobei der Clathrin-vermittelte Weg überwog.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	7
1.1.	Drug Targeting und Nanopartikel	7
1.1.1.	Das RGD-Tripeptid	8
1.1.2.	Endozytose von Nanopartikeln	8
1.2.	Die Harnblase	9
1.2.1.	Das FimH des Escherichia Coli	10
1.3.	Ziel der Arbeit	11
2.	Materialien und Geräte	12
2.1.	Verwendete Materialien	12
2.2.	Verwendete Geräte	13
2.3.	Verwendete Puffer, Medien und Lösungen	13
3.	Methoden, Ergebnisse und Diskussion	15
3.1.	Peptidsynthese	15
3.1.1.	Synthese des Tripeptids RGD	16
3.1.2.	Kopplung von 6-Azidohexansäure an die RGD-Sequenz	17
3.1.3.	Abspalten vom Harz	17
3.1.4.	Kopplung von 6-Azidohexansäure an die Teilpeptide des FimH von E. coli und deren Kontrollpeptide	18
3.2.	Herstellung eines BrijS20-Alkin-Konjugats	20
3.2.1.	Aktivierung von BrijS20 durch CDI	20
3.2.2.	Kopplung von BrijS20-CDI mit Propargylamin	21
3.3.	Click-Chemie – Herstellung eines BrijS20-Peptids über eine Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition	22
3.3.1.	Kopplung eines RGD-Azids an einen BrijS20-Alkin-Linker	23
3.3.2.	Kopplung eines FimH-Peptid-Azids an einen BrijS20-Alkin-Linker	23
3.4.	Herstellung und Charakterisierung von PLGA-Nanopartikel	25
3.4.1.	Herstellung von PLGA-Nanopartikeln	25
3.4.2.	Herstellung von Peptid-funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln	26

3.4.2.1.	Herstellung von BrijS20-RGD-Nanopartikeln	26
3.4.2.2.	Herstellung von BrijS20-FimH-Peptid ₁₋₁₀ -Nanopartikeln	27
3.4.3.	Herstellung von Folsäure-funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln	27
3.4.4.	Bestimmung der Größe, des PDI und des Zetapotentials	28
3.4.4.1.	Ergebnisse und Diskussion	28
3.4.5.	Quantifizierung der Peptidmenge in BrijS20-RGD-Nanopartikel	29
3.4.5.1.	Ergebnisse und Diskussion	30
3.4.6.	Quantifizierung der Peptidmenge in BrijS20-FimH-Peptid ₁₋₁₀ -Nanopartikeln	30
3.4.6.1.	Ergebnisse und Diskussion	31
3.6.	Zellkulturtechniken	31
3.6.1.	Verwendete Zelllinien und deren Subkultivierung	31
3.6.2.	Differenzierung der THP-1-Monozyten zu Makrophagen	32
3.7.	Zellbindungs- und Internalisierungsstudien	33
3.7.1.	Zellbindungsversuch mit BrijS20-RGD-Nanopartikeln an 5637-Einzelzellen im Durchflussszytometer	33
3.7.2.	Zellbindungsversuch mit BrijS20-RGD-Nanopartikeln an KB-Zellen im Monolayer im Mikrotiterplatten-Lesegerät	33
3.7.2.1.	Ergebnisse und Diskussion	34
3.7.3.	Endozytosezellversuche im Durchflussszytometer	35
3.7.3.1.	Ergebnisse und Diskussion	36
3.7.4.	Zelllyseversuche im Mikrotiterplatten-Lesegerät	39
3.7.4.1.	Ergebnisse und Diskussion	40
4.	Zusammenfassung und Ausblick	42
5.	Abkürzungsverzeichnis	43
6.	Abbildungsverzeichnis	44
7.	Tabellenverzeichnis	45
8.	Literaturverzeichnis	46

1. Einleitung

1.1. Drug Targeting und Nanopartikel

Die spezifische Wirkstoffabgabe an ein Organ, ein Gewebe oder Zellen stellt heutzutage eine große Herausforderung in der Behandlung von Krankheiten dar. Viele Arzneistoffe besitzen eine geringe Bioverfügbarkeit, eine schlechte Wasserlöslichkeit, biologischen Abbau und unerwünschte Nebenwirkungen. (1) Vor allem in der Krebstherapie leiden Patienten oft unter sehr starken Nebenwirkungen, da Chemotherapeutika nicht ausreichend selektiv wirken und deswegen auch gesunde Zellen angreifen. (2) Das Konzept der zielgerichteten Wirkstoffabgabe, das diese Nachteile überwinden könnte, wird als „Drug Targeting“ oder „Targeted Drug Delivery“ bezeichnet und ist Gegenstand intensiver Forschung. (1) Fortschritte in der Nanotechnologie haben die Entwicklung vieler solcher Wirkstoffabgabesysteme ermöglicht, darunter Liposomen, Mizellen und Nanopartikel, die hier als Wirkstoffvehikel agieren und in diesem Zusammenhang auch als Nanomedizin bezeichnet werden. (3) Besonders Nanopartikel eignen sich gut durch passives oder aktives Targeting den Arzneistoff in den Tumorzellen zu akkumulieren und gleichzeitig den Abtransport aus den Tumorzellen zu reduzieren. (2) Nanopartikel besitzen bei geringer Größe (1-100 nm, aber auch bis zu 1000 nm möglich) eine große spezifische Oberfläche und verbessern dadurch die Löslichkeit, was wiederum einen schnelleren Wirkungseintritt und eine geringere Dosierung und Toxizität bewirkt. Zudem schützt die Partikelhülle bzw. -Matrix den Wirkstoff vor vorzeitigem Abbau und durch eine verzögerte Freisetzung am Zielort ist eine verlängerte Verweildauer und Wirkdauer möglich. (4, 5) Beim passiven Targeting kommt es wegen den unregelmäßigen und undichten Blutgefäßen in Tumoren zum EPR-Effekt (erhöhte Permeabilität und Retention) und dadurch zu einer Extravasation und Retention der Nanopartikeln. Gesunde Blutgefäße hingegen weisen eine dichte Endothelschicht auf, welches Nanopartikel, im Gegensatz zu herkömmlichen Chemotherapeutika, aufgrund ihrer Größe kaum durchdringen können. Zusätzlich fehlt in Tumorgeweben meist ein funktionierendes lymphatisches System, wodurch die Nanopartikel nicht abtransportiert und länger zurückgehalten werden. (2, 3) Das aktive Targeting hingegen, welches sich als effizienter herausgestellt hat, beruht auf einer Interaktion zwischen Liganden auf der Oberfläche der Nanopartikel und Rezeptoren auf den Zielzellen. (2, 6) Viele Tumore exprimieren verstärkt Rezeptoren wie z.B. den Folsäurerezeptor, welche als Zielrezeptoren verwendet werden können. (7, 8) Als Liganden können unter anderem Proteine, Polysaccharide, Nukleinsäuren, Peptide (wie das Tripeptid Arg-Gly-Asp (RGD)), Antikörper und kleine Moleküle (z.B. Vitamine wie Folsäure) verwendet werden. (6, 9)

Polymere Nanopartikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 10-1000 nm zeichnen sich durch ihre Bioabbaubarkeit, Biokompatibilität und Unbedenklichkeit aus und werden deswegen häufig als Träger für Arzneistoffe verwendet. Sie bestehen aus Materialien natürlichen oder synthetischen

Ursprungs. (10) Polylactid-co-Glycolid (PLGA), ein synthetisches Copolymer aus Polymilchsäure und Polyglykolsäure, ist ein von der „United States Food and Drug Administration“ (FDA) und der „European Medicines Agency“ (EMA) zugelassenes Polymer für die medizinische Anwendung und eines der wichtigsten biokompatiblen Materialien in der Nanotechnologie. Seine physikochemischen Eigenschaften wie Kristallinität, Stabilität, Quellvermögen, Abbaugeschwindigkeit und mechanische Festigkeit sind über das Verhältnis von Polyglykolsäure, welche hydrophiler ist, zu Polymilchsäure, welche durch ihre Methylgruppen hydrophober ist, steuerbar. In wässrigen Medien wird PLGA über Hydrolyse seiner Esterverbindungen durch Bulkerosion abgebaut. Des Weiteren eignet sich das Copolymer gut für die Herstellung von Nanoträgern, da es in organischen Lösungsmitteln wie Aceton, Ethylacetat oder Tetrahydrofuran löslich ist. (11, 12) Die Nachteile von PLGA-Nanopartikeln sind jedoch, dass sie aufgrund ihrer Hydrophobizität wieder schnell aus der Blutzirkulation entfernt werden, womit ihre biologische Halbwertszeit und ihre Fähigkeit, ihren Zielort zu erreichen, vermindert werden. Durch Oberflächenmodifikation, wie beispielsweise mit dem nicht-ionischen Tensid Polyethylenglykol (PEG), kann nicht nur durch Erhöhung der Hydrophilie der Nanopartikel die Oberfläche vor Aggregation und Opsonisierung geschützt und so die Blutzirkulationsdauer erhöht werden („Stealth-Effekt“), sondern es können auch die PLGA-Nanopartikel über ihre PEG-Einheiten weiter mit Targeting-Liganden funktionalisiert werden. (11)

1.1.1. Das RGD-Tripeptid

Das Tripeptid RGD besteht aus den drei L-Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure (Einbuchstabencode „RGD“) und kommt in einigen Zelladhäsions- und Signalproteinen, wie Fibronectin, Vitronectin und Fibrinogen, und der extrazellulären Matrix vor. Es spielt als Erkennungsmotiv für bestimmte Zelloberflächenrezeptoren, den Integrinen, welche die Sequenz mit einer hohen Affinität binden, eine essenzielle Rolle in der Zelladhäsion und eignet sich somit als herausragender Targeting-Ligand. Integrine werden sowohl von Tumorzellen als auch gesunden Zellen exprimiert, wobei vor allem die Integrine $\alpha\beta3$ und $\alpha\beta5$ in Tumorzellen überexprimiert werden. RGD-konjugierte Nanopartikel können den Arzneistoff selektiv zu den Zielzellen transportieren und so den negativen Effekt auf gesunde Zellen reduzieren. (13, 14)

1.1.2. Endozytose von Nanopartikeln

Obwohl Nanopartikel auch über passive Diffusion, ein Energie-unabhängiger Transportvorgang, bei dem sich die Nanopartikel entlang eines Konzentrationsgradienten bewegen, in Zellen aufgenommen werden können, ist die Hauptroute für ihre Internalisierung die Endozytose. Dabei handelt es sich um einen Energie-abhängigen Transportvorgang, bei dem die Nanopartikel über Zellmembraneinstülpungen, den sogenannten Vesikeln, ins Zellinnere aufgenommen werden. Um eine effiziente Aufnahme zu gewährleisten, ist ein Verständnis der Endozytose und ihrer Mechanismen

wichtig, da es hier je nach Zelltyp, aber auch abhängig von den Eigenschaften der Nanopartikel wie Größe, Oberflächenladung und Hydrophobizität etc. zu Unterschieden kommen kann. (15–17)

Im Allgemeinen kann die unspezifische Endozytose in Phagozytose und Pinozytose unterteilt werden. Durch die Phagozytose werden größere Partikel ($\geq 0,5 \mu\text{m}$) aufgenommen und sie erfolgt nur durch spezialisierte Zellen, den Phagozyten (z.B. Makrophagen). (16) Dieser Aufnahmeweg sollte für Nanopartikel jedoch vermieden werden, da es Schlussendlich zu einer Degradation der Nanopartikeln kommt. (17) Da aber ohnehin eher nur größere Partikel auf diese Weise aufgenommen werden, kann die Phagozytose für Nanopartikel vernachlässigt werden. (15) Pinozytose hingegen kommt in so gut wie jeder eukaryotischen Zelle vor, sie bezeichnet die Aufnahme von Flüssigkeit und den darin gelösten bzw. suspendierten Substanzen in die Zelle und kann in Clathrin-medierte Endozytose (CME), Caveolin-medierte Endozytose (CVME), Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose und in Makropinozytose unterteilt werden. (16) Bei der Makropinozytose erfolgt die Aufnahme von Flüssigkeit in große Vakuolen, den Makropinosomen, welche nach einer Ansäuerung entweder mit Endosomen oder Lysosomen verschmelzen oder ihren Inhalt in die Zellmembran recyceln. Die CME, CVME und die Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose sind Rezeptor-vermittelte Endozytose-Wege. Die Nanopartikel binden dabei über einen Liganden an ihrer Oberfläche an einen Rezeptor auf der Zelloberfläche, es kommt zu einer Aufnahme über Invagination und Ausbildung eines Endosoms. Bei der CME und der CVME sind die Proteine Clathrin bzw. Caveolin nach Rezeptorbindung wesentlich in der Vesikelausbildung involviert. Während die CME und CVME für Nanopartikel eine der häufigsten Wege sind ins Zellinnere zu gelangen, spielt die Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose vermutlich keine große Rolle. (15, 16)

1.2. Die Harnblase

Harnwegsinfektionen gehören zu den verbreitetsten Infektionskrankheiten; jede zweite Frau erlebt sie zumindest einmal in ihrem Leben und 50% davon ein Rezidiv innerhalb eines Jahres. Sie werden hauptsächlich von uropathogenen Escherichia Coli (E. Coli) ausgelöst. (18) Bei einer unkomplizierten Harnwegsinfektion mit leichten bis moderaten Symptomen kann eine rein symptomatische Therapie, zum Beispiel mit Ibuprofen, ausreichen. Die Therapie mit Antibiotika umfasst die orale Gabe von Fosfomycin, Pivmecillinam und Nitrofurantoin als First-Line-Therapie, alternativ Trimethoprim als Monotherapie oder kombiniert mit Sulfamethoxazol. Die optimale Auswahl der Antibiotika bei der Behandlung der komplizierten Harnwegsinfektion hängt von Faktoren wie Schweregrad der Erkrankung, lokalen Antibiotikaresistenzdaten und Allergien des Patienten ab. Bei schweren Fällen sind eine Hospitalisierung und intravenöse Gabe des Antibiotikums nötig. (19) Aufgrund der wachsenden Antibiotikaresistenzen von Bakterien wird es allerdings immer schwieriger Harnwegsinfektionen zu therapieren. (20) Außerdem sind regelmäßige Harnwegsinfektionen mit dem Risiko an Blasenkrebs zu erkranken assoziiert. (18)

Blasenkrebs ist die zehnthäufigste Krebserkrankung weltweit, Männer sind öfter davon betroffen als Frauen. (21) Die Standardtherapie ist eine Resektion des Tumors und eine anschließende intravesikale Therapie mit Immunmodulatoren wie Bacillus Calmette-Guérin (BCG) und Interferon- α und/oder Chemotherapeutika wie Doxorubicin, Gemcitabin, Epirubicin, Thiotepa, Mitomycin C, Paclitaxel oder Cisplatin. (22)

Die Therapie von Harnblasenerkrankungen stellt sich jedoch als problematisch heraus, da durch den besonderen Aufbau des Harnblasenepithels (Urothel) eine Barriere vorliegt, die verhindert, dass toxische Substanzen aus dem Urin in das Blut diffundieren und vice versa Moleküle aus dem Blut in die Harnblase permeieren. Dadurch wird vor allem bei systemischer Gabe nur ein Teil des Arzneistoffes aufgenommen, sodass höhere Dosen eingenommen werden müssen, was zu größeren Nebenwirkungen führt. Diese Barriere besteht aus Deckzellen, den sogenannten „Umbrella-Zellen“, welche durch Tight Junctions verbunden sind und mit undurchdringlichen Plaques, die hauptsächlich aus den speziellen Transmembranproteinen Uroplakinen bestehen, als auch einer nicht-adhärenenten Mukusschicht bedeckt sind. (22) An den „Umbrella-Zellen“ befindet sich apikal die Glykokalyx, eine Schicht aus Membran-gebundenen Glykoproteinen und Glykolipiden sowie löslichen Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen (GAGs). Insbesondere die GAGs bilden aufgrund ihrer Hydrophilie und ihrer Fähigkeit Wasser zu binden eine Mucinschicht aus, welche als zusätzlicher Schutz dient. (22, 23) Durch intravesikale Instillation, bei der der Arzneistoff direkt in die Harnblase verabreicht wird, können im Gegensatz zur systemischen Therapie höhere lokale Konzentrationen und reduzierte systemische Nebenwirkungen erreicht werden. Allerdings stellen auch hier die schlechte Permeabilität in das Urothel als auch der ständig frisch produzierte Urin, der die Arzneistofflösung verdünnt und den Arzneistoff wieder aus der Blase ausspült große Limitationen dar, sodass wiederholte Instillationszyklen notwendig sind. Nanoträger mit Targeting-Liganden, die spezifisch an Strukturen im Urothel binden, könnten zu einer höheren und längeren Interaktion mit dem Urothel führen und so die Aufnahme in die Urothelzellen verbessern (22, 24).

1.2.1. *Das FimH des Escherichia Coli*

Viele Bakterien, u.a. E. Coli, verwenden Zellanhängsel aus Kohlenhydrat-bindenden Lektinen, die als „Pili“ oder „Fimbrien“ bezeichnet werden, für die Zelladhäsion als einen wesentlichen Schritt in der Kolonisation und der Vermehrung in ihren Wirtszellen. Lektine sind eine Klasse von Proteinen, die ubiquitär in fast allen Organismen, wenn auch für unterschiedliche Zwecke, vorkommen. Das Mannose-spezifische FimH von E. Coli ist eines der bedeutendsten bakteriellen Lektinen, das an der Spitze seiner Typ-1-Fimbrien exprimiert wird. 90% aller uropathogenen E. Coli, welche die Hauptursache von infektiösen Harnwegserkrankungen sind, besitzen diese Fimbrien. Über das FimH-Lektin können sich die Bakterien an die Mannose-Einheiten in der Glykokalyx der Wirtszellen heften und aufgenommen werden. (25) Dieser Aufnahmemechanismus kann mit dem Lektin Weizenkeim-

Agglutinin („wheat germ agglutinin“, WGA) nachgeahmt werden, wodurch es sich als ein hervorragender Targeting-Ligand für die spezifische Bindung an Blasen­zellen herausgestellt hat. (26) Das FimH ist aus 279 Aminosäuren aufgebaut, hierbei machen die Aminosäuren 1-156 die N-terminale Kohlenhydrat-bindende Domäne und die Aminosäuren 160-279 die C-terminale Pilus-bindende Domäne aus. In der Kohlenhydrat-bindenden Domäne befindet sich eine Tasche, die eine D-Mannose-Einheit aufnehmen kann. (27, 28) Die Aminosäuren Phe1, Asn46, Asp47, Asp54, Gln133, Asn135, Asp140 und Phe142 sind maßgeblich für die Bindung der D-Mannose über Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen verantwortlich. (27)

1.3. Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Masterarbeit sollte das RGD-Tripeptid dargestellt und mit einem Azid, der 6-Azidohexansäure, modifiziert werden, sodass das Peptid an einen zuvor synthetisierten BrijS20-Alkin-Linker gekoppelt werden kann. Dieses BrijS20-Peptid-Konjugat sollte an die Oberfläche von PLGA-Nanopartikel gebunden werden. Außerdem sollten bereits synthetisierte Teilpeptide des FimH-Lektins von E. Coli, welche die kohlenhydratbindende Domäne nachahmen, und ihre Kontrollpeptide ebenfalls mit dem Azid modifiziert und über einen BrijS20-Alkin-Linker an die Oberfläche von PLGA-Nanopartikel gebunden werden. Diese Nanopartikeln sollten charakterisiert und im Zellversuch ihre Zellbindungseigenschaften im Vergleich zu nicht-modifizierten PLGA-Nanopartikeln untersucht werden. Zudem sollten die unterschiedlichen Endozytosewege, mit denen PLGA-Nanopartikel in Zellen aufgenommen werden, untersucht werden als auch Zelllyseversuche durchgeführt werden, um eventuelle Unterschiede in der Fluoreszenzintensität von fluoreszenzmarkierten PLGA-Nanopartikeln im Zellmonolayer und im Zelllysatz zu erkennen.

2. Materialien und Geräte

2.1. Verwendete Materialien

BLD Pharmatech GmbH (Deutschland)	Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin (TBTA)
American Type Culture Collection (USA)	5637-Zellen CaCo-II-Zellen KB-Zellen THP-1-Zellen
Carl Roth GmbH + Co. KG (Deutschland)	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) Phenol
E. Merck KGaA (Deutschland)	1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) Ethanol Nystatin
Evonik Industries (Deutschland)	Polylactid-co-Glycolid (PLGA)
Gibco (USA)	TrypLE Select Trypsin-EDTA
Greiner bio-one GmbH (Österreich)	25 cm ² -Zellkulturflaschen 75 cm ² -Zellkulturflaschen
Iris Biotech GmbH (Deutschland)	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) Dimethylformamid (DMF) Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH Fmoc-L-Gln(Trt)-OH Piperidin (Peptide Grade)
Mediatech Inc. (USA)	Fetales Kälberserum (FCS)
Rapp Polymere GmbH (Deutschland)	TentaGel S RAM
Sigma Aldrich (USA)	1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) 1,4-Dioxan 6-Azidohexansäure BrijS20 Amiloridhydrochloridhydrat Chlorpromazinhydrochlorid Dichlormethan (DCM) Diethylether Di-tert-butyldicarbonat (Boc) Deoxycholsäure Diisopropylethylamin (DIPEA) Gentamycinsulfat Heparin-Natriumsalz aus porciner Dünndarmmucosa KCl L-Glutamin

	Methyltertbutylether (MTBE) n-Hexan Ninhydrin Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) Polyvinylalkohol (PVA) Propargylamin Pyridin Roswell Park Memorial Institute 1640-Medium (RPMI) Triisopropylsilan (TIPS) Trifluoressigsäure Triton® X 100 Phthaldialdehyd
Thermo Fisher Scientific (USA)	BodiPy® Fluoreszenzfarbstoff 495/503 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Micro BCA Protein Assay Kit Slide-A-Lyzer™ Dialysekassetten

2.2. Verwendete Geräte

Durchflusszytometer	Gallios™ Flow Cytometer (Beckman Coulter Inc., USA)
Lyophilisator	Alpha 1-4 LDplus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Deutschland)
Magnetrührer	Heidolph MR 3000 (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Deutschland)
Mikrotiterplatten-Lesegerät	TECAN Infinite M200 Pro (TECAN Group Ltd., Österreich)
Partikelgrößenmessgerät	Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Großbritannien)
Sterilraumwerkbank	Labculture Plus (ESCO Micro Pte. Ltd., Singapur)
Thermoschüttler	Eppendorf Thermomixer compact (Eppendorf SE, Deutschland)
Ultraschallbad	Sonorex Super 10P (Bandelin electronics GmbH & CO KG, Deutschland)
Ultraschallstab	Sonoplus HD2070 (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Deutschland)
Vortexmischer	Heidolph REAX 2000 (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Deutschland)
Zentrifugen	Sorvall Lynx 6000 Centrifuge (Thermo Fisher Scientific, USA) Centrifuge 5804 R (Eppendorf AG, Deutschland)

2.3. Verwendete Puffer, Medien und Lösungen

Amilorid-Stammlösung	13,3 mg Amiloridhydrochloridhydrat wurden in 1 ml DMSO gelöst.
Chlorpromazin-Stammlösung	0,16 mg Chlorpromazinhydrochlorid wurden in 1 ml DMSO gelöst.

DMEM	1000 ml des fertigen Flüssigmediums DMEM, 100 ml FCS, 2 ml Gentamycin (110 mg/ml) und 400 µl L-Glutamin (29,23 mg/ml) wurden gemischt und anschließend sterilfiltriert.
HEPES isoton pH 7,4 + 1% BSA	10 g BSA wurden in 1 L HEPES isoton pH 7,4 gelöst.
HEPES isoton pH 7,4 + 2% FCS	1 L HEPES isoton pH 7,4 wurden mit 20 ml FCS versetzt.
HEPES isoton pH 7,4 (20 mM)	4,77 g HEPES und 8 g NaCl wurden in 1 L destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit NaOH (4 M) auf 7,4 eingestellt.
HEPES-Puffer (20 mM)	4,77 g HEPES wurden in 1 L destilliertem Wasser gelöst und mit NaOH (4 M) auf den gewünschten pH-Wert eingestellt.
Natriumtetraboratpuffer pH 9 (12,5 mM)	4,77 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ wurden in etwas destilliertem Wasser gelöst, dann 46 ml HCl (0,1M) zugesetzt und mit destilliertem Wasser auf 1 L aufgefüllt, anschließend der pH-Wert kontrolliert und gegebenenfalls eingestellt.
Nystatin-Stammlösung	2,5 mg Nystatin wurden in 1 ml DMSO gelöst.
PBS mit 0,1% EDTA	1g EDTA wurden in 900 ml partikelfreiem Wasser gelöst, 100 ml PBS-Stammlösung hinzugegeben und sterilfiltriert.
PBS-Stammlösung (10x) pH 7,2-7,3	80 g NaCl, 2 g KCl, 7,65 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 2 g KH_2PO_4 wurden in 1 L destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert auf 7,2-7,3 eingestellt.
PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}	100 ml PBS-Stammlösung (10x) pH 7,2-7,3 wurden mit 900 ml destilliertem Wasser verdünnt.
PMA-Lösung (0,01 mg/ml)	Zu 15 µl PMA-Stammlösung in DMSO (1 mg/ml) wurden 1485 µl DMSO hinzugefügt.
PVA-Lösung 0,5%	5 g PVA wurden in 1 L partikelfreiem Wasser unter Erwärmen gelöst.
RPMI	10,4 g RPMI-Pulver wurden in 1 L destilliertem Wasser gelöst, 4 M HCl zugetropft, bis ein pH-Wert von 4,0 erreicht wurde und anschließend 4 M NaOH zugetropft, bis pH 7,2 erreicht wurde. 2 g NaHCO_3 , 2 ml Gentamycin (110 mg/ml), 400 µl L-Glutamin (29,23 mg/ml) und 100 ml FCS wurden hinzugegeben und sterilfiltriert.
Zelllysepuffer	0,38 g $\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5,8 g NaCl, 1 g SDS, 5 g Deoxycholsäure und 10 g Triton® X 100 wurden in 1 L TRIS-Puffer pH 7,4 (10 mM) gelöst.

3. Methoden, Ergebnisse und Diskussion

3.1. Peptidsynthese

Die Peptidsynthese erfolgte mittels Festphasensynthese (SPPS = solid phase peptide synthesis). Das Prinzip der SPPS besteht darin, dass das wachsende Peptid kovalent über seinen C-Terminus an einen unlöslichen Polymerträger, Harz genannt, über die Dauer der gesamten Synthese gebunden ist und in Richtung des N-Terminus verlängert wird, während die überschüssigen Reagenzien und löslichen Nebenprodukte über einfache Waschschriffe entfernt werden können. Dabei müssen funktionelle Gruppen in den Seitenketten, die während den Kopplungsreaktionen nicht reagieren sollen, durch permanente Schutzgruppen (z.B. tert-Butylgruppen) und die α -Aminogruppen der Aminosäuren durch temporäre Schutzgruppen (z.B. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) oder tert-Butyloxycarbonyl (Boc)), die vor der Kopplung der nächsten Aminosäure entfernt werden müssen, geschützt werden.

Die α -Carboxylgruppe der ersten Aminosäure wird durch die Bindung ans Harz geschützt.

Die zu koppelnde Aminosäure wird im Überschuss hinzugesetzt, dabei bildet die α -Carboxylgruppe eine Amidbindung, auch als Peptidbindung bezeichnet, mit der α -Aminogruppe der gebundenen Aminosäure aus. Die α -Carboxylgruppe wird zuvor unter Verwendung von Diisopropylethylamin (DIPEA), 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) und 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) über die Bildung eines Esters aktiviert, um eine effiziente Kopplung zu gewährleisten. (29, 30)

Um zu kontrollieren, ob Entschützungs- und Kopplungsreaktionen erfolgreich waren, wird der Kaisertest durchgeführt – ein qualitatives Nachweisverfahren für freie Aminogruppen, das auf einer Reaktion mit Ninhydrin basiert. Bei einem positiven Test färbt sich das Harz dunkelblau, somit sind freie Aminogruppen vorhanden. Sind keine freien Aminogruppen vorhanden, bleibt es farblos-gelblich und der Test ist damit negativ.

Die SPPS folgt immer denselben Schritten: Entschützung von der Schutzgruppe, Waschschriff, Kaiser-Test, Kopplung der Aminosäure, Waschschriff, Kaiser-Test. Dieser Zyklus wird so lange wiederholt, bis das gewünschte Peptid synthetisiert ist (siehe Abbildung 1). Dieses kann dann vom Harz abgespalten werden, dabei werden auch die permanenten Schutzgruppen entfernt. (30)

In dieser Arbeit wurde manuell über Spritzentechnik das RGD-Tripeptid synthetisiert und anschließend mit einem Azid, der 6-Azidohexansäure, modifiziert. Außerdem wurden bereits synthetisierte Teilpeptide aus der Kohlenhydrat-bindenden Domäne des FimH von E. coli, welche die Aminosäuren 1-10, 45-55 und 132-142 umfassen, und deren jeweilige Kontrollpeptide, welche dieselben Aminosäuren in zufälliger Reihenfolge beinhalten, mit 6-Azidohexansäure weiter modifiziert (die genauen Aminosäuresequenzen können aus Tabelle 3 entnommen werden).

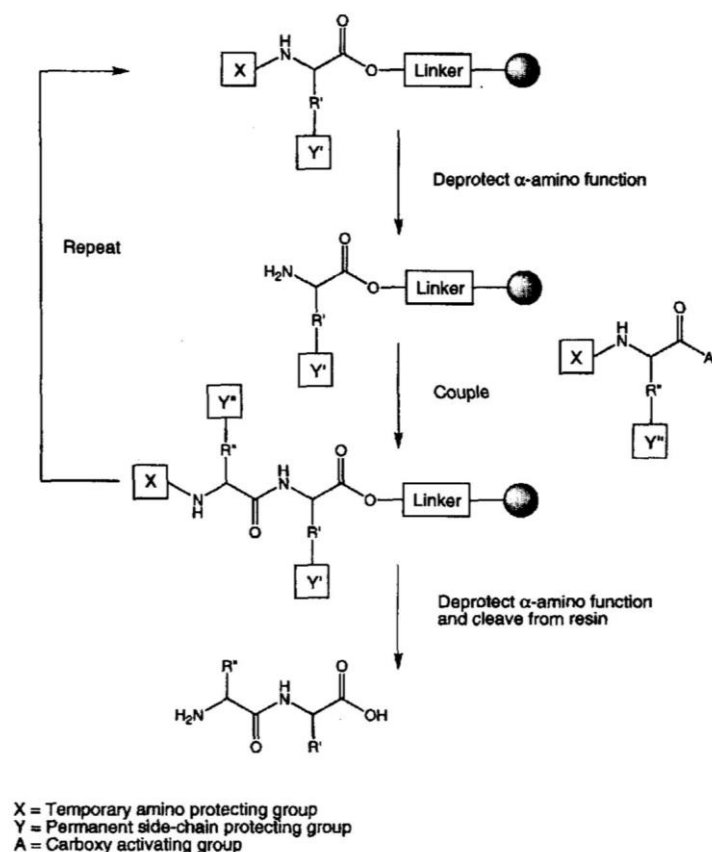


Abbildung 1: Peptidsynthese mittels Festphasensynthese. (30)

3.1.1. Synthese des Tripeptids RGD

Als Harz wurden 109,33 mg TentaGel S RAM verwendet, ein Fmoc-geschütztes Polystyrolharz, das mit einem Rink-Amid-Linker modifiziert ist. Die Fmoc-Schutzgruppe muss im ersten Schritt entfernt werden, damit die erste Aminosäure über den Linker an das Harz binden kann. Der Peptide-Scale betrug 25 μmol und die Harzbeladung ist vom Hersteller mit 0,23 mmol/g angegeben. (31)

Zuerst wurde das Harz 30 Minuten unter Bewegung in Dichlormethan (DCM) gequollen. Nachfolgend wurde das Harz durch dreimaliges Waschen mit 20% Piperidin in Dimethylformamid (DMF) jeweils 10 Minuten von der Fmoc-Schutzgruppe entschützt. Danach wurde dreimal mit 1 ml DMF und dreimal mit 1 ml DCM gewaschen. Anschließend wurde der Kaiser-Test zur Überprüfung der erfolgreichen Entschützung des Harzes durchgeführt. Dafür wurde eine kleine Probe Harz entnommen und je ein Tropfen einer 80%igen Phenollösung in Ethanol, ein Tropfen einer 5%igen Ninhydrinlösung in Ethanol und ein Tropfen einer 20 μM Kaliumcyanid-Lösung in Pyridin zugesetzt und vier Minuten bei 99°C im Thermomixer geschüttelt. Die Harzkörner färbten sich dunkelblau. Demnach fiel der Kaisertest positiv aus und die Entschützung war erfolgreich.

Da die Aminosäuresequenz von Peptiden typischerweise von ihrem N- zu ihrem C-Terminus niedergeschrieben, aber in umgekehrter Richtung synthetisiert wird, wurde Asparaginsäure als erste Aminosäure an das Harz gekoppelt. Es wurden 4 Äquivalente Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH in DCM (2,5 ml/g Harz) gelöst und 8 Äquivalente DIPEA dazupipettiert. 4 Äquivalente HOBt und 4 Äquivalente HBTU

wurden in DMF (2,5 ml/g Harz) gelöst. Die beiden Lösungen wurden gemischt, dem Harz zugesetzt und das Harz 60 Minuten unter Bewegung bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde dreimal mit 1 ml DMF und dreimal mit 1 ml DCM gewaschen und ein Kaiser-Test durchgeführt. Ein negatives Ergebnis – die Harzkörner sind farblos-gelblich geblieben – bestätigte die erfolgreiche Kopplung der geschützten Aminosäure. Damit war die Kopplung der ersten Aminosäure abgeschlossen.

Die Kopplung der nächsten Aminosäure Glycin und darauffolgend Arginin erfolgte nach demselben Schema wie zuvor beschrieben. Die Einwaagen für die jeweiligen Kopplungsschritte können aus Tabelle 1 entnommen werden.

Tabelle 1: Einwaagen für die Aminosäurekopplungen.

	Aminosäure (4 Äq.)	HOBT (4 Äq.)	HBTU (4 Äq.)	DIPEA (8 Äq.)	DMF bzw. DCM (2,5 ml/g Harz)
Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH	41,59 mg	15,76 mg	39,1 mg	34,9 µl	273 µl
Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	29,85 mg	15,83 mg	39,13 mg	34,9 µl	273 µl
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	65,08 mg	15,42 mg	38,12 mg	34,9 µl	273 µl

3.1.2. Kopplung von 6-Azidohexansäure an die RGD-Sequenz

Das Tripeptid wurde nach Abschluss der Synthese durch Kopplung der 6-Azidohexansäure an das Arginin des RGD modifiziert, dies erfolgte analog dem beschriebenen Schema aus Abschnitt 3.1.1., jedoch wurde anstatt einer weiteren Aminosäure die 6-Azidohexansäure verwendet. Die Einwaagen können aus Tabelle 2 entnommen werden.

Tabelle 2: Einwaagen für die Kopplung der 6-Azidohexansäure.

6-Azidohexansäure (4 Äq.)	HOBT (4 Äq.)	HBTU (4 Äq.)	DIPEA (8 Äq.)	DMF bzw. DCM (2,5 ml/g Harz)
14,6 µl	15,67 mg	37,9 mg	34,9 µl	273 µl

3.1.3. Abspalten vom Harz

Für das Abspalten des Peptid-Azids vom Harz wurde 1 ml einer Mischung aus 95% Trifluoressigsäure (TFA), 2,5% destilliertem Wasser und 2,5% Triisopropylsilan (TIPS) hergestellt, dem Peptid hinzugefügt und 60 Minuten unter Bewegung bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Lösung in 40 ml eine kalten 1:1-Mischung aus Methyl-tert-butylether (MTBE) und N-Hexan eingebracht, sofort sorgfältig geschüttelt und zum Ausfällen des Peptides 10 Minuten bei 4°C kühl gestellt. Anschließend wurde 15 Minuten bei 9°C und 4000 UpM zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Das Peptid wurde in 1 ml Aqua destillata (Aqua dest.) gelöst, bei -80°C eingefroren und anschließend lyophilisiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Peptid-Azid im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

3.1.4. Kopplung von 6-Azidohexansäure an die Teilpeptide des FimH von *E. coli* und deren Kontrollpeptide

Die Peptide wurden zuvor in der Arbeitsgruppe von meiner Kollegin Mag. Hatixhe Sahini, BSc synthetisiert und freundlicherweise von ihr zur Verfügung gestellt. Die Aminosäuresequenzen und ihre jeweiligen Bezeichnungen sind in Tabelle 3 ersichtlich.

*Tabelle 3: Aminosäuresequenzen der verwendeten Teilpeptide des FimH von *E. coli* und ihre jeweiligen Kontrollpeptide.*

Peptid	Aminosäuresequenz
Peptid ₁₋₁₀	Phe-Ala-Cys-Lys-Thr-Ala-Asn-Gly-Thr-Ala-Lys
Kontrollpeptid ₁₋₁₀	Ala-Thr-Ala-Cys-Asn-Lys-Gly-Phe-Thr-Ala-Lys
Peptid ₄₅₋₅₅	His-Asn-Asp-Tyr-Pro-Glu-Thr-Ile-Thr-Asp-Tyr-Lys
Kontrollpeptid ₄₅₋₅₅	Pro-Glu-Asp-Thr-Tyr-His-Asn-Asp-Thr-Ile-Tyr-Lys
Peptid ₁₃₂₋₁₄₂	Arg-Gln-Thr-Asn-Asn-Tyr-Asn-Ser-Asp-Asp-Phe-Lys
Kontrollpeptid ₁₃₂₋₁₄₂	Phe-Arg-Asp-Thr-Gln-Asn-Ser-Tyr-Asn-Asp-Asn-Lys

Die synthetisierten Peptide waren alle noch an das Harz (TentaGel S RAM) gebunden. Für jedes Peptid wurde das gleiche Reaktionsschema angewandt: Anfügen der Boc-Anhydrid-Schutzgruppe, Entfernung der Dde-Schutzgruppe, Kopplung der 6-Azidohexansäure und Abspalten vom Harz.

Jedes Peptid hatte endständig eine nicht geschützte Aminogruppe, welche zunächst für das weitere Vorgehen durch das Anfügen von Boc-Anhydrid geschützt werden musste. Es wurden 86 mg Harz (20 µmol) der Peptide oder 43 mg Harz (10 µmol) der Kontrollpeptide eingewogen und das Harz 30 Minuten unter Bewegung in DCM quellen gelassen. Es wurden 4 Äquivalente Boc-Anhydrid in DCM gelöst, dem wurden 8 Äquivalente DIPEA hinzugefügt, die gesamte Lösung dem Harz zugesetzt und 60 Minuten unter Bewegung bei Raumtemperatur inkubiert. Die genauen Einwaagen für den Boc-Schutz der Aminogruppe können Tabelle 4 entnommen werden. Danach wurde dreimal mit 1 ml DMF und dreimal mit 1 ml DCM gewaschen und der Kaiser-Test durchgeführt, welcher nach erfolgreicher Boc-Schätzung negativ war.

Tabelle 4: Einwaagen für den Boc-Schutz der freien Aminogruppe.

	Harz (20 µmol bzw. 10 µmol)	Boc-Anhydrid (4 Äq.)	DIPEA (8 Äq.)
Peptid ₁₋₁₀	88,8 mg	21 mg	28,4 µl
Peptid ₄₅₋₅₅	89,76 mg	23,15 mg	29,3 µl
Peptid ₁₃₂₋₁₄₂	88,16 mg	26,37 mg	28,3 µl
Kontrollpeptid ₁₋₁₀	43,7 mg	8,8 mg	13,9 µl
Kontrollpeptid ₄₅₋₅₅	44,88 mg	10,78 mg	14,4 µl
Kontrollpeptid ₁₃₂₋₁₄₂	43,51 mg	11 mg	14 µl

Alle Peptide trugen am C-Terminus ein Lysin, dessen Seitenkette mit einer Dde-Schutzgruppe geschützt war. Um die 6-Azidohexansäure an die Aminogruppe der Lysinseitenkette koppeln zu können, musste diese im nächsten Schritt zuerst von der Dde-Schutzgruppe entschützt werden. Das Harz wurde 15-

mal je drei Minuten mit einer 2%igen Hydrazinlösung in DMF durchgespült. Als Inprozesskontrolle wurde nach dem ersten Mal, dem 10. Mal und dem 15. Mal die abnehmende Absorption der Dde-Schutzgruppe in der Hydrazinlösung bei 290 nm am Mikrotiterplatten-Lesegerät bestimmt. Anschließend wurde dreimal mit je 1 ml DMF und dreimal mit je 1 ml DCM gewaschen und der Kaiser-Test durchgeführt, um die erfolgreiche Entschützung zu bestätigen.

Im Anschluss wurde die Kopplung der 6-Azidohexansäure wie in Abschnitt 3.1.1. bzw. Abschnitt 3.1.2. beschrieben durchgeführt. Die Einwaagen dafür können Tabelle 5 entnommen werden.

Tabelle 5: Einwaagen für die Kopplung der 6-Azidohexansäure.

	6-Azidohexansäure (4 Äq.)	HOBt (4 Äq.)	HBTU (4 Äq.)	DIPEA (8 Äq.)	DMF bzw. DCM (2,5 ml/1 g Harz)
Peptid₁₋₁₀	11,9 µl	12,5 mg	30,9 mg	28,4 µl	222 µl
Peptid₄₅₋₅₅	12,2 µl	12,8 mg	31,7 mg	29,1 µl	224 µl
Peptid₁₃₂₋₁₄₂	11,9 µl	12,5 mg	30,8 mg	28,3 µl	220 µl
Kontrollpeptid₁₋₁₀	5,9 µl	6,2 mg	15,3 mg	14,1 µl	109 µl
Kontrollpeptid₄₅₋₅₅	6 µl	6,3 mg	15,7 mg	14,4 µl	112 µl
Kontrollpeptid₁₃₂₋₁₄₂	5,9 µl	6,1 mg	15,2 mg	14 µl	108 µl

Die Abspaltung vom Harz erfolgte analog zu den in Abschnitt 3.1.3. beschriebenen Methoden.

Die erfolgreiche Kopplung des Azids an die sechs Peptide wurde über eine massenspektrometrische Analyse bestätigt.

3.2. Herstellung eines BrijS20-Alkin-Konjugats

Brij, ein Polyalkylenglykoether, ist ein nicht-ionisches Tensid, das aus einer hydrophoben Alkylkette und einer hydrophilen Polyethylenglykol (PEG)-Einheit besteht, die über eine Etherbindung verbunden sind. BrijS20 besteht aus einer C18-Kohlenstoffkette und zirka 20 Ethylenglykol-Einheiten. Durch Aktivierung der terminalen Hydroxylgruppe der PEG-Kopfgruppe mit 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) bildet sich ein BrijS20-Imidazol-Carbamat aus. An dieses kann Propargylamin, ein aliphatisches primäres Amin mit einer Alkingruppe, über einen nukleophilen Angriff an die elektronenarme Carbonylgruppe binden und so ein BrijS20-Alkin-Konjugat ausbilden. An dieses Konjugat können nachfolgend weitere Moleküle gebunden werden, wodurch es als ein Linker fungiert (siehe Abbildung 2). (32, 33) Das verwendete BrijS20 hatte ein Molekulargewicht von 1152 g/mol.

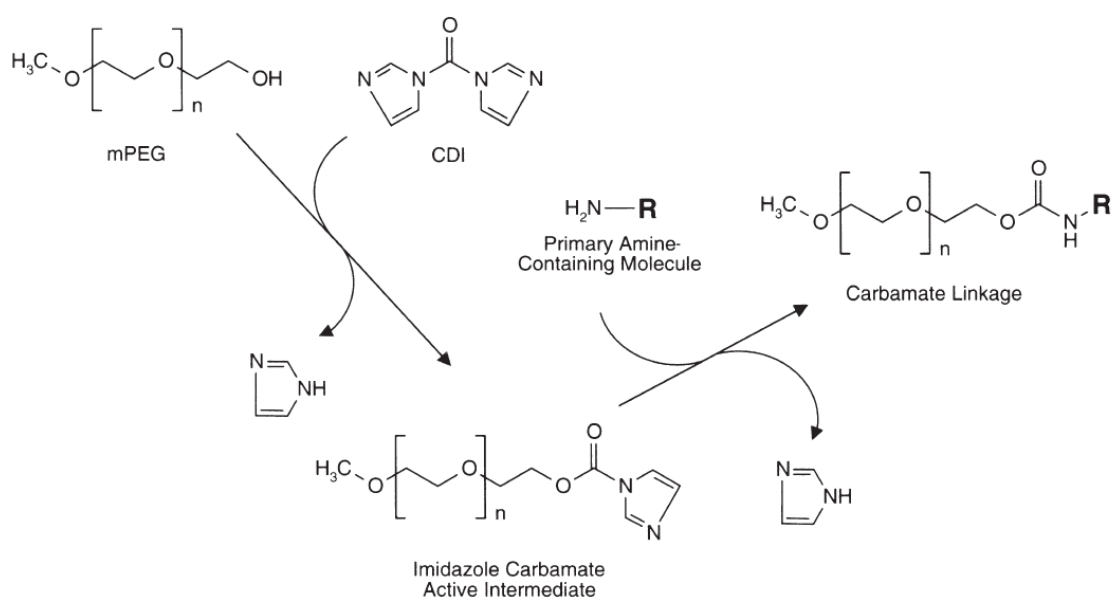


Abbildung 2: Aktivierung der terminalen PEG-Hydroxylgruppe durch CDI und Ausbildung eines Imidazol-Carbamat-Zwischenprodukts unter Abspaltung eines Imidazols. Durch nukleophilen Angriff eines primärenamins an die Carbonylgruppe des Carbamats entsteht unter Abspaltung eines weiteren Imidazols ein stabiler Carbamat-Linker. (32)

3.2.1. Aktivierung von BrijS20 durch CDI

300 mg BrijS20 wurden in 5 ml wasserfreiem Dioxan bei 37°C gelöst (60 mM). Es wurden 400 mg CDI zugegeben (Endkonzentration 0,5 M) und zwei Stunden lang bei 37°C gerührt. Anschließend wurden 100 ml Ether zugegeben, dann – zuerst tropfenweise bis zum Ausfallen des ersten Produkts – die restlichen der insgesamt 100 ml n-Hexan und bei 4°C zum Ausfallen kaltgestellt, bis der Überstand klar war. Der Überstand wurde dekantiert, das Produkt durch einen Faltenfilter filtriert, der Rückstand in etwas Ether aufgenommen und am Rotavapor eingedampft. Das Produkt wurde zum Trocknen in den Exsikkator gestellt und auch gelagert.

3.2.2. *Kopplung von BrijS20-CDI mit Propargylamin*

100 mg BrijS20-CDI und 10,22 µl Propargylamin wurden in 4 ml Natriumtetraboratpuffer pH 9 (12,5 mM) gelöst und bei Raumtemperatur 48 Stunden gerührt. Anschließend wurde zur Reinigung 6 Stunden gegen Aqua dest. dialysiert, dabei stündlich das Medium gewechselt, das fertige Produkt bei -80°C eingefroren und im Gefriertrockner lyophilisiert. Zur Lagerung wurde es bei 4°C in den Kühlschrank gestellt.

3.3. Click-Chemie – Herstellung eines BrijS20-Peptids über eine Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition

Die Click-Chemie ist ein Konzept in der organischen Synthese und beschreibt das einfache und selektive Verknüpfen von molekularen Einheiten unter der Ausbildung einer Heteroatomverbindung (C-X-C). Der Begriff „Click-Chemie“ wurde erstmals von Sharpless et al. geprägt und beschreibt Reaktionen, die modular sind, eine breite Anwendung finden, hohe Ausbeuten liefern, stereospezifisch sind, nur unbedenkliche Nebenprodukte produzieren, welche durch nicht-chromatographische Methoden wieder entfernt werden können, einfache Reaktionsbedingungen vorweisen, nur leicht verfügbare Reagenzien sowie harmlose Lösungsmittel (vorzugsweise Wasser) benötigen, Produkte liefern, die einfach zu isolieren sind und falls notwendig durch nicht-chromatographische Methoden, wie Kristallisation oder Destillation, gereinigt werden können und unter physiologischen Bedingungen stabil sind. (34) Es gibt vier Gruppen von Reaktionen, die diese Kriterien erfüllen: die Cycloadditionsreaktion, die nukleophile Substitutionsreaktion, die Carbonylkondensation und die Additionsreaktion zu Kohlenstoff-Kohlenstoff-Mehrfachbindungen. Darunter ist die Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) der mit Abstand prominenteste Vertreter. Dabei handelt es sich um eine Huisgen-Cycloaddition, eine 1,3-dipolare Cycloadditionsreaktion eines Azids mit einem Alkin unter Ausbildung eines Triazols, wie in Abbildung 3 dargestellt. Azide sind 1,3-Dipole und starke Elektrophile. Wenn diese mit Dipolarophilen, wie Alkinen, reagieren, bilden sie fünfgliedrige Heterozyklen aus. (32, 35)

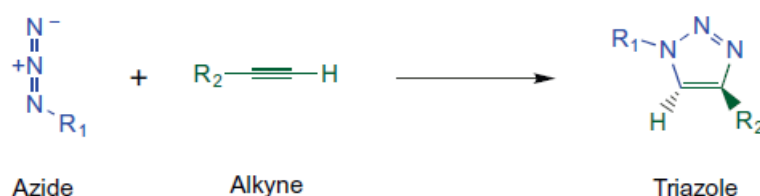


Abbildung 3: Huisgen-Cycloaddition: 1,3-dipolare [3+2]-Cycloadditionsreaktion eines Azids mit einem terminalen Alkin unter Ausbildung eines 1,2,3-Triazols. (32)

Das Problem der Huisgen-Cycloaddition ist jedoch, dass sie hohe Temperaturen, einen hohen Druck als auch eine lange Reaktionszeit benötigt, wodurch sie für lange Zeit keine breite Anwendung fand. Später wurde unabhängig voneinander durch Barry Sharpless und Morten Meldal entdeckt, dass diese Reaktion durch Cu(I) als Katalysator in wässriger Lösung drastisch beschleunigt wird und so bei Raumtemperatur und Atmosphärendruck einfach durchgeführt trotzdem hohe Ausbeuten liefert. (32, 36) Hierbei sind Azide als auch Alkine sehr stabile Reagenzien in der Click-Reaktion, ihre funktionellen Gruppen sind gegenüber biologischen Molekülen unreaktiv und sie sind praktisch frei von Nebenreaktionen in wässriger Lösung. Diese Bioorthogonalität bringt eine hohe Selektivität in biologischen Systemen und somit eignet sich die CuAAC hervorragend für Biokonjugationsreaktionen.

Da Cu(I)-Salze vergleichsweise unrein und instabil in Lösung sind und es bei ihrer Verwendung leicht zu Nebenprodukten kommen kann, wird üblicherweise ein Cu(II)-Salz verwendet, welches durch ein Reduktionsmittel in situ zu Cu(I) reduziert wird. Häufig wird hierbei Kupfersulfat (CuSO_4) als Cu(II)-Salz und Ascorbinsäure als Reduktionsmittel verwendet. Die Ascorbinsäure oxidiert dabei zur Dehydroascorbinsäure. (32) Zusätzlich kann Tris(benzyltriazolylmethyl)amin (TBTA) als Stabilisator eingesetzt werden, um eine Deaktivierung von Cu(I) zu Cu(II) durch Oxidation bei Luftexposition zu verhindern. Dabei bildet TBTA einen stabilen Komplex mit Cu(I) und erhält so seinen Oxidationszustand. (37)

In Abbildung 4 ist der gesamte Synthesevorgang, einschließlich der CuAAC, des BrijS20-Peptids dargestellt.

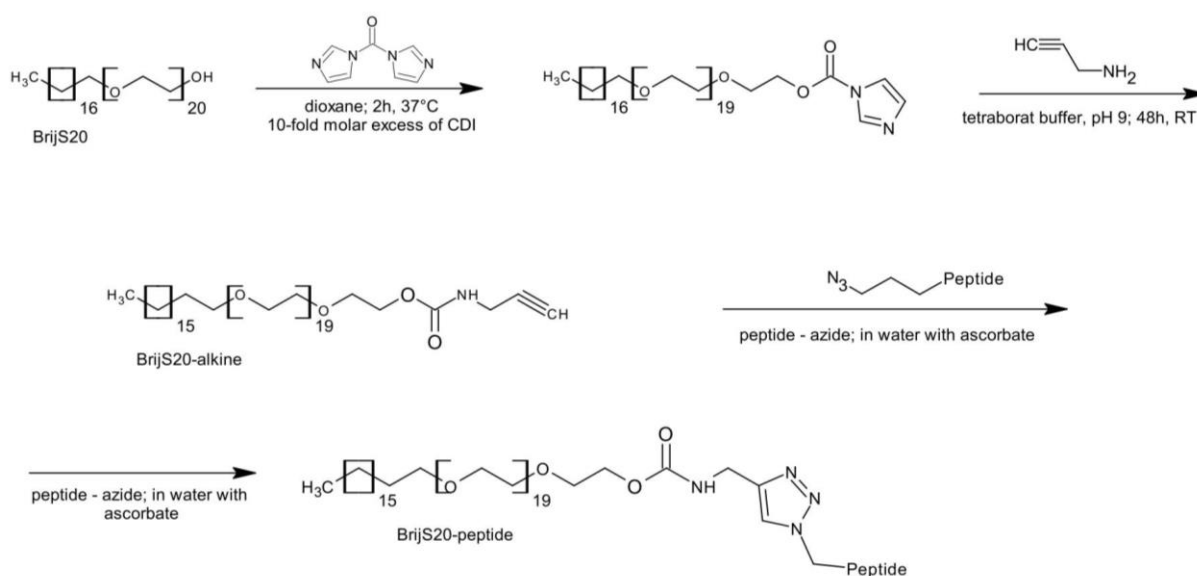


Abbildung 4: Gesamter Synthesevorgang des BrijS20-Peptids: Aktivierung von BrijS20 durch CDI, Kopplung von BrijS20-CDI an Propargylamin und zuletzt die CuAAC des BrijS20-Propargylaminlinkers an das Peptid-Azid unter Ausbildung eines Triazolprodukts.

3.3.1. Kopplung eines RGD-Azids an einen BrijS20-Alkin-Linker

19,95 mg CuSO_4 -Pentahydrat (8 mM) in 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES) pH 8,5 und 2817,9 mg Ascorbinsäure (800 mM) in HEPES pH 8,5 wurden vereint und 3,22 mg RDG-Aizd (320 μM) in HEPES pH 8,5 hinzugegeben. Es wurden 7,88 mg BrijS20-Propargylamin-Konjugat (320 μM) in HEPES pH 8,5 zugefügt und die Lösung 60 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 12 Stunden gegen Aqua dest. dialysiert (Molecular-Weight-Cut-Off (MWCO) 2000 Da) und dabei mehrmals das Medium gewechselt. Danach wurde das Produkt bei -80°C eingefroren, lyophilisiert und bei 4°C gelagert.

3.3.2. Kopplung eines FimH-Peptid-Azids an einen BrijS20-Alkin-Linker

Es wurden 24,968 mg (10 mM) CuSO_4 -Pentahydrat in Aqua dest. und 88,06 mg Ascorbinsäure (50 mM) in Aqua dest. gelöst und mit 10,63 mg Peptid₁₋₁₀-Azid (8,4 μmol) in Aqua dest. und 30,99 mg BrijS20-

Propargylamin-Konjugat (23 μmol) in Aqua dest. vereint und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung, die vor dem Reagieren gelblich war, war danach dunkelbraun und es entstand ein schwarzer Niederschlag. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert (fünf Minuten bei 3000 UpM), das Pellet für eine nachfolgende Analyse über die analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) vorerst aufgehoben und der Überstand 24 Stunden gegen Aqua dest. unter mehrmaligem Medienwechsel dialysiert (MWCO 3500 Da). Nach der Dialyse war die Probenlösung lila, daraufhin wurde zur Kontrolle, ob die Click-Reaktion erfolgreich war, die Probenlösung mittels HPLC analysiert. Das Ergebnis fiel negativ aus – die Kopplung hat scheinbar nicht funktioniert. Ebenso wurde, wie oben erwähnt, das Pellet analysiert – auch hier fiel die Analyse negativ. Darauf wurde die Click-Reaktion mehrfach modifiziert, um eine erfolgreiche Kopplungsreaktion zu erreichen.

Beim nächsten Versuch wurden alle Bestandteile in einem 20 mM HEPES pH 7 statt in Aqua dest. gelöst, sonst wurde analog vorgegangen. Jedoch war auch hier die Probenlösung nach dem Reagieren erneut braun mit einem schwarzen Niederschlag und nach der Dialyse leicht bräunlich-orange. Die HPLC-Analyse fiel wiederum negativ aus.

Beim darauffolgenden Versuch wurde eine 100 mM Ascorbinsäurelösung (statt zuvor 50 mM) verwendet und alle Bestandteile in einem 40 mM HEPES pH 7 (statt zuvor 20 mM) gelöst. Auch hier war die Lösung nach dem Reagieren wieder braun, jedoch ohne schwarzen Niederschlag. Beim Dialysieren wurde diesmal eine Dialysekassette mit einem MWCO von 2000 Da verwendet. Die HPLC-Analyse fiel wiederum negativ aus.

Daraufhin wurde ein neues Protokoll für die Click-Chemie-Reaktion angewandt, das TBTA als Stabilisator enthielt: Es wurden 2,3 ml einer 20 mM CuSO_4 -Pentahydrat-Lösung in Aqua dest., 2,3 ml einer 100 mM Ascorbinsäurelösung in Aqua dest. und 1,15 ml einer 20 mM TBTA-Lösung in DMSO vereint. 11,67 mg Peptid₁₋₁₀-Azid (9,2 μmol) in Aqua dest. und 56,7 mg BrijS20-Propargylamin-Konjugat (46 μmol) in Aqua dest. wurden vereint, die Lösung mit der CuSO_4 -Ascorbinsäure-TBTA-Lösung gemischt und 16 Stunden unter Lichtschutz bei Zimmertemperatur gerührt. Danach wurde 9 Stunden gegen Aqua dest. dialysiert (MWCO 2000 Da), wobei das Medium stündlich gewechselt wurde. Die Probenlösung wurde mittels HPLC analysiert; diesmal fiel das Ergebnis positiv aus – die Kopplung war erfolgreich. Damit hat sich gezeigt, dass der Zusatz von TBTA zur Stabilisierung der Cu(I)-Ionen unter diesen Reaktionsbedingungen notwendig ist. Anschließend wurde das Konjugat bei -80°C eingefroren und gefriergetrocknet. Nach der Lyophilisation waren Teile des Produkts bräunlich verfärbt, was darauf hindeutet, dass es nicht rein war. Zudem war die praktische Ausbeute höher als die theoretische. Zur weiteren Verwendung wurde es bei 4°C gelagert.

3.4. Herstellung und Charakterisierung von PLGA-Nanopartikel

Die Herstellung erfolgte mittels Solvent-Evaporation, einer Methode, bei der das Polymer in einer flüchtigen organischen Phase gelöst wird, welche dann in einer wässrigen Phase emulgiert wird. Die organische Phase der O/W-Emulsion wird durch Verdunstung entfernt, das Polymer fällt dabei aus und bildet Nanopartikel. Dabei kann die Größe der Partikel durch verschiedene Parameter wie Auswahl der Lösungsmittel, Verhältnis der Lösungsmittel zueinander, Polymerkonzentration, Emulgiermethode, Verdunstungsrate etc. beeinflusst werden. (38)

Das verwendete PLGA RG 503H hatte ein Lactid:Glycolid-Verhältnis von 50:50 und ein Molekulargewicht von 24000-38000 g/mol. Der verwendete Polyvinylalkohol (PVA) hatte ein mittleres Molekulargewicht von 30000-70000 g/mol und einen Hydrolysegrad von 87-90%.

Partikel, die später in Zellversuchen verwendet wurden, wurden zur Detektierbarkeit mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bordipyromethen (BodiPy) 493/503 markiert. Partikel für Partikelcharakterisierungen oder Gehaltsbestimmungen wurden ohne Farbstoff hergestellt.

3.4.1. Herstellung von PLGA-Nanopartikeln

50 mg PLGA wurden gegebenenfalls mit 50 µl BodiPy (0,5 mg/ml) in 2,25 ml Aceton vollständig gelöst. Es wurde 0,75 ml Ethylacetat in eine 5 ml-Spritze mittels einer entsprechenden Kanüle aufgezogen und anschließend mit derselben Spritze die PLGA-Acetonlösung aufgezogen – dies stellt die innere organische Phase dar. Als äußere wässrige Phase wurden 30 ml einer 0,5%igen PVA-Lösung vorgelegt, die organische Phase mittels Spritze mit Kanüle zügig in die wässrige Phase injiziert und unter Kühlung durch ein kaltes Wasserbad mit dem Ultraschallstab bei einer Intensität von 40% drei Minuten emulgiert. Die entstandene Dispersion wurde in 50 ml einer 0,5%igen PVA-Lösung eingebracht und 1 Stunde zur Aushärtung am Magnetrührer unter Pressluftzufuhr gerührt, bis das Aceton und das Ethylacetat abgedampft waren.

Die Nanopartikelsuspension wurde durch Zentrifugation gereinigt. Dafür wurde im ersten Zentrifugationsschritt 20 Minuten bei 1000 UpM (119 x g) und 4°C zentrifugiert, anschließend folgten weitere Zentrifugationsschritte bei 10000 UpM (11872 x g) und 4°C, bei 13000 UpM (20064 x g) und 4°C, bei 16000 UpM (30392 x g) und 4°C und zuletzt bei 19000 UpM (42858 x g) und 4°C. Es wurden die Nanopartikel der Zentrifugationsschritte 10000-19000 UpM gepoolt, durch einen 5 µm-Filter filtriert und zu je 500 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert. Diese wurden zuerst bei -80°C eingefroren, danach über die Nacht lyophilisiert und bis zur Verwendung bei 4°C und bei Bedarf zusätzlich unter Lichtschutz im Kühlschrank gelagert.

3.4.2. Herstellung von Peptid-funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln

3.4.2.1. Herstellung von BrijS20-RGD-Nanopartikeln

Die BrijS20-RGD-Nanopartikel wurden auf zwei verschiedene Methoden hergestellt. Bei der ersten Methode fand die Konjugation des BrijS20-Linkers mit dem RGD-Azid erst während der Herstellung der Partikel in der Aushärtelösung statt, bei der zweiten Methode wurden die Nanopartikel mit dem bereits hergestellten BrijS20-Propargylamin-RGD-Konjugat funktionalisiert.

3.4.2.1.1. Methode 1

11 mg BrijS20-Propargylamin-Konjugat wurden in 1 ml Aceton gelöst und 5 Minuten bei 7000 UpM zentrifugiert. Von dem gelösten Konjugat im Überstand wurden 500 µl entnommen und auf ein Endvolumen von 2 ml Aceton ergänzt, gegebenenfalls inklusive 50 µl BodiPy (0,5 mg/ml). Es wurden 50 mg PLGA in 1 ml Aceton gelöst und mit dem gelösten Konjugat vereint (organische Phase). Die organische Phase wurde in 30 ml einer 0,5%igen PVA-Lösung über eine 5 ml-Spritze mit Kanüle eingebracht und 3 Minuten am Ultraschallstab bei 40%iger Intensität unter Kühlung behandelt. Es wurden 20 ml einer 0,5%igen PVA-Lösung als Aushärtelösung vorgelegt, darin zuerst 5 mg CuSO₄-Pentahydrat (1 mM) und 352 mg Ascorbinsäure (100 mM) gelöst und anschließend 5 mg RGD-Azid gelöst. Die Nanopartikelsuspension wurde in diese Aushärtelösung überführt und 60 Minuten unter Druckluftzufuhr am Magnetrührer gerührt, bis das Aceton abgedampft war.

Für die Reinigung durch Zentrifugation wurde die Nanopartikelsuspension zuerst 20 Minuten bei 1000 UpM (119 x g) und 4°C zentrifugiert, anschließend 30 Minuten bei 15000 UpM (26712 x g) und 4°C, 30 Minuten bei 21000 UpM (52849 x g) und 4°C, 30 Minuten bei 25000 UpM (74900 x g) und 4°C und zuletzt 30 Minuten bei 28000 UpM (93955 x g) und 4°C. Danach wurden die Partikel der Schritte 15000-28000 UpM gepoolt, durch einen 5 µm-Filter filtriert, zu 500 µl aliquotiert, bei -80°C eingefroren und lyophilisiert. Für die weitere Verwendung wurden sie im Kühlschrank und gegebenenfalls unter Lichtschutz bei 4°C gelagert.

3.4.2.1.2. Methode 2

Zu 10 mg BrijS20-Propargylamin-RGD-Konjugat wurden 500 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) und 500 µl Aceton zugefügt, am Vortexmischer gemischt, im Ultraschallbad bis zur vollständigen Lösung inkubiert und auf ein Endvolumen von 2 ml mit Aceton, bei Bedarf inklusive 50 µl BodiPy (0,5 mg/ml), aufgefüllt. 50 mg PLGA wurden in 1 ml Aceton gelöst und mit dem gelösten Konjugat vereint (organische Phase). 30 ml 0,5%ige PVA-Lösung (wässrige Phase) wurden vorgelegt und der Ultraschallstab gestartet. Die organische Phase wurde über eine 5ml-Spritze mit passender Kanüle in die wässrige Phase injiziert und 3 Minuten unter Kühlung mit dem Ultraschallstab bei einer Intensität von 40% behandelt. Danach wurde die Suspension in 20 ml 0,5%ige PVA-Lösung überführt und 60 Minuten am Magnetrührer unter Pressluftzufuhr gerührt, bis das Aceton abgedampft war.

Die Reinigung der Nanopartikelsuspension erfolgte durch Zentrifugation. Der erste Zentrifugationsschritt erfolgte bei 1000 UpM (119 x g) und 20 Minuten bei 20°C, der Zweite bei 10000 UpM (11872 x g) 30 Minuten bei 20°C, der Dritte bei 15000 UpM (26712 x g) 30 Minuten bei 20°C, der Vierte bei 19000 UpM (42858 x g) 30 Minuten bei 20°C und der letzte Zentrifugationsschritt bei 25000 UpM (74900 x g) 30 Minuten bei 20°C. Die Partikel der Zentrifugationsschritte 10000-25000 UpM wurden gepoolt, durch einen 5 µm-Filter filtriert, zu je 500 µl aliquotiert, bei -80°C eingefroren und lyophilisiert. Zur Aufbewahrung wurden sie bei Bedarf unter Lichtschutz bei 4°C gelagert.

3.4.2.2. Herstellung von BrijS20-FimH-Peptid₁₋₁₀-Nanopartiklen

9 mg BrijS20-Propargylamin-Peptid₁₋₁₀-Konjugat wurden in 500 µl DMSO und 500 µl Aceton am Vortexmischer dispergiert und zur vollständigen Lösung im Ultraschallbad inkubiert. Anschließend wurde auf ein Endvolumen von 2 ml mit Aceton aufgefüllt. 50 mg PLGA wurden in 1 ml Aceton gelöst und mit dem gelösten Konjugat vereint (organische Phase). 30 ml 0,5%ige PVA-Lösung (wässrige Phase) wurden vorgelegt, die Emulgierung mit dem Ultraschallstab bei 40% Intensität gestartet, wobei die organische Phase über eine 5 ml-Spritze mit Kanüle zügig injiziert wurde und 3 Minuten unter Kühlung mit einem kalten Wasserbad erfolgte. Darauffolgend wurde die Suspension in 50 ml 0,5%ige PVA-Lösung geschüttet und 1 Stunde unter Druckluftzufuhr am Magnetrührer gerührt, bis das Aceton abgedampft war.

Danach erfolgte die Reinigung über Zentrifugation. Der erste Schritt bestand in 1000 UpM (119 x g) bei 20°C für 20 Minuten, der nächste bei 10000 UpM (11872 x g) bei 20°C für 15 Minuten, dann bei 13000 UpM (20064 x g) bei 20°C für 15 Minuten, danach bei 16000 UpM (30392 x g) bei 20°C für 15 Minuten und zuletzt bei 19000 UpM (42858 x g) bei 20°C für 30 Minuten. Die Nanopartikel der Zentrifugationsschritte 10000-19000 UpM wurden gepoolt, durch ein 5 µm-Filter filtriert, zu je 500 µl aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Die Lyophilisate wurden bei 4°C Kühlschrank aufbewahrt.

3.4.3. Herstellung von Folsäure-funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln

5 mg BrijS20-Folsäure-Konjugat (das Konjugat wurde in der Arbeitsgruppe von meiner Kollegin Magdalena Herzog, BSc hergestellt) wurden in 500 µl DMSO angelöst und auf ein Endvolumen von 2 ml mit Aceton aufgefüllt. Die Dispersion wurde immer wieder am Vortexmischer gemischt, da das Konjugat sehr schlecht löslich war – bei Bedarf wurde es zusätzlich kurz im Ultraschallbad inkubiert. 50 mg PLGA wurden eingewogen und in 950 µl Ethylacetat und bei Bedarf unter Zusatz von 50 µl BodiPy (0,5 mg/ml) vollständig gelöst und mit der Lösung des BrijS20-Folsäure-Konjugates in DMSO und Aceton mit der Kolbenhubpipette vereinigt (organische Phase). Anschließend wurde die organische Phase 1 Minute am Ultraschallstab bei einer Intensität von 50% behandelt. Danach wurde diese mittels einer 5 ml-Spritze mit Kanüle aufgezogen, in 30 ml 0,5%ige PVA-Lösung (wässrige Phase) injiziert und 3 Minuten bei 40% Intensität des Ultraschallstabes unter Kühlung durch ein kaltes Wasserbad

behandelt. Die gebildete Suspension wurde in 50 ml 0,5%ige PVA-Lösung eingebracht und 1 Stunde lang unter Pressluftzufuhr am Magnetrührer bis zum Abdampfen der organischen Lösungsmittel gerührt.

Anschließend wurde die Partikelsuspension durch Zentrifugation gereinigt. Der erste Zentrifugationsschritt erfolgte bei 1000 UpM ($119 \times g$) bei 20°C für 20 Minuten, darauffolgend bei 10000 UpM ($11872 \times g$) bei 20°C für 15 Minuten, dann bei 13000 UpM ($20064 \times g$) bei 20°C für 15 Minuten, dann bei 16000 UpM ($30392 \times g$) bei 20°C für 15 Minuten und zuletzt bei 19000 UpM ($42858 \times g$) bei 20°C für 15 Minuten. Die Nanopartikel der Zentrifugationsschritte 10000-19000 UpM wurden gepoolt, durch ein 5 µm-Filter filtriert und zu je 500 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäßen aliquotiert. Nach Einfrieren bei -80°C wurden die Aliquote lyophilisiert. Zum weiteren Gebrauch wurden sie im Kühlschrank bei 4°C und gegebenenfalls unter Lichtschutz gelagert.

3.4.4. Bestimmung der Größe, des PDI und des Zetapotentials

Von sämtlichen Nanopartikelsuspensionen wurde während der Herstellung (wie in den Abschnitten 3.4.-0. beschrieben) zwischen den einzelnen Zentrifugationsschritten als Inprozesskontrolle die mittlere Partikelgröße und der Polydispersitätsindex (PDI) über dynamische Lichtstreuung bestimmt. Dieses Messprinzip basiert auf der Brown'schen Molekularbewegung der Partikeln.

Der PDI gibt Auskunft über die Größenverteilung der Partikel, das heißt je größer der PDI, desto weiter divergieren die Partikeln in ihrer Größe. Hier wird ein $PDI < 0,2$ angestrebt, sodass die Partikelsuspensionen als monodispers bezeichnet werden können. Nach Beendigung der Herstellung wurden die Partikelsuspensionen jener Zentrifugationsschritte vereint, die diese enge Größenverteilung ergaben.

Von diesen gepoolten Nanopartikeln wurde zusätzlich zur mittleren Partikelgröße und des PDI auch das Zetapotential über die elektrophoretische Mobilität bestimmt. Das Zetapotential gibt Auskunft über die Ladung der hydratisierten Partikel und ist ein Maß für die Stabilität von Suspensionen. Werte unterhalb -30 mV und oberhalb 30 mV gelten als stabil – diese Suspensionen neigen nicht zur Aggregation.

3.4.4.1. Ergebnisse und Diskussion

Die Nanopartikel wurden wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben hergestellt. Abbildung 5 zeigt, dass die Partikelchargen einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 200 nm hatten. Ausnahmen waren die RGD-Partikel, die nach Methode 1 hergestellt wurden, welche kleiner waren (< 100 nm) und die Folsäure-Nanopartikel, die mit 350 nm signifikant größer waren. Alle Partikelchargen hatten einen $PDI < 0,2$ und waren somit monodispers, wobei die Partikel aus reinem PLGA, RGD-Partikel der Methode 1 und FimH-P₁₋₁₀-Partikel einen $PDI < 0,1$ aufwiesen und somit eine noch engere Größenverteilung hatten. Für die RGD-Partikel der Methode 1 ist aufgrund ihrer geringen Größe eine

andere Reinigungsmethode wie Dialyse heranzuziehen, da sie durch Zentrifugation nicht vollständig abgetrennt werden konnten. Aus dem Grund wurden für alle weiteren Experimente, die nach diesem Kapitel besprochen werden, nur noch die RGD-Partikeln der Methode 2 verwendet.

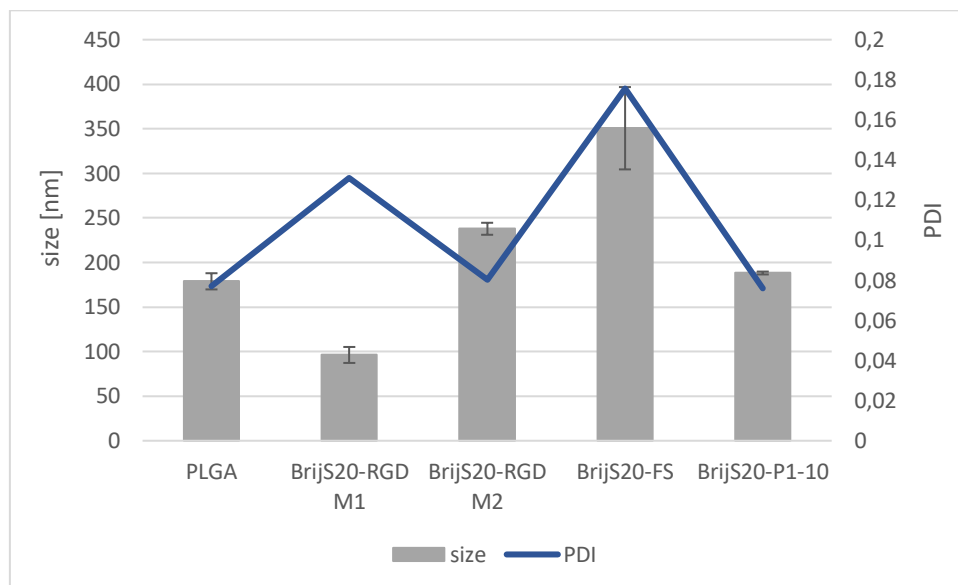


Abbildung 5: Mittlerer hydrodynamischer Durchmesser der unterschiedlichen PLGA-Nanopartikel in nm auf der linken vertikalen Achse und die dazugehörigen PDI-Werte auf der rechten sekundären vertikalen Achse.

(In der Abbildung bezeichnet „PLGA“ nicht-modifizierte Nanopartikel aus PLGA, „BrijS20-RGD M1“ PLGA-Nanopartikel, die über Methode 1 mit BrijS20-RGD modifiziert wurden, „BrijS20-RGD M2“ PLGA-Nanopartikel, die über Methode 2 mit BrijS20-RGD modifiziert wurden, „BrijS20-FS“ PLGA-Nanopartikel, die mit BrijS20-Folsäure modifiziert wurden und „BrijS20-P1-10“ PLGA-Nanopartikel, die mit BrijS20-FimH-Peptid₁₋₁₀ modifiziert wurden.)

Das Zetapotential der unterschiedlichen Partikelchargen lag zwischen -2,9 und -1,6 mV (siehe Tabelle 6) und somit im nicht-stabilen Bereich. Diese Messwerte sind auf die Verwendung von PVA als Stabilisatorlösung bei der Herstellung zurückzuführen, wodurch sich ein PVA-Film auf der Oberfläche der Nanopartikel ausbildet, welcher die Oberflächenladung abschirmt.

Tabelle 6: Mittleres Zetapotential der verschiedenen Nanopartikelarten in mV.
(Die Bezeichnungen der Partikelarten stimmen mit denen in Abbildung 5 überein.)

	Zetapotential [mV]
PLGA	-3,00
BrijS20-RGD M1	-1,93
BrijS20-RGD M2	-1,63
BrijS20-FS	-2,26
BrijS20-P1-10	-1,90

3.4.5. Quantifizierung der Peptidmenge in BrijS20-RGD-Nanopartikel

Zur Bestimmung der Menge an konjugiertem RGD-Azid an die Oberfläche der Nanopartikel wurde der BCA-Assay (Bicinchoninsäure), ein quantitatives Testverfahren für die Proteinbestimmung, herangezogen. Dieser beruht auf der Reduktion von zweiwertigem Kupfer (Cu^{2+}) zu einwertigem Kupfer (Cu^{1+}) durch Proteine in alkalischer Umgebung. Dabei bindet Cu^{2+} an die Peptidbindungen und

wird zu Cu^{1+} reduziert. Ein Cu^{1+} -Ion komplexiert mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure zu einem violetten Farbkomplex, welcher in wässriger Lösung bei 562 nm quantifiziert werden kann. (39) Es wurde im Vorfeld eine Eichgerade mit dem RGD-Azid erstellt, aus der anhand der gemessenen Absorption der Proben am Mikrotiterplatten-Lesegerät die Konzentration errechnet werden konnte. Zur Herstellung des Arbeitsreagenz wurde ein Micro BCA Protein Assay Kit verwendet, dieses beinhaltet die drei Reagenzien „Reagenz A“ (alkalischer Tartrat-Carbonat-Puffer), „Reagenz B“ (Bicinchoninsäure-Lösung) und „Reagenz C“ (Kupfersulfat-Lösung), welche im Verhältnis 25:24:1 gemischt wurden. In eine 96-Wellplatte wurden pro Well jeweils 150 µl der verdünnten Proben mit 150 µl Arbeitsreagenz pipettiert, die Platte mit einer Klebefolie abgeklebt, 30 Sekunden geschüttelt und danach zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 562 nm im Mikrotiterplatten-Lesegerät bestimmt, die erhaltenen Werte in die RGD-Eichgerade eingesetzt und die Konzentrationen berechnet.

3.4.5.1. Ergebnisse und Diskussion

Es wurden ebenfalls nicht-modifizierte PLGA-Nanopartikel neben den BrijS20-RGD-Nanopartikel zu Vergleichszwecken untersucht. Außerdem wurden unterschiedliche Konzentrationen der Partikelsuspensionen analysiert. Die Messwerte waren jedoch höher als die der errechneten maximal möglichen Peptidkonzentration und zudem waren die berechneten Werte der unterschiedlichen Partikelkonzentrationen nicht einheitlich. Da Kupfer einen Störfaktor im BCA-Assay darstellt und die Herstellung des BrijS20-Peptid-Konjugats über Kupfer katalysiert wurde, kann es bei nicht vollständiger Abtrennung des Kupfers zu einer Beeinflussung der Werte kommen. Daher eignet sich hier das BCA-Assay nicht für die Quantifizierung und es sollte ein alternatives Testverfahren herangezogen werden.

3.4.6. Quantifizierung der Peptidmenge in BrijS20-FimH-Peptid₁₋₁₀-Nanopartikeln

Die eingebaute Menge an FimH-Peptid₁₋₁₀-Azid in die Hülle der Nanopartikel wurde über ein Amino-Assay, das auf der Reaktion von Fluoraldehyd mit primären Aminogruppen basiert, quantifiziert. Diese Reaktion ermöglicht eine Fluoreszenzdetektion und damit eine Quantifizierung. Dafür wurde eine Eichgerade mit 1,4-Diaminobutanhydrochlorid erstellt über die die Konzentrationen der Proben errechnet werden konnten.

Für die Herstellung des Fluoraldehydreagenz wurden 8 mg o-Phthaldialdehyd in 5 ml HEPES-Puffer pH 9 gelöst und unter Lichtschutz 4,2 µl Mercaptoethanol zugegeben. Es wurden je 700 µl der verdünnten Proben mit 175 µl Fluoraldehydreagenz unter Lichtschutz gut gemischt und fünf Minuten inkubiert. Davon wurden Aliquote von je 250 µl in eine 96-Wellplatte pipettiert und die Fluoreszenzintensität bei 340/455 nm (Exzitations-/Emissionswellenlänge) am Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen. Die erhaltenen Fluoreszenzwerte wurden in die Eichgerade eingesetzt und die Peptidkonzentrationen ermittelt.

3.4.6.1. Ergebnisse und Diskussion

Zusätzlich zu den BrijS20-FimH-Peptid₁₋₁₀-Nanopartikeln wurden nicht-modifizierte Nanopartikel aus PLGA als Leerwerte analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 in µg Peptid/mg Nanopartikel und als Einbaueffizienz in Prozent dargestellt. Der Versuch zeigt, dass die Kopplung von FimH-Peptid₁₋₁₀ über BrijS20 an PLGA-Nanopartikel möglich ist, die Nanopartikel-gebundene Menge jedoch nicht sehr hoch ist. Eine Optimierung der Herstellung ist nötig, um höhere Kopplungsraten zu erzielen. Wie in Kapitel 3.3.2. erwähnt, war das Produkt nach der Herstellung und anschließender Reinigung durch Dialyse außerdem nicht ausreichend rein. Daher könnte eine andere Reinigungsmethode herangezogen werden, um ein reines Produkt und eine effizientere Kopplung zu erzielen.

Tabelle 7: Mittlerer Peptidgehalt und mittlere Einbaueffizienz der BrijS20-FimH-Peptid₁₋₁₀-Nanopartikel ermittelt über Amino-Assay.

durchschnittlicher Peptidgehalt	1,09 ± 0,02 µg/mg Nanopartikel
durchschnittliche Einbaueffizienz	8,68 ± 0,20 %

3.6. Zellkulturtechniken

3.6.1. Verwendete Zelllinien und deren Subkultivierung

Zellversuche wurden mit den Zelllinien 5637 (humane Urothelkarzinomzellen), KB (Abkömmlinge der humanen Zervixkarzinomzelllinie HeLa), THP-1 (humane monozytäre Leukämiezellen) und CaCo-2 (humane Kolonkarzinomzellen) durchgeführt. 5637-, THP-1- und CaCo-2-Zellen wurden in Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640-Medium in 75 cm²-Zellkulturflaschen, die KB-Zellen in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) in 25 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert. Die Medien wurden wie in Abschnitt 2.3. beschrieben hergestellt. Alle Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% kultiviert. Bei einer Konfluenz von ungefähr 80% wurden sie passagiert.

Bei den 5637-, KB- und CaCo-2-Zellen wurde unter sterilen Bedingungen das verbrauchte Medium abgesaugt, mit PBS 0,1% EDTA (5637- und KB-Zellen) bzw. mit PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ (CaCo-2-Zellen) gewaschen, mit Trypsin-EDTA (5637- und KB-Zellen) bzw. mit TrypLE Select (CaCo-2-Zellen) versetzt und die 5637-Zellen 15 Minuten, die KB-Zellen 2,5 Minuten und die CaCo-2-Zellen 20 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Abklopfen von der Wachstumsfläche abgelöst, in frischem Medium aufgenommen, in ein 30 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 1000 UpM (120 x g) fünf Minuten zentrifugiert. Das Medium über dem entstandenen Zellpellet wurde abgesaugt, das Zellpellet in 2 ml frischem Medium aufgenommen, einige Tropfen der Zellsuspension in eine Zellkulturflasche mit bereits vorgelegtem Medium überführt und zum Kultivieren im Brutschrank inkubiert.

Da es sich bei den THP-1-Zellen um nicht adhärente Zellen handelt, gestaltete sich das Passagieren der Zellen anders. Nach gründlichem Resuspendieren wurde die gesamte Zellsuspension in ein 30 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt, bei 1000 UpM (120 x g) fünf Minuten zentrifugiert, das Medium

über dem entstandenen Zellpellet abgesaugt, das Zellpellet in 2 ml frischem Medium aufgenommen. Von wenigen Tropfen der Zellsuspension wurde in einer Bürker-Türk-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Einige Tropfen der Zellsuspension wurden in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium transferiert, um die Zellkonzentration auf 250000 Zellen/ml einzustellen. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank zur weiter kultiviert.

3.6.2. Differenzierung der THP-1-Monozyten zu Makrophagen

THP-1-Zellen sind Monozyten, die nach Inkubation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) zu Makrophagen differenzieren können. Für Zellversuche wurden Zellmonolayer der THP-1-Zellen mit einer Zellzahl von 300000 Zellen/ml in 300 µl (48-Wellplatten) oder 160 µl (96-Wellplatten) RPMI + 20% Fetales Kälberserum (FCS), um das Wachstum der Zellen zusätzlich anzutreiben, angelegt und in jedes Well 1 µl PMA-Lösung (0,01 mg/ml DMSO) unter Lichtschutz zugesetzt. Die Zellen, die zuvor einzelne, kleine, runde Zellen waren, veränderten ihr Aussehen immer mehr zu dem von Makrophagen – sie wurden größer, verloren ihre runde Form, bekamen Ausläufer und hafteten immer stärker an der Wachstumsfläche (siehe Abbildung 6). Das Medium wurde – je nach Differenzierungsstatus – nach drei bis fünf Tagen durch frisches RPMI + 20% FCS ohne PMA-Zusatz ersetzt, gegebenenfalls nach ein paar Tagen noch ein weiterer Mediumwechsel durchgeführt und dann die Zellen so lange kultiviert, bis der Zellmonolayer konfluent war. Dies war allerdings bei den differenzierten THP-1-Zellen eher schwer zu erreichen.

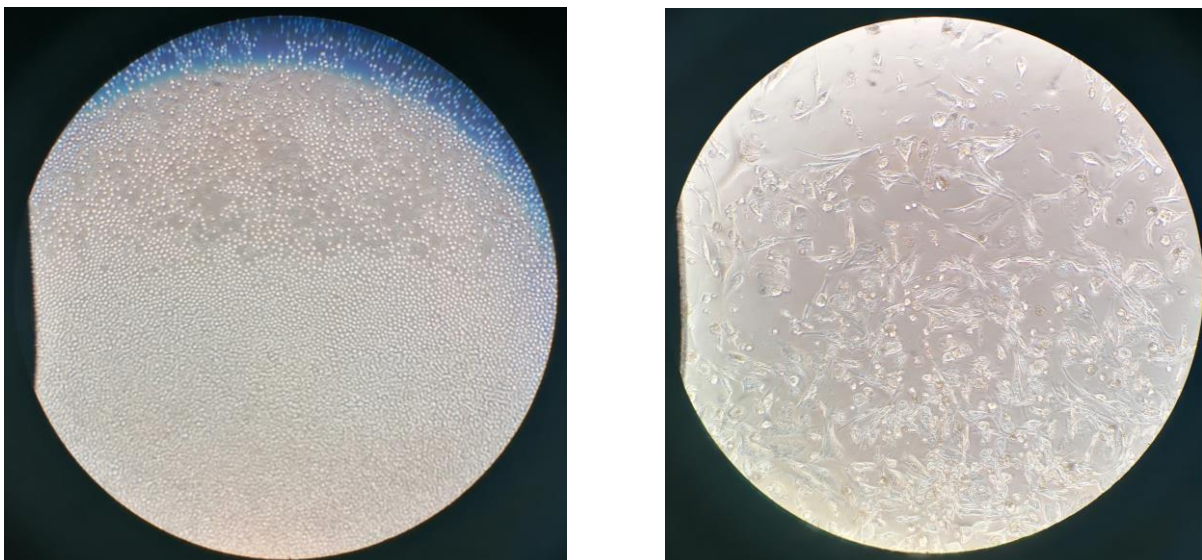


Abbildung 6: Differenzierung von THP-1-Zellen durch PMA: Aufnahmen von undifferenzierten Monozyten (links) und differenzierten Makrophagen (rechts) durch ein Lichtmikroskop.

3.7. Zellbindungs- und Internalisierungsstudien

Es wurden Zellversuche mit Nanopartikeln sowohl in Zellsuspensionen als auch am konfluenten Zellmonolayer mit den verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Die Intensität der Partikel-Zellinteraktion wurde im Durchflusszytometer als auch im Mikrotiterplatten-Lesegerät bestimmt. Zur Detektierbarkeit der Nanopartikel wurde der Fluoreszenzfarbstoff BodiPy 493/503 bereits bei der Herstellung in die Nanopartikel eingebaut. Die gemessene Fluoreszenzintensität korreliert dabei mit der Zellbindung bzw. Zellinternalisierung.

3.7.1. Zellbindungsversuch mit BrijS20-RGD-Nanopartikeln an 5637-Einzelnzellen im Durchflusszytometer

Dieser Zellbindungsversuch wurde im Durchflusszytometer mit 5637-Zellen durchgeführt, welche zuvor mit RGD-Nanopartikeln und unmodifizierten PLGA-Nanopartikeln als Vergleich inkubiert wurden.

Die 5637-Zellen wurden in der Bürker-Türk-Zählkammer gezählt und die Zellsuspension auf eine Konzentration von 3000000 Zellen/ml eingestellt. Die lyophilisierten Partikel wurden in isotonomem HEPES pH 7,4 suspendiert und auf eine Konzentration von 0,6 mg/ml eingestellt, anschließend wurde die Fluoreszenz der Partikelsuspensionen zur Vergleichbarkeit am Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 485/525 nm (Exzitations-/Emissionswellenlänge) bestimmt. Zu je 100 µl Zellsuspension wurden 100 µl Nanopartikelprobe in Eppendorf-Reaktionsgefäßen pipettiert, leicht gevortext, zwei Stunden bei 37°C inkubiert und dabei alle 30 Minuten leicht geschwenkt. Anschließend wurden sie fünf Minuten bei 1000 UpM und 4°C zentrifugiert, der Überstand über dem Pellet vorsichtig abgenommen, jeweils 200 µl isotoner HEPES pH 7,4 zugegeben und die Zellsuspension resuspendiert. In den Röhrchen für das Durchflusszytometer wurden 800 µl isotoner HEPES pH 7,4 vorgelegt und die Zellsuspension zugefügt.

3.7.2. Zellbindungsversuch mit BrijS20-RGD-Nanopartikeln an KB-Zellen im Monolayer im Mikrotiterplatten-Lesegerät

Der Zellbindungsversuch wurde im Mikrotiterplatten-Lesegerät mit KB-Zellen im Monolayer durchgeführt. Die Zellrasen wurden zuvor mit RGD-Nanopartikeln und unmodifizierten PLGA-Nanopartikeln als Vergleich inkubiert. Die KB-Zellmonolayer wurden in 96-Wellplatten angelegt und die Zellen im Brutschrank so lange kultiviert, bis sie konfluent waren.

Die fluoreszenzmarkierten Nanopartikel wurden in isotonomem HEPES-Puffer pH 7,4 suspendiert, für die Vergleichbarkeit untereinander auf dieselben Konzentrationen eingestellt und ihre Fluoreszenzintensität im Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 485/525 nm (Exzitations-/Emissionswellenlänge) bestimmt. Anschließend wurde das Medium aus den Wells abgesaugt und die Zelllayer zweimal mit 100 µl isotonem HEPES-Puffer pH 7,4 gewaschen. Es wurden je 100 µl der Proben in die Wells pipettiert, die Gesamtfluoreszenzintensität der Nanopartikel im Mikrotiterplatten-

Lesegerät bei 485/525 nm (Exzitations-/Emissionswellenlänge) bestimmt und danach die Platten zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach Absaugen der Flüssigkeit aus den Wells wurde jedes Well mit 100 µl isotnem HEPES-Puffer pH 7,4 gewaschen, 100 µl isotoner HEPES-Puffer pH 7,4 auf jedes Well pipettiert und erneut die Fluoreszenz am Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 485/525 nm (Exzitations-/Emissionswellenlänge) bestimmt.

3.7.2.1. Ergebnisse und Diskussion

Bei diesen Zellbindungsversuchen wurde untersucht, ob PLGA-Nanopartikel, deren Oberfläche mit dem Tripeptid RGD funktionalisiert wurden, im Vergleich zu PLGA-Nanopartikeln ohne Oberflächenmodifikation eine erhöhte Interaktion mit 5637-Zellen bzw. KB-Zellen zeigen. Wie aus Abbildung 7 und Abbildung 8 ersichtlich ist, zeigten die BrijS20-RGD-Nanopartikel im Vergleich zu den nicht modifizierten PLGA-Nanopartikeln sowohl an 5637-Zellen als auch an KB-Zellen eine höhere Zellbindung. Damit bewirkt eine Modifikation mit dem RGD-Tripeptid, welches in der Zelladhäsion als Erkennungsmotiv für die Integrine eine wichtige Rolle spielt, eine bessere Zellbindung der Partikel. Zudem zeigt der Versuch mit den KB-Zellen im Monolayer, bei dem die Nanopartikel in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt wurden, dass die Zellbindung konzentrationsabhängig ist und mit zunehmender Konzentration der Nanopartikel steigt (siehe Abbildung 8).

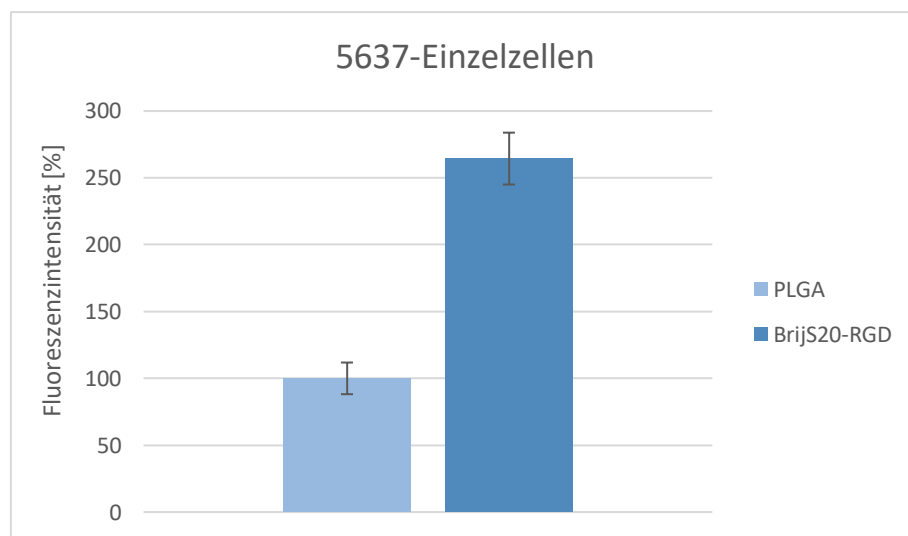


Abbildung 7: Zellbindung von BrijS20-RGD-Nanopartikeln („BrijS20-RGD“) im Vergleich zu nicht-modifizierten PLGA-Nanopartikeln („PLGA“) (100%-Wert) an 5637-Einzelzellen ermittelt über Durchflusszytometrie.

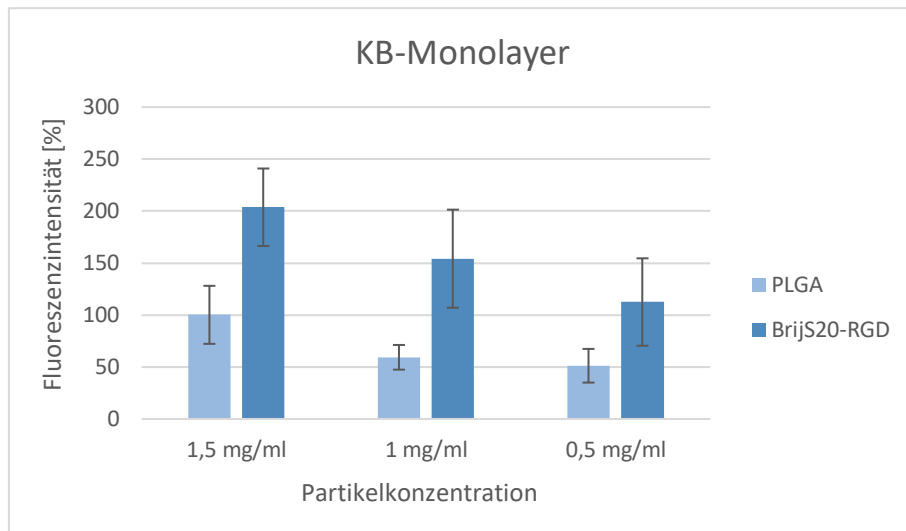


Abbildung 8: Zellbindung von BrijS20-RGD-Nanopartikeln („BrijS20-RGD“) im Vergleich zu nicht modifizierten PLGA-Nanopartikeln („PLGA“) (100%-Wert) an KB-Zellen im Monolayer ermittelt über Mikrotiterplatten-Lesegerät.

3.7.3. Endozytosezellversuche im Durchflusszytometer

Bei diesen Zellversuchen wurden die Endozytosewege über die die unterschiedlichen PLGA-Nanopartikel (reine PLGA-, RGD-funktionalisierte und Folsäure-funktionalisierte PLGA-Nanopartikel) in Zellen der Zelllinien 5637, KB, THP-1 (differenziert) und CaCo-2 aufgenommen werden, untersucht. Bestimmte Endozytosewege wurden durch Zusatz der Arzneistoffinhibitoren Chlorpromazin, Nystatin und Amilorid sowie durch Inkubation bei 4°C selektiv gehemmt. Die Inkubation bei 4°C inhibiert aktive, energieabhängige Transportprozesse, Chlorpromazin die Clathrin-medierte Endozytose, Nystatin die Caveolin-medierte Endozytose und Amilorid die Makropinozytose. (17) Dafür wurden Monolayer der jeweiligen Zelllinien in 48-Wellplatten angelegt und im Brutschrank so lange kultiviert, bis sie konfluent waren.

Am Tag des Versuches wurde von allen Wells das Medium abgesaugt und durch 495 µl frisches Medium ersetzt. Bei Inkubation bei 37°C wurden 5 µl Inhibitorstocklösung in DMSO in die Wells pipettiert (Endkonzentration 20 µM Chlorpromazin, 108 µM Nystatin, 2 µM Amilorid), bei 4°C-Inkubation wurden 5 µl DMSO zugesetzt. Anschließend wurden die Platten mit den Inhibitorenlösungen zwei Stunden bei 37°C und die 4°C-Platten zwei Stunden im Kühlschrank inkubiert. Die fluoreszenzmarkierten Nanopartikel wurden in Medium suspendiert und für die Vergleichbarkeit untereinander auf dieselbe Partikelkonzentration eingestellt sowie am Mikrotiterplatten-Lesegerät die Fluoreszenz bei 485/525 nm (Exzitations-/Emissionswellenlänge) bestimmt.

Nach der Vorinkubation mit Inhibitor bzw. bei Energiedefizienz wurde das Medium aus jedem Well entfernt, durch 375 µl frisches Medium ersetzt, 125 µl Nanopartikelsuspension zugefügt und die Zellen vier Stunden bei 4°C bzw. 37°C inkubiert. Danach wurden sie auf Eisplatten platziert, das Medium abgesaugt und 100 µl Heparin in isotonem HEPES-Puffer pH 7,4 (4000 IU/ml) zugesetzt. Durch die Heparinlösung werden jene Nanopartikel abgewaschen, die nur an die Zelloberfläche gebunden sind

und nicht aufgenommen wurden. Anschließend wurden die Zellmonolayer 30 Minuten in den Kühlschrank gestellt, die Heparinlösung abgesaugt, 100 µl Trypsin-Lösung zugesetzt und die Zellschichten 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden 500 µl isotoner HEPES-Puffer pH 7,4 + 2% FCS zugegeben, gut mit der Kolbenhubpipette suspendiert, der gesamte Inhalt jedes Wells in Epporöhrchen überföhrt und die so behandelten Zellen im Durchflusszytometer analysiert.

3.7.3.1. Ergebnisse und Diskussion

Die Aufnahme der Nanopartikel in die verschiedenen Zelllinien ist in Bezug zu der Aufnahme der Nanopartikel bei 37°C ohne Hemmung durch Inhibitoren in Abbildung 9 bis Abbildung 12 dargestellt. In allen Zelllinien konnte der aktive Weg durch Inkubation bei 4°C gehemmt werden und somit gezeigt werden, dass die Aufnahme Energie-abhängig ist. In den Zelllinien 5637 und KB konnte die Aufnahme durch den Clathrin-vermittelten Weg durch Inhibition mit Chlorpromazin reduziert werden, in den KB-Zellen jedoch geringer als in den 5637-Zellen. In den 5637-Zellen fand keine Hemmung durch Nystatin (Caveolin-vermittelter Weg) oder Amilorid (Makropinozytose) statt. In den KB-Zellen erfolgte ebenfalls keine Inhibition durch Nystatin, jedoch – vor allem bei den RGD- und Folsäure-Nanopartikeln – gering durch Amilorid, was daraufhin deutet, dass die Aufnahme der Nanopartikel in KB-Zellen neben dem Clathrin-vermittelten Weg auch durch Makropinozytose erfolgt.

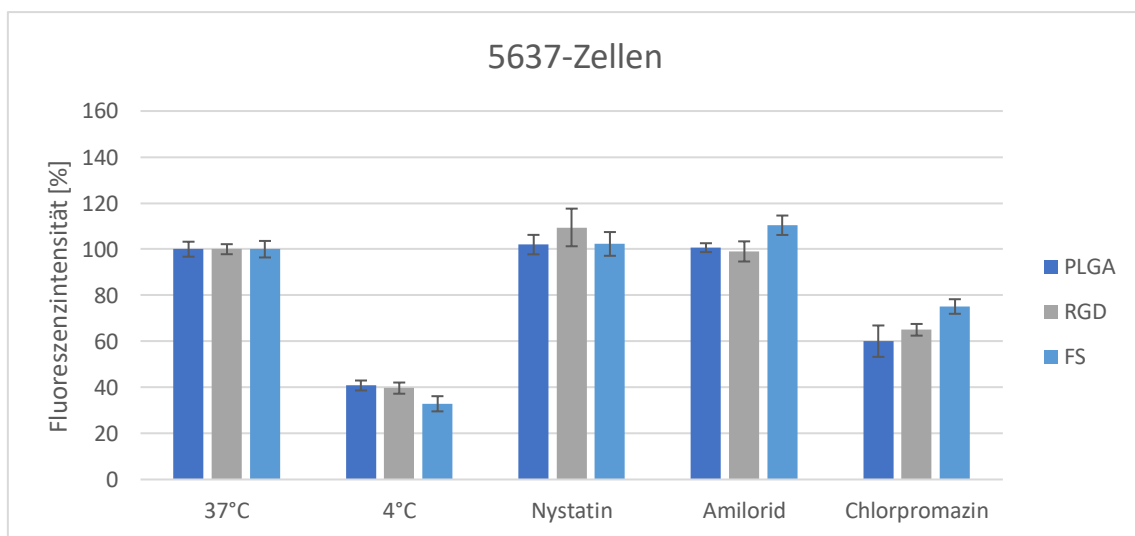


Abbildung 9: Internalisierung der verschiedenen Nanopartikel in Prozent auf der linken vertikalen Achse in 5637-Zellen nach Inkubation bei 37°C, 4°C, mit Nystatin, Amilorid und Chlorpromazin. Die linke Balkengruppe stellt den 100%-Wert als Bezug für die Aufnahme der Nanopartikel bei 37°C ohne Hemmung durch Inhibitoren dar.

(In der Abbildung bezeichnet „PLGA“ nicht-modifizierte Nanopartikel bestehend aus PLGA, „RGD“ PLGA-Nanopartikel, die mit BrijS20-RGD-Konjugat modifiziert wurden und „FS“ PLGA-Nanopartikel, die mit BrijS20-FS-Konjugat modifiziert wurden.)

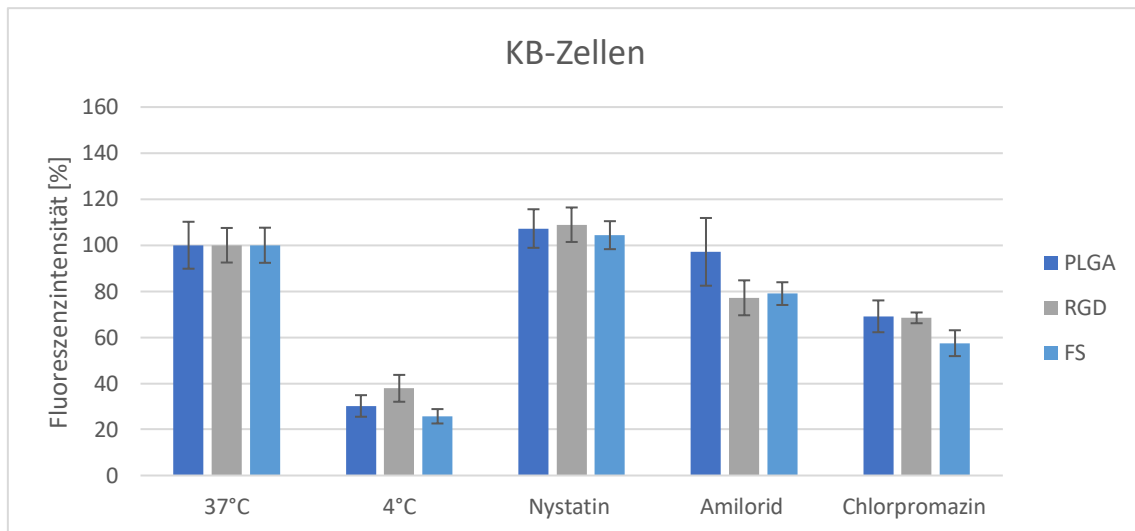


Abbildung 10: Internalisierung der verschiedenen Nanopartikel in Prozent auf der linken vertikalen Achse in KB-Zellen nach Inkubation bei 37°C, 4°C, mit Nystatin, Amilorid und Chlorpromazin. Die linke Balkengruppe stellt den 100%-Wert als Bezug für die Aufnahme der Nanopartikel bei 37°C ohne Hemmung durch Inhibitoren dar.

(Die Bezeichnung der Nanopartikelarten erfolgte wie in Abbildung 9.)

Bei den THP-1-Zellen sind die Ergebnisse nicht klar. Der aktive Weg (4°C) und der Clathrin-vermittelte Weg (Chlorpromazin) scheint hier zwar ebenfalls gehemmt worden zu sein, die Hemmung des aktiven Weges ist jedoch nicht so ausgeprägt wie bei den anderen beiden Zelllinien. Außerdem wurde in den THP-1-Zellen die Aufnahme durch Nystatin (Caveolin-medierte Endozytose) und Amilorid (Makropinozytose) reduziert, wenn auch in geringem Ausmaß. Im Allgemeinen ist hier außerdem die Aufnahme der verschiedenen Nanopartikel sehr unterschiedlich.

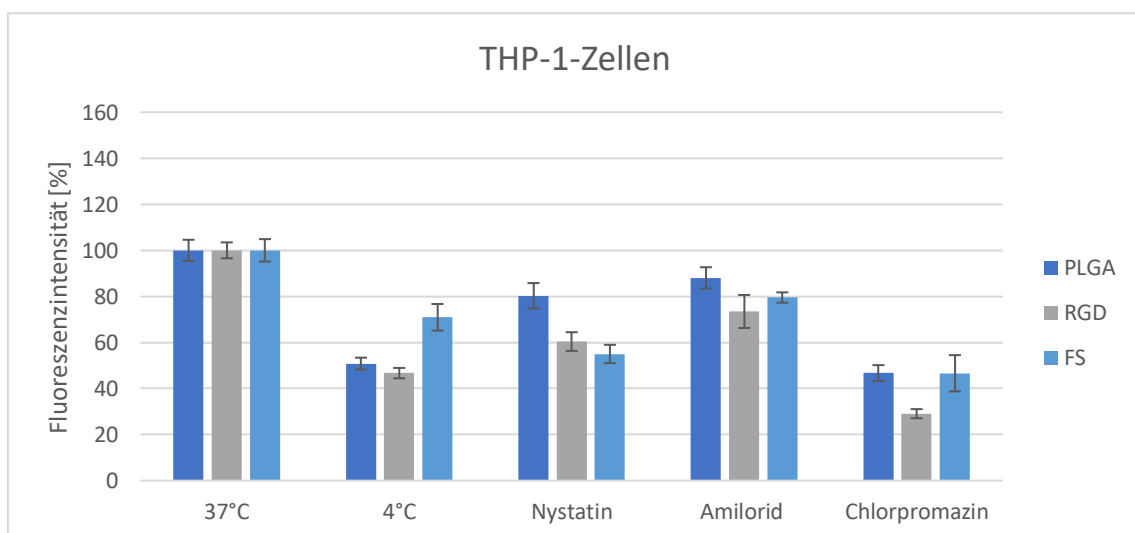


Abbildung 11: Internalisierung der verschiedenen Nanopartikel in Prozent auf der linken vertikalen Achse in THP-1-Zellen nach Inkubation bei 37°C, 4°C, mit Nystatin, Amilorid und Chlorpromazin. Die linke Balkengruppe stellt den 100%-Wert als Bezug für die Aufnahme der Nanopartikel bei 37°C ohne Hemmung durch Inhibitoren dar.

(Die Bezeichnungen der Nanopartikelarten erfolgte wie in Abbildung 9.)

Auch bei den CaCo-2-Zellen sind die Ergebnisse eher uneindeutig. Durch Inkubation bei 4°C als auch durch Chlorpromazin konnte nur eine geringe Inhibition der Aufnahme der Nanopartikel herbeigeführt werden. Amilorid hingegen hat anscheinend sogar zu einer erhöhten Aufnahme geführt, was eher zu bezweifeln ist.

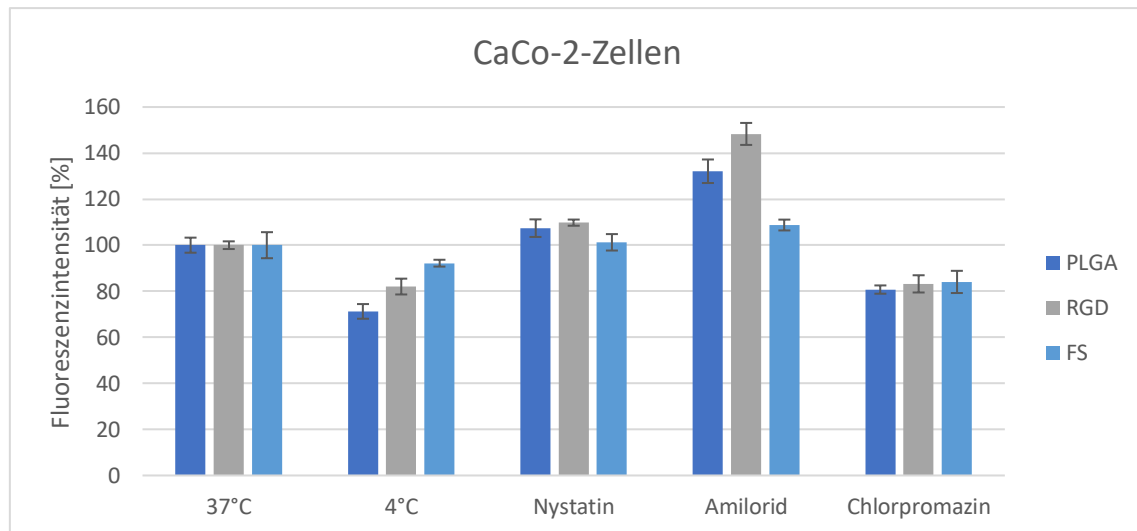


Abbildung 12: Internalisierung der verschiedenen Nanopartikel in Prozent auf der linken vertikalen Achse in CaCo-2-Zellen nach Inkubation bei 37°C, 4°C, mit Nystatin, Amilorid und Chlorpromazin. Die linke Balkengruppe stellt den 100%-Wert als Bezug für die Aufnahme der Nanopartikel bei 37°C ohne Hemmung durch Inhibitoren dar.

(Die Bezeichnungen der Nanopartikelarten erfolgte wie in Abbildung 9.)

3.7.4. Zelllyseversuche im Mikrotiterplatten-Lesegerät

In den intrazellulären Kompartimenten bestehen unterschiedliche pH-Werte. Da die Fluoreszenzintensität pH-abhängig ist, kann es, je nachdem wo sich die aufgenommenen fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln innerhalb der Zelle befinden, zu einer Abschwächung bis Löschung der Fluoreszenz („Quenching“) kommen und somit die aufgenommenen Partikel nicht bestimmt werden. Außerdem besteht bei Zellen im Monolayer durch ihre räumliche Anordnung ein höheres Potenzial zum Quenching als bei Einzelzellversuchen wie beispielsweise im Durchflussszytometer. Deswegen könnten Tendenzen der Messungen der Zellmonolayer von den Messungen der Zelllysate abweichen.

Zur quantitativen Bestimmung der tatsächlich ins Innere der Zellen aufgenommenen Nanopartikel wurden Zellmonolayer mit unterschiedlichen BodiPy-markierten Nanopartikelarten inkubiert und zunächst die Fluoreszenz im Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 485/525 nm (Exzitations-/Emissionswellenlänge) bestimmt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Fluoreszenzintensität des Zelllysats nochmals im Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 485/525 nm (Exzitations-/Emissionswellenlänge) bestimmt. Über eine mit BodiPy erstellte Eichgerade (siehe Abbildung 13) wurde der BodiPy-Gehalt der Nanopartikel bestimmt. Außerdem wurde bei diesem Experiment die Hälfte der Nanopartikel mit bovinem Serumalbumin (BSA) behandelt. BSA soll eine nicht-spezifische Bindung der Nanopartikeln durch Blockade der unspezifischen Bindungsstellen verhindern, sodass nur eine spezifische Zellbindung und Aufnahme modifizierter Nanopartikeln in Zielzellen erfolgen könnte.

Es wurden Zellmonolayer in 96-Wellplatten der Zelllinie 5637, KB und THP-1 angelegt und im Brutschrank so lange kultiviert, bis sie konfluent waren. Das Medium auf den Platten wurde abgenommen, die Zellschichten mit 100 µl HEPES isoton pH 7,4 gewaschen, die Hälfte der Wells mit 100 µl HEPES isoton pH 7,4, die andere Hälfte mit HEPES isoton pH 7,4 + 1% BSA versetzt. Die fluoreszenzmarkierten Nanopartikel wurden in Medium suspendiert, auf dieselbe Konzentration eingestellt und die Fluoreszenz der Partikelsuspensionen bei 485/525 nm (Exzitations-/Emissionswellenlänge) im Mikrotiterplatten-Lesegerät bestimmt. Die Zellen wurden 15 Minuten mit HEPES-Puffer bzw. HEPES-Puffer mit 1% BSA bei 37°C inkubiert, anschließend der HEPES-Puffer +/- BSA abgenommen und jedes Well mit 100 µl Nanopartikelsuspension versetzt. Die Sofortbeladung der Zellschichten in den Multiwellplatten wurde bei 485/525 nm (Exzitations-/Emissionswellenlänge) gemessen. Nach weiterer zweistündiger Inkubation der Zellmonolayer bei 37°C wurde die Fluoreszenzintensität der Platten im Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 485/525 nm (Exzitations-/Emissionswellenlänge) bestimmt. Die Partikelsuspension wurde abgenommen, die Zellschichten mit HEPES isoton pH 7,4 gewaschen und 100 µl frischer HEPES isoton pH 7,4 eingebracht. Danach wurde erneut die zellgebundene Fluoreszenzintensität im Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 485/525 nm

(Exzitations-/Emissionswellenlänge) bestimmt. Der HEPES-Puffer wurde abgenommen und durch 100 µl Zelllysepuffer ersetzt und die Zellen 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde in jedem Well gründlich mit der Spitze einer Eppendorf-Pipette gekratzt, intensiv resuspendiert und die Inhalte der Wells mit der gleichen Partikelcharge in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Damit sich ebenfalls die Partikeln zur Quantifizierung des eingebauten BodiPys vollständig auflösen, wurde in jedes Gefäß 10% Dioxan hinzugegeben, gut gemischt und im Ultraschallbad inkubiert. Anschließend wurde bei 14000 UpM 10 Minuten zentrifugiert, vom Überstand dreimal 100 µl in eine 96-Wellplatte pipettiert und die Fluoreszenz bei 485/525 nm (Exzitations-/Emissionswellenlänge) bestimmt. Die erhaltenen Fluoreszenzwerte wurden in die BodiPy-Eichgerade (siehe Abbildung 13) eingesetzt und der Gehalt bestimmt.

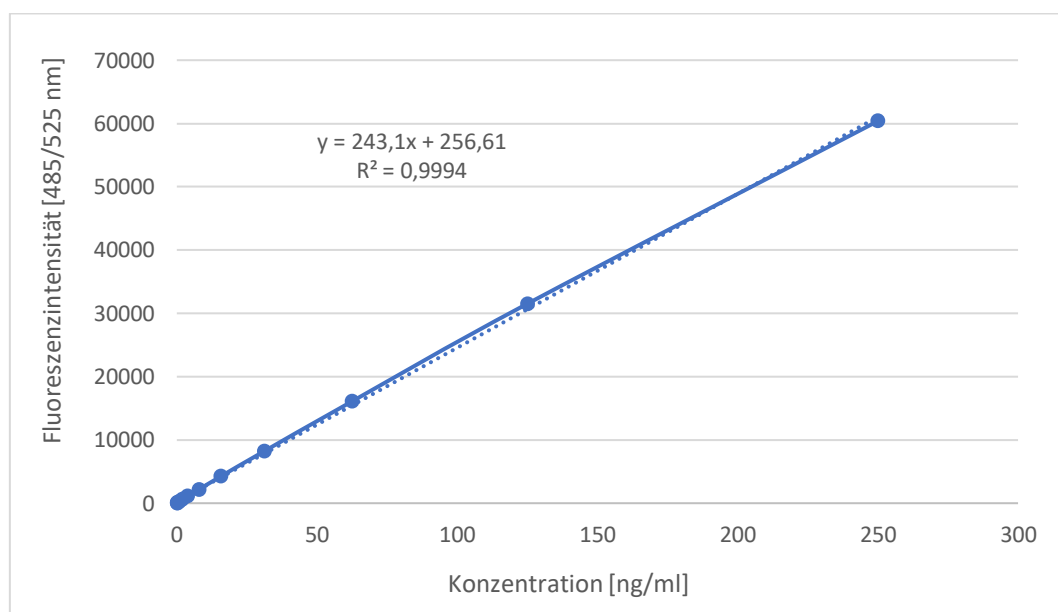


Abbildung 13: Eichgerade von BodiPy in Zelllysepuffer + 10% Dioxan.

3.7.4.1. Ergebnisse und Diskussion

Der BodiPy-Gehalt und die Einbaueffizienz der Nanopartikel sind in Tabelle 8 dargestellt. Auffallend dabei ist, dass die Einbaueffizienz bei beiden Partikelarten nicht besonders hoch ist. Dies könnte zum Teil an der Herstellung liegen, bei der die 50 µl BodiPy aus seinem Behältnis mit Aceton herausgewaschen werden und der PLGA-Lösung hinzugefügt wird und dabei wahrscheinlich die BodiPy-Menge nicht quantitativ herausgewaschen und überführt werden. Die höhere Einbaueffizienz bei den BrijS20-Folsäure-Nanopartikel ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass sie im Vergleich zu den anderen Nanopartikelarten um einiges größer sind (siehe Abbildung 5) und somit mehr BodiPy eingebaut wird.

Tabelle 8: BodiPygehalt in µg/mg PLGA und Einbaueffizienz in Prozent von nicht-modifizierten PLGA-Nanopartikeln („PLGA“) und BrijS20-Folsäure-Nanopartikeln („Folsäure“).

	PLGA	Folsäure
durchschnittlicher BodiPy-Gehalt	0,11 ± 0,00 µg/mg PLGA	0,18 ± 0,00 µg/mg PLGA
durchschnittliche Einbaueffizienz	21,83 ± 0,61 %	37,15 ± 0,58 %

Wie Abbildung 14 und Abbildung 15 zeigen, weichen die Messungen im Zellmonolayer nach Inkubation und die des Zelllysats nur gering voneinander ab, jedenfalls steigen die Messwerte nach der Zelllyse nicht, sodass keine nennenswerte Auslöschung der Fluoreszenz der Nanopartikel innerhalb der Zellen erfolgt. Trotzdem kann die Zelllyse und anschließende Messung der Fluoreszenz der Messung im Monolayer herangezogen werden, da durch das Poolen der Zellen Ungleichheiten equilibriert werden, Zellbruchstücke nicht stören und eventuelles Quenching vermindert werden kann.

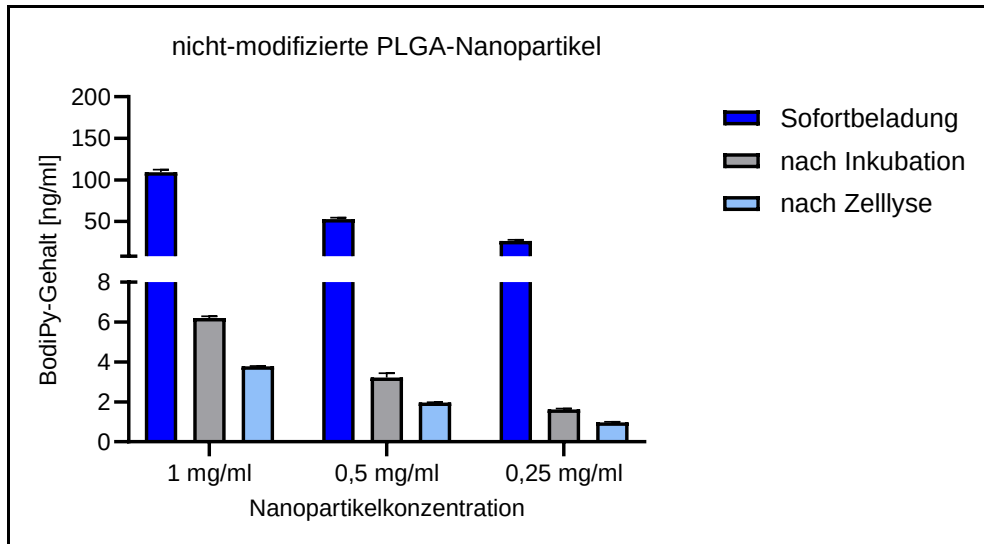


Abbildung 14: BodiPygehalt in ng/ml von nicht-modifizierten PLGA-Nanopartikeln von der Sofortbeladung, im Zellmonolayer nach der Inkubation und des Zelllysats.

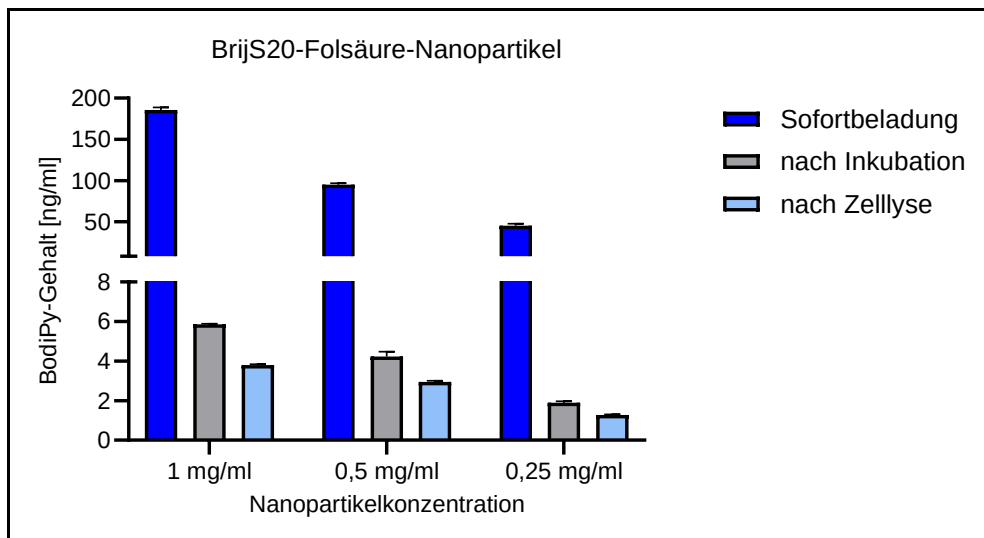


Abbildung 15: BodiPygehalt in ng/ml von BrijS20-Folsäure-Nanopartikeln von der Sofortbeladung, im Zellmonolayer nach der Inkubation und des Zelllysats.

Die Zellen, die mit Nanopartikeln und BSA behandelt wurden, zeigten sehr heterogene Ergebnisse und keinen durchgehenden Trend, der darauf schließen lässt, dass durch die Behandlung mit BSA keine veränderte Zellbindung bzw. Aufnahme der Nanopartikel zu erreichen ist.

4. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Peptide wie das Tripeptid RGD und die Teilpeptide des FimH von *E. Coli* und ihre Kontrollpeptide über die SPPS einfach mit einem Azid, der 6-Azidohexansäure, modifiziert werden können. Zudem wurde ein Linker aus dem nicht-ionischen Tensid BrijS20 und Propargylamin, ein aliphatisches primäres Amin mit einer Alkyngruppe, hergestellt. Durch die Modifikation der Peptide mit dem Azid war es möglich ein Protokoll auszuarbeiten um den BrijS20-Propargylamin-Linker mit den Peptid-Aziden über eine Click-Chemie-Reaktion zu verknüpfen. Dadurch konnten die Peptide über BrijS20 an die Oberfläche von PLGA-Nanopartikeln gebunden und Peptid-funktionalisierte PLGA-Nanopartikel hergestellt werden. Die erhöhte Zellbindungsrate der RGD-modifizierten PLGA-Nanopartikel konnte in vitro sowohl im Zellmonolayer als auch an Einzelzellen nachgewiesen werden. Ob die Modifikation von PLGA-Nanopartikeln mit den Teilpeptiden des FimH von *E. Coli* zu einer besseren Zellbindung führt und ob es Unterschiede zu ihren jeweiligen Kontrollpeptiden gibt, muss noch in zukünftigen Studien untersucht werden. Außerdem muss die Biokompatibilität der Peptid-modifizierten PLGA-Nanopartikel, die in dieser Arbeit hergestellt wurden, noch näher charakterisiert werden, um ihre Eignung als Targeting-Vehikel an der Harnblase zu erkennen.

Außerdem wurden die für PLGA-Nanopartikel spezifischen Endozytosewege, mit denen sie in Zellen aufgenommen werden, untersucht. Auch wenn die Ergebnisse der unterschiedlichen Zelllinien nicht einheitlich waren, hat im Einklang mit der Literatur der Clathrin-vermittelte Weg überwogen.

Durch Zelllyse und anschließendes Bestimmen der Fluoreszenzintensität der aufgenommenen Nanopartikel im Zelllysate ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den in Zellmonolayern gemessenen Werten. Daher eignet sich diese Methode, um Ungleichheiten der Zellen zu equilibrieren und störende Zellbruchstücke zu entfernen.

5. Abkürzungsverzeichnis

Äq.	Äquivalente
Aqua dest.	Aqua destillata
BCA	Bicinchoninsäure
Boc	Di-tert-butylidicarbonat
BodiPy	Bordipyrromethen
BSA	bovines Serumprotein
CaCo	Cancer coli, Darmkrebs
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
CuAAC	Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition
CuSO ₄	Kupfersulfat
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
E. Coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraseeigsäure
FCS	„fetal calf serum“, fetales Kälberserum
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FS	Folsäure
HBTU	2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphate
HCl	Chlorwasserstoff, Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
MTBE	Methyltertbutylether
MWCO	Molecular-Weight-Cut-Off
NaOH	Natriumhydroxid
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PDI	Polydispersitätsindex
PEG	Polyethylenglycol
PLGA	Polylactid-co-Glycolid
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PVA	Polyvinylalkohol
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TBTA	Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
tBu	tert-Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
TIPS	Triisopropylsilan
Trt	Triphenylmethyl (Trityl)
UpM	Umdrehungen per Minute

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Peptidsynthese mittels Festphasensynthese. (30)	16
Abbildung 2: Aktivierung der terminalen PEG-Hydroxylgruppe durch CDI und Ausbildung eines Imidazol-Carbamat-Zwischenprodukts unter Abspaltung eines Imidazols. Durch nukleophilen Angriff eines primären Amins an die Carbonylgruppe des Carbamats entsteht unter Abspaltung eines weiteren Imidazols ein stabiler Carbamat-Linker. (32)	20
Abbildung 3: Huisgen-Cycloaddition: 1,3-dipolare [3+2]-Cycloadditionsreaktion eines Azids mit einem terminalen Alkin unter Ausbildung eines 1,2,3-Triazols. (32)	22
Abbildung 4: Gesamter Synthesevorgang des BrijS20-Peptids: Aktivierung von BrijS20 durch CDI, Kopplung von BrijS20-CDI an Propargylamin und zuletzt die CuAAC des BrijS20-Propargylaminlinkers an das Peptid-Azid unter Ausbildung eines Triazolprodukts.	23
Abbildung 5: Mittlerer hydrodynamischer Durchmesser der unterschiedlichen PLGA-Nanopartikel in nm auf der linken vertikalen Achse und die dazugehörigen PDI-Werte auf der rechten sekundären vertikalen Achse.	29
Abbildung 6: Differenzierung von THP-1-Zellen durch PMA: Aufnahmen von undifferenzierten Monozyten (links) und differenzierten Makrophagen (rechts) durch ein Lichtmikroskop.	32
Abbildung 7: Zellbindung von BrijS20-RGD-Nanopartikeln („BrijS20-RGD“) im Vergleich zu nicht-modifizierten PLGA-Nanopartikeln („PLGA“) (100%-Wert) an 5637-Einzelzellen ermittelt über Durchflussszytometrie.	34
Abbildung 8: Zellbindung von BrijS20-RGD-Nanopartikeln („BrijS20-RGD“) im Vergleich zu nicht-modifizierten PLGA-Nanopartikeln („PLGA“) (100%-Wert) an KB-Zellen im Monolayer ermittelt über Mikrotiterplatten-Lesegerät.	35
Abbildung 9: Internalisierung der verschiedenen Nanopartikel in Prozent auf der linken vertikalen Achse in 5637-Zellen nach Inkubation bei 37°C, 4°C, mit Nystatin, Amilorid und Chlorpromazin. Die linke Balkengruppe stellt den 100%-Wert als Bezug für die Aufnahme der Nanopartikel bei 37°C ohne Hemmung durch Inhibitoren dar.	36
Abbildung 10: Internalisierung der verschiedenen Nanopartikel in Prozent auf der linken vertikalen Achse in KB-Zellen nach Inkubation bei 37°C, 4°C, mit Nystatin, Amilorid und Chlorpromazin. Die linke Balkengruppe stellt den 100%-Wert als Bezug für die Aufnahme der Nanopartikel bei 37°C ohne Hemmung durch Inhibitoren dar.	37
Abbildung 11: Internalisierung der verschiedenen Nanopartikel in Prozent auf der linken vertikalen Achse in THP-1-Zellen nach Inkubation bei 37°C, 4°C, mit Nystatin, Amilorid und Chlorpromazin. Die linke Balkengruppe stellt den 100%-Wert als Bezug für die Aufnahme der Nanopartikel bei 37°C ohne Hemmung durch Inhibitoren dar.	37

Abbildung 12: Internalisierung der verschiedenen Nanopartikel in Prozent auf der linken vertikalen Achse in CaCo-2-Zellen nach Inkubation bei 37°C, 4°C, mit Nystatin, Amilorid und Chlorpromazin. Die linke Balkengruppe stellt den 100%-Wert als Bezug für die Aufnahme der Nanopartikel bei 37°C ohne Hemmung durch Inhibitoren dar.	38
Abbildung 13: Eichgerade von BodiPy in Zelllysepuffer + 10% Dioxan.	40
Abbildung 14: BodiPygehalt in ng/ml von nicht-modifizierten PLGA-Nanopartikeln von der Sofortbeladung, im Zellmonolayer nach der Inkubation und des Zelllysats.	41
Abbildung 15: BodiPygehalt in ng/ml von BrijS20-Folsäure-Nanopartikeln von der Sofortbeladung, im Zellmonolayer nach der Inkubation und des Zelllysats.	41

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einwaagen für die Aminosäurekopplungen.	17
Tabelle 2: Einwaagen für die Kopplung der 6-Azidohexansäure.	17
Tabelle 3: Aminosäuresequenzen der verwendeten Teilpeptide des FimH von E. coli und ihre jeweiligen Kontrollpeptide.	18
Tabelle 4: Einwaagen für den Boc-Schutz der freien Aminogruppe.	18
Tabelle 5: Einwaagen für die Kopplung der 6-Azidohexansäure.	19
Tabelle 6: Mittleres Zetapotential der verschiedenen Nanopartikelarten in mV.	29
Tabelle 7: Mittlerer Peptidgehalt und mittlere Einbaueffizienz der BrijS20-FimH-Peptid ₁₋₁₀ -Nanopartikel ermittelt über Amino-Assay.	31
Tabelle 8: BodiPygehalt in µg/mg PLGA und Einbaueffizienz in Prozent von nicht-modifizierten PLGA-Nanopartikeln („PLGA“) und BrijS20-Folsäure-Nanopartikeln („Folsäure“).	40

8. Literaturverzeichnis

1. Attia MF, Anton N, Wallyn J, Omran Z, Vandamme TF. An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites. *J Pharm Pharmacol* 2019; 71(8):1185–98. doi: 10.1111/jphp.13098.
2. Muhamad N, Plengsuriyakarn T, Na-Bangchang K. Application of active targeting nanoparticle delivery system for chemotherapeutic drugs and traditional/herbal medicines in cancer therapy: a systematic review. *Int J Nanomedicine* 2018; 13:3921–35. doi: 10.2147/IJN.S165210.
3. Golombek SK, May J-N, Theek B, Appold L, Drude N, Kiessling F et al. Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses. *Adv Drug Deliv Rev* 2018; 130:17–38. doi: 10.1016/j.addr.2018.07.007.
4. Bhatia S. Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications. In: Bhatia S, Hrsg. *Natural Polymer Drug Delivery Systems*. Cham: Springer International Publishing; 2016. S. 33–93.
5. Löscher M, Hurst J, Strudel L, Spitzer MS, Schnichels S. Nanopartikel als Drug-Delivery-Systeme für die Ophthalmologie. *Ophthalmologe* 2018; 115(3):184–9. doi: 10.1007/s00347-017-0596-6.
6. Tewabe A, Abate A, Tamrie M, Seyfu A, Abdela Siraj E. Targeted Drug Delivery - From Magic Bullet to Nanomedicine: Principles, Challenges, and Future Perspectives. *J Multidiscip Healthc* 2021; 14:1711–24. doi: 10.2147/JMDH.S313968.
7. Jaracz S, Chen J, Kuznetsova LV, Ojima I. Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates. *Bioorg Med Chem* 2005; 13(17):5043–54. doi: 10.1016/j.bmc.2005.04.084.
8. Fernández M, Javaid F, Chudasama V. Advances in targeting the folate receptor in the treatment/imaging of cancers. *Chem Sci* 2018; 9(4):790–810. doi: 10.1039/c7sc04004k.
9. Nicolas J, Mura S, Brambilla D, Mackiewicz N, Couvreur P. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. *Chem Soc Rev* 2013; 42(3):1147–235. doi: 10.1039/c2cs35265f.
10. Szczyglewska P, Feliczak-Guzik A, Nowak I. Nanotechnology-General Aspects: A Chemical Reduction Approach to the Synthesis of Nanoparticles. *Molecules* 2023; 28(13). doi: 10.3390/molecules28134932.
11. El-Hammadi MM, Arias JL. Recent Advances in the Surface Functionalization of PLGA-Based Nanomedicines. *Nanomaterials (Basel)* 2022; 12(3). doi: 10.3390/nano12030354.
12. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)* 2011; 3(3):1377–97. doi: 10.3390/polym3031377.

13. Javid H, Oryani MA, Rezagholinejad N, Esparham A, Tajaldini M, Karimi-Shahri M. RGD peptide in cancer targeting: Benefits, challenges, solutions, and possible integrin-RGD interactions. *Cancer Med* 2024; 13(2). doi: 10.1002/cam4.6800.
14. Yin L, Li X, Wang R, Zeng Y, Zeng Z, Xie T. Recent Research Progress of RGD Peptide–Modified Nanodrug Delivery Systems in Tumor Therapy. *Int J Pept Res Ther* 2023; 29(4). doi: 10.1007/s10989-023-10523-4.
15. Manzanares D, Ceña V. Endocytosis: The Nanoparticle and Submicron Nanocompounds Gateway into the Cell. *Pharmaceutics* 2020; 12(4). doi: 10.3390/pharmaceutics12040371.
16. Sousa de Almeida M, Susnik E, Drasler B, Taladriz-Blanco P, Petri-Fink A, Rothen-Rutishauser B. Understanding nanoparticle endocytosis to improve targeting strategies in nanomedicine. *Chem Soc Rev* 2021; 50(9):5397–434. doi: 10.1039/d0cs01127d.
17. Kou L, Sun J, Zhai Y, He Z. The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013; 8(1):1–10. doi: 10.1016/j.ajps.2013.07.001.
18. Vermeulen SH, Hanum N, Grotenhuis AJ, Castaño-Vinyals G, van der Heijden AG, Aben KK et al. Recurrent urinary tract infection and risk of bladder cancer in the Nijmegen bladder cancer study. *Br J Cancer* 2015; 112(3):594–600. doi: 10.1038/bjc.2014.601.
19. European Association of Urology. EAU Guidelines on Urological Infections; 2024 [Stand: 05.04.2024]. Verfügbar unter: <https://uroweb.org/guidelines/urological-infections/chapter/the-guideline>.
20. Klein RD, Hultgren SJ. Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host-pathogen interactions and new treatment strategies. *Nat Rev Microbiol* 2020; 18(4):211–26. doi: 10.1038/s41579-020-0324-0.
21. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71(3):209–49. doi: 10.3322/caac.21660.
22. GuhaSarkar S, Banerjee R. Intravesical drug delivery: Challenges, current status, opportunities and novel strategies. *J Control Release* 2010; 148(2):147–59. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.08.031.
23. Dalghi MG, Montalbetti N, Carattino MD, Apodaca G. The Urothelium: Life in a Liquid Environment. *Physiol Rev* 2020; 100(4):1621–705. doi: 10.1152/physrev.00041.2019.

24. Neutsch L, Wambacher M, Wirth E-M, Spijker S, Kählig H, Wirth M et al. UPEC biomimickry at the urothelial barrier: lectin-functionalized PLGA microparticles for improved intravesical chemotherapy. *Int J Pharm* 2013; 450(1-2):163–76. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.04.058.
25. Hartmann M, Lindhorst TK. The Bacterial Lectin FimH, a Target for Drug Discovery – Carbohydrate Inhibitors of Type 1 Fimbriae-Mediated Bacterial Adhesion. *Eur J Org Chem* 2011; 2011(20-21):3583–609. doi: 10.1002/ejoc.201100407.
26. Pichl CM, Dunkl B, Brauner B, Gabor F, Wirth M, Neutsch L. Biomimickry of UPEC Cytoinvasion: A Novel Concept for Improved Drug Delivery in UTI. *Pathogens* 2016; 5(1). doi: 10.3390/pathogens5010016.
27. Hung C-S, Bouckaert J, Hung D, Pinkner J, Widberg C, DeFusco A et al. Structural basis of tropism of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection. *Mol Microbiol* 2002; 44(4):903–15. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02915.x.
28. Choudhury D, Thompson A, Stojanoff V, Langermann S, Pinkner J, Hultgren SJ et al. X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 1999; 285(5430):1061–6. doi: 10.1126/science.285.5430.1061.
29. Stawikowski S, Fields GB. Introduction to peptide synthesis. *Curr Protoc Protein Sci* 2002; Chapter 18. doi: 10.1002/0471140864.ps1801s26.
30. Chan WC, White PD. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. New York: Oxford University Press; 2000. (The Practical Approach Series).
31. Rapp Polymere. Rink amide linkers on TentaGel® resins [Stand: 11.03.2024]. Verfügbar unter: <https://www.rapp-polymere.com/products/resins/resins-for-peptide-synthesis/resins-with-linkers-for-peptide-synthesis>.
32. Hermanson GT. *Bioconjugate Techniques*: Academic Press; 2013.
33. Anzengruber M, Nepustil LM, Kurtaj F, Tahir A, Skoll K, Sami H et al. A Versatile Brij-Linker for One-Step Preparation of Targeted Nanoparticles. *Pharmaceutics* 2023; 15(5). doi: 10.3390/pharmaceutics15051403.
34. Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001; 40(11):2004–21. doi: 10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5.
35. Li H, Aneja R, Chaiken I. Click chemistry in peptide-based drug design. *Molecules* 2013; 18(8):9797–817. doi: 10.3390/molecules18089797.

36. Chen Y, Tong Z-R. Click chemistry: Approaches, applications and challenges. New York: Nova Science Publishers; 2017.
37. Guarrochena X, Kaudela B, Mindt TL. Automated solid-phase synthesis of metabolically stabilized triazolo-peptidomimetics. *J Pept Sci* 2023; 29(9):e3488. doi: 10.1002/psc.3488.
38. Le Hoa TM, Chi NT, Le Nguyen H, Chien DM. Preparation and characterisation of nanoparticles containing ketoprofen and acrylic polymers prepared by emulsion solvent evaporation method. *Journal of Experimental Nanoscience* 2012; 7(2):189–97. doi: 10.1080/17458080.2010.515247.
39. Thermo Fisher Scientific. Micro BCA Protein Assay Kit: Instructions; 2015 [Stand: 14.03.2024]. Verfügbar unter: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011237_Micro_BCA_Protein_Asy_UG.pdf.