



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Entwicklung und Charakterisierung eines Photosensitizer-
Polyethylenimin Konjugates“

verfasst von

Michaela Johanna Gruber

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreut von: Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor

Mein herzlicher Dank gilt vor allem

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor für die Bereitstellung dieses interessanten
Diplomarbeitsthemas, für seine Hilfsbereitschaft, den fachlichen Rat und sein
Engagement für die Arbeitsgruppe.

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth, für seine Hilfsbereitschaft, die fachliche
Unterstützung und für das gute Arbeitsklima in der Arbeitsgruppe.

An Mag. Elisabeth Engleder für die gute Betreuung und motivierenden Worte.

Der Arbeitsgruppe die durch die allgemeine Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit diese
arbeitsreiche Zeit angenehm gestalteten.

Meiner Familie die mich während meiner Studienzeit unterstützte, motivierte und immer
ein offenes Ohr hatte.

Thomas der mich immer wieder ermutigte und mich durch die Höhen und Tiefen der
Studienzeit begleitete.

Schließlich danke ich allen meinen Freunden und Kollegen, die diese Studienzeit in
guter Erinnerung bleiben lassen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	5
Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	7
1 Einleitung.....	8
2 Grundlagen.....	10
2.1 Porphyrine.....	10
2.2 Polyethylenimin.....	11
3 Methoden.....	12
3.1 UV/VIS Spektroskopie.....	12
3.2 Fourier Transform Infrarotspektroskopie.....	12
3.3 Fluoreszenzspektroskopie.....	13
3.4 Dünnschichtchromatografie.....	13
3.5 Proteinbestimmung nach Bradford.....	13
3.6 Singulett Oxygen Sensor Green (SOSG) Test.....	14
3.7 Zellkulturtechniken.....	14
3.7.1 Subkultivierung von Caco-2 - Zellen.....	14
3.7.2 Färbemethoden.....	14
4 Materialien.....	16
5 Ergebnisse.....	17
5.1 Entwicklung einer Methode zur Kopplung von TPP und PEI.....	17
5.2 Reinigung des Konjugates.....	19
5.2.1 Bradford Test von PEI.....	20
5.2.2 Vergleich der Reinigungsmethoden.....	21
5.2.3 Aufarbeitung der Chloroformphase.....	22
5.3 Analytik des Konjugates.....	26
5.3.1 Eichgerade von TPP.....	26
5.3.2 Eichgerade PEI.....	27
5.3.3 Berechnung der Belegungsrate.....	29
5.3.4 Ionischer Komplex.....	31
5.3.5 Stabilitäts- und Lösungsversuche des Konjugates.....	31
5.3.6 IR-Spektren.....	38
5.3.7 Biologische Aktivität von Konjugat A und PEK.....	40
5.3.8 Versuche mit Caco-2 Monolayern.....	47
6 Zusammenfassung.....	52
7 Summary.....	54
Literaturverzeichnis.....	55
Abkürzungsverzeichnis.....	56
Curriculum Vitae.....	57

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Grundgerüst der Porphyrine. [12].....	10
Abb. 2: Strukturformel von 5-(4-Carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-21,23H-porphyrin (TPP). [5] ..	10
Abb. 3: Strukturformel von verzweigtem Polyethylenimin. [12]	11
Abb. 4: Dünnschichtchromatogramm der unterschiedlichen Reaktionsansätze nach Aktivierung von TPP mit DCC/Methylmorpholin.	19
Abb. 5: Eichgerade von PEI in Aqua dest. nach Umsetzung mit Coomassie Brilliant Blue G-250 Reagens.	20
Abb. 6: Dünnschichtchromatogramm der Konjugation von TPP an PEI nach Besprühen mit Ninhydrin Reagens.	23
Abb. 7: UV/VIS Eichgerade von TPP in DMF/0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 (50/50, V/V).	27
Abb. 8: Fluorimetrische Eichgerade von TPP in DMF/0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 (50/50; V/V).	27
Abb. 9: UV/VIS Eichgerade von PEI in 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4.	28
Abb. 10: Stabilität von Konjugat A, Konjugat B, PEK und PEK B in Gegenwart von 7 M Harnstoff.	35
Abb. 11: Stabilität von Konjugat A und PEK in Gegenwart von 7 M Harnstoff (2. Versuch).	36
Abb. 12: Stabilität von Konjugat und Polyelektrolytkomplex in Gegenwart von 7 M Harnstoff bei niedrigen Konzentrationen (3. Versuch).	37
Abb. 13: FTIR-Spektrum von TPP in DMF/0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 (1+1; V/V).	38
Abb. 14: FTIR-Spektrum von PEI in DMF/0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 (1+1; V/V).	39
Abb. 15: FTIR - Spektrum von Konjugat nach Methode A in DMF/0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 (1+1; V/V).	40
Abb. 16: SOSG-Test von Konjugat A, PEK und den Einzelkomponenten mit Aktivierung durch Weißlicht.	42
Abb. 17: SOSG-Test von Konjugat A, PEK und den Einzelkomponenten ohne Bestrahlung mit Weißlicht.	44
Abb. 18: Kontrollversuch des SOSG - Test, ohne Zugabe von SOSG – Reagens.	46
Abb. 19: Fluoreszenzmikroskopie von Caco-2 Monolayern nach 30 Min. Inkubation bei 4°C mit 6 mM Konjugat (A) und 6 µM TPP (B).	48
Abb. 20: Caco-2 Monolayer nach 30 Min. Inkubation bei 4 °C mit 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 (A) oder PEI (B) bei 40-facher Vergrößerung.	48
Abb. 21: Mikroskopische Bilder von Caco-2 Monolayern nach 30 Min. Beladung mit 6 µM Konjugat (A1-A3) oder TPP (B1-B3), Bestrahlung mit Weißlicht und 60 Min. Nachinkubation bei 37°C (Zellkerne nicht viabler Zellen blau, TPP rot).	49
Abb. 22: Caco-2 Monolayer nach Beladung mit 3 µM (1) bzw. 6 µM (2) TPP (B) oder Konjugat A (A) und 30 Min. Inkubation bei 37°C (TPP – rot).	50
Abb. 23: Caco-2 Monolayer nach 30 Min. Inkubation bei 37°C mit Mikroskopischer Vergleich von 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 (A) und PEI im gleichen Puffer.	51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einfluss von TPP auf die Absorption von PEI.....	29
Tabelle 2: Einfluss von PEI auf die Absorption von TPP mit und ohne DCC-Aktivierung.....	29
Tabelle 3: Substitutionsgrad von PEI mit TPP bei unterschiedlichen molaren Ansatzverhältnissen.	30
Tabelle 4: Stabilität des Konjugates A, des Konjugates B und des PEK in 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4.	33
Tabelle 5: Stabilität des Konjugates A, des Konjugates B und des PEK in PBS.	33
Tabelle 6: Stabilität von Konjugat A, Konjugat B, PEK und PEK B in Gegenwart von 7 M Harnstoff.	36
Tabelle 7: Stabilität von Konjugat A und PEK in Gegenwart von 7 M Harnstoff bei niedrigen Konzentrationen.	38

1 Einleitung

Die Photodynamische Therapie (PDT) durch Einsatz von Laser- oder Bestrahlungstherapie wird hauptsächlich zur Behandlung von oberflächlichen Tumoren im Haut-, Kopf- und Nackenbereich sowie bei nicht melanozytären Tumoren wie Basaliomen, Spinaliomen und aktinischen Keratosen eingesetzt. Zusätzlich kann die Bestrahlungstherapie durch eine Photosensitizer (PS)-gestützte Behandlung ergänzt werden, die bereits in der Antike durch die Anwendung von photosensitiven Pflanzeninhaltsstoffen bei der Behandlung von oberflächlichen Hauterkrankungen eingesetzt wurde.

In der heute etablierten PDT wird vor allem der Pflanzeninhaltsstoff Psoralen als sogenannte PUVA-Therapie (Psoralen Ultraviolett A) verwendet. Eine Erweiterung der PS-gestützten PDT bieten photosensitive Substanzen, die chemisch keinen Effekt erzielen können, jedoch durch das Zusammenspiel mit Licht und Sauerstoff auf die Tumorzelle zytotoxisch wirken können. Porphyrine, eine sehr lipophile Substanzgruppe, die in vielen Pflanzen sowie im menschlichen Organismus vorkommt, haben die Eigenschaft durch Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge eine reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu generieren [4]. Die durch Licht in das Molekül eingebrachte Energie führt dieses in einen energetisch höheren Zustand, den Singulettzustand (S_1), über. Bei der Rückkehr in den Grundzustand kann die durch die Anregung gewonnene Energie auf Sauerstoff übertragen werden, wodurch Sauerstoffradikale entstehen, die in weiterer Folge den programmierten Zelltod auslösen. Der Nachteil dieser Kombinationstherapie liegt allerdings darin, dass einerseits die generierte ROS eine relative kurze Lebensdauer besitzt, und andererseits die Penetrationstiefe von Licht und damit der ROS in das Gewebe begrenzt ist. Zusätzlich können lipophile Porphyrine nur bedingt verabreicht werden, da sie in physiologisch verträglichen Flüssigkeiten schwer löslich sind.

Um ein optimales Therapieergebnis zu erhalten ist es daher notwendig, den PS so zu modifizieren, dass er einerseits in physiologischen Flüssigkeiten löslich ist, um direkt im Zielgewebe verabreicht werden zu können und dass er andererseits nach Bestrahlung ausreichend ROS generieren kann. Früher durchgeführte Studien [4] mit dem Ziel, Porphyrine an pflanzliche Lektine zu koppeln, waren nur teilweise erfolgreich. Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit ein wasserlösliches Photosensitizer - Konjugat durch Kopplung an Polyethylenimin (PEI) dargestellt werden. Das Porphyrin 5-(4-Carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-21,23H-porphyrin (TPP) sollte nach Aktivierung seiner

Carboxylgruppe durch Carbodiimid an Aminogruppen von PEI gekoppelt und durch Ausbildung einer kovalenten Amidbindung die Wasserlöslichkeit und Stabilität in physiologischen Flüssigkeiten erhöht werden.

Um die Effizienz der Therapie zu steigern und einen möglichst hohen Substitutionsgrad von PEI mit TPP zu erzielen, sollen die molaren Verhältnisse der beiden Reaktionspartner variiert werden. Zusätzlich soll jenes Kopplungsverhältnis ermittelt werden, bei welchem das Konjugat noch wasserlöslich ist, um eine Anwendung in physiologischen Flüssigkeiten zu ermöglichen. Um eine Konjugatbildung durch ionische Wechselwirkungen ausschließen zu können, sollten auch die Eigenschaften eines ionischen TPP-PEI Komplexes untersucht werden. Insbesondere die Stabilität beider Produkte, des kovalenten TPP - PEI Konjugates und des ionischen TPP-PEI Komplexes, in artifiziellen physiologischen Flüssigkeiten sollte näher charakterisiert werden. Zur Beurteilung der zytotoxischen Aktivität und damit der potentiellen Anwendbarkeit sollte die Interaktion ausgewählter Konjugate mit Caco-2 Monolayern im Vergleich zu TPP analysiert werden.

2 Grundlagen

2.1 Porphyrine

Porphyrine kommen in der Natur ubiquitär vor und spielen im Stoffwechsel eine wichtige Rolle. Sie bestehen aus vier Pyrrolringen, die durch vier Methingruppen zyklisch verbunden sind.

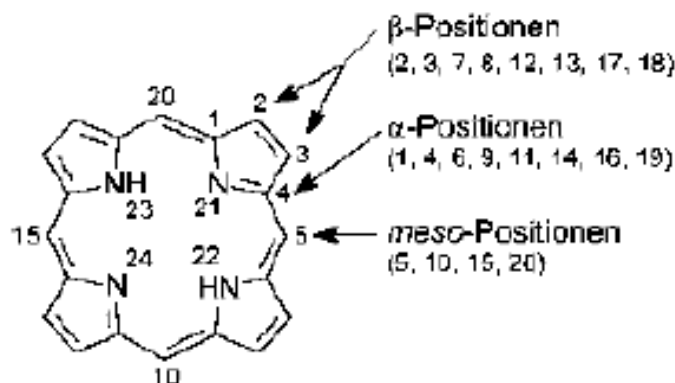


Abb. 1: Grundgerüst der Porphyrine. [12]

Der wohl bekannteste Vertreter der Porphyrine ist das im Blut vorkommende Hämoglobin, das einen Komplex aus Protoporphyrin IX mit einem zentralen Eisenion darstellt. Auch Chlorophyll und Vitamin B12 sind prominente Verbindungen mit Porphyringrundstruktur.

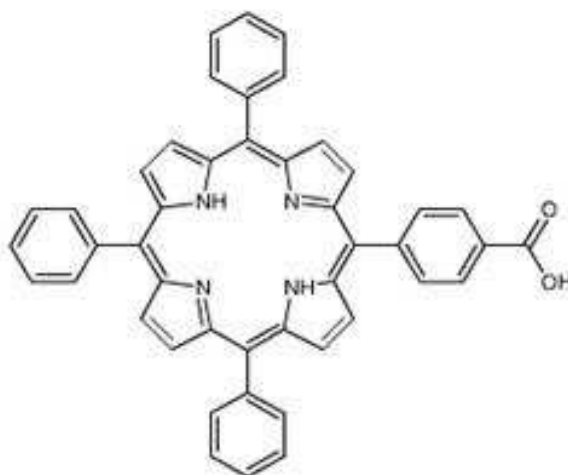
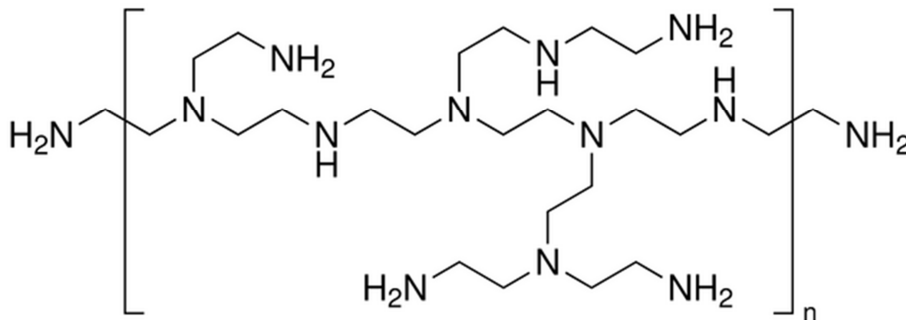


Abb. 2: Strukturformel von 5-(4-Carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-21,23H-porphyrin (TPP). [5]

Das in dieser Arbeit eingesetzte Porphyrin ist der lipophile, makrozyklische Photosensitizer TPP (MG=658,75 g/Mol), welcher durch Bestrahlung mit Licht Singulett-Sauerstoff generieren kann. TPP ist zu 1 mg/ml in DMF, DMSO und CHCl₃ löslich, jedoch in dieser Konzentration nicht in Ethylacetat, Aqua dest. oder 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4.

Polyethylenimin ist ein hydrophiles Polymer aus Ethylenimin–Bausteinen, das in linearer und verzweigter Form erhältlich ist. In wässriger Lösung entsteht durch die Protonierung der Aminogruppen ein Polyelektrolyt, der stark basisch reagiert.



Für die Kopplung wird ein verzweigtes Polyethylenimin (PEI) mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 10.000 g/mol verwendet. Die hochviskose Substanz ist sowohl mit Wasser als auch mit 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 oder Chloroform in einer Konzentration von 1 mg/ml verdünnbar.

3 Methoden

3.1 UV/VIS Spektroskopie

Diese Methode findet ihre Anwendung in der qualitativen sowie quantitativen Analyse und wird auch zur Strukturermittlung, Spurenanalyse oder Reinheitsbestimmung eingesetzt. Im klinischen oder medizinischen Bereich wird die UV/VIS-Spektroskopie als Hilfsmittel bei kinetischen Untersuchungen verwendet.

Die Technik beruht auf der Bestimmung der Licht-Absorption nach Anregung der Probelösung mit Lichtenergie. Die Analyse erfolgt in einem Zweistrahlgerät von Hitachi (U-1100 Spektrometer) in zwei Wellenlängenbereichen, die zum einen den Ultra Violett-Bereich (UV) von 180 bis 400 nm und zum anderen den Visible-Bereich (VIS) von 400 bis 750 nm umfassen. Als Messzellen werden Quarzküvetten verwendet. Die Kalibriergeraden werden an der Grenze von VIS- und UV-Bereich bei einer Wellenlänge von 222 nm für PEI und 420 nm für TPP in DMF/0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 (50/50) als Lösungsmittel erstellt. [7,13]

3.2 Fourier Transform Infrarotspektroskopie

Man unterscheidet bei dieser Methode zwischen zwei Vorgehensweisen, einerseits der Infrarot (IR) Spektroskopie und andererseits der leistungstärkeren Fourier Transform Infrarotspektroskopie (FTIR). Das Grundprinzip besteht darin, dass die IR-Lichtquelle Strahlung emittiert, welche frequenzabhängig beim Durchgang durch die Probe abgeschwächt wird. Diese Strahlung wird von einem Detektor registriert, der die Änderung anschließend elektronisch in ein Spektrum umwandelt. Bei der FTIR-Spektroskopie wird ein Differenzinterferogramm erstellt. Dazu werden nacheinander die Interferogramme der Vergleichs- und Substanzprobe erstellt und voneinander subtrahiert. Durch die Fourier-Transformation, einer mathematischen Operation, wird das Differenzinterferogramm in die Frequenzdomäne umgewandelt. Dadurch entsteht das gewohnte Bandenspektrum. Wesentliche Unterschiede zur IR-Spektroskopie sind das bessere Signal-Rausch-Verhältnis, die hohe Wellenzahl-Präzision und die gleichzeitige Registrierung aller durch das Licht erzeugten Wellenlängen im Detektor. Ein Vorteil der FTIR liegt auch darin, dass Proben im festen, flüssigen oder gasförmigen Zustand analysiert werden können. Zur Charakterisierung der Konjugate wird die Messung im gelösten Zustand durchgeführt, wofür eine Natriumchlorid-Zelle verwendet wird. Diese Methode eignet sich für die

quantitative und qualitative Analyse und auch als ein Nachweis für die kovalente Bindungen in Konjugaten. [13]

3.3 Fluoreszenzspektroskopie

Zur Bestimmung der Fluoreszenzspektren und–intensitäten wird ein Fluoreszenzreader (Infinite™ 200, TECAN® Group Ltd., Grödig, Österreich) verwendet, dessen Prinzip auf der Erfassung der emittierten Lichtquanten nach Exzitation beruht. Die eingestrahlte Lichtenergie wird bei der Exzitation absorbiert und Elektronen in ein höheres Energieniveau angehoben. Bei der Rückkehr der Elektronen in den Grundzustand wird ein Teil der aufgenommenen Energie in Form von Fluoreszenzstrahlung emittiert. TPP emittiert Fluoreszenzstrahlung mit einem Maximum bei 650 nm nach Exzitation bei 420 nm. [14]

3.4 Dünnschichtchromatografie

Die Dünnschichtchromatografie (DC) ist ein physikalisch-chemisches Trennverfahren, das auf der Wechselwirkung von funktionellen Gruppen mit der stationären Phase beruht. Als stationäre Phase wird Kieselgel mit einem Fluoreszenzindikator von 254 nm, als mobile Phase werden Lösungsmittel mit unterschiedlichen Polaritäten verwendet. Die Auswertung erfolgt durch Bestimmung des R_f-Wertes, der den Quotienten aus Laufstrecke der Substanz und Laufstrecke des Lösungsmittels darstellt. Bei Vorhandensein von Chromophoren wird die Substanz bei Bestrahlung mit Licht von 254 nm durch Fluoreszenzlöschung auf der KGF₂₅₄-Platte sichtbar. Andererseits wird bei 365 nm die Fluoreszenz der untersuchten Proben erkennbar. Um die Banden sichtbar zu machen, kann die DC-Platte auch mit Reagentien besprüht werden, die mit funktionellen Gruppen reagieren. Bei den Versuchen wurde Ninhydrinreagens verwendet, das mit Aminogruppen reagiert und mit einem Kupferkomplex fixiert wird.

3.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford soll eine quantitative Aussage über die Menge an PEI ermöglichen. Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue G–250 bildet mit kationischen und apolaren Seitenketten von Proteinen in saurer Lösung einen blau gefärbten Komplex. Da die Extinktion bei 595 nm nicht stabil ist, muss der Zeitabstand zwischen Reagenszugabe und Messung konstant gehalten werden. Zur Herstellung des Reagens werden 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 in 50 ml 96%-igem Ethanol

gelöst, mit 100 ml 85%-iger Phosphorsäure versetzt und mit Aqua dest. auf 1000,0 ml verdünnt. 50 µl Probe werden mit 350 µl Reagens versetzt und nach 20 Minuten die Absorption bei 595 nm bestimmt. [15]

3.6 Singulett Oxygen Sensor Green (SOSG) Test

Reaktiver Sauerstoff wird mittels SOSG Reagens nachgewiesen. Das Reagens fluoresziert schwach blau, fluoresziert jedoch nur bei Reaktion mit reaktivem Sauerstoff bei 504/525 nm (Extinktion/Emission) grün. Hydroxyl-Radikale oder Superoxide reagieren nicht mit dem Reagens. [9]

3.7 Zellkulturtechniken

3.7.1 Subkultivierung von Caco-2 - Zellen

Caco-2 Zellen wurden 1974 aus dem primären Coloncarzinom eines Mannes kaukasischer Rasse isoliert und sind als immortalisierte Zelllinie ein etabliertes in-vitro Modell für das humane Dünndarmepithel. Die adhären, zunächst in Kolonien wachsenden Zellen werden in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640-Medium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), Gentamycin (2 ml; 1g/9,09ml Aqua. dest.) und L-Glutamin (200 mM in Aqua. dest.; 400 µl) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zur Subkultivierung werden die Zellen nach Erreichen der Konfluenz gespalten und erneut ausgesät. Das Erreichen der Konfluenz ist für alle Studien von Bedeutung, da erst nach der Bildung des Monolayers die Zellen zu Epithelzellen differenzieren, die funktional sowie morphologisch humanen Enterozyten ähnlich sind. [8]

3.7.2 Färbemethoden

3.7.2.1 DNA-Detektion mit Hoechst 33342

Mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 (2'-(4-Ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1*H*-benzimidazole-trihydrochloride) werden Zellkerne von lebenden sowie toten Zellen sichtbar gemacht. Es wird eine Lösung von 0,05 mg/ml in Aqua dest. hergestellt und zur Färbung werden die Zellen bei 37°C 15 Minuten inkubiert. Die Fluoreszenz wird bei 358/460 nm (Exzitation/Emission) detektiert.

3.7.2.2 DNA-Detektion mit DAPI-dilactat

DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) ist ein Farbstoff, der mit der DNA toter Zellen interagiert. Die Zellen werden mit wässriger Lösung von 0,1 mg DAPI/ml Aqua dest. 15 Minuten lang bei 37° gefärbt und die Exzitation/Emission bei 365/460 nm bestimmt.

4 Materialien

- 1-Pentanol (Amylalkohol)
- 5-(4-Carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-21, 23H-porphyrin (TPP)
- Chloroform (CHCl_3)
- Dichlormethan (CH_2Cl_2)
- Dimethylformamid (DMF)
- Fixierungsreagens mit Kupfer
- 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4
- Methanol (MeOH)
- N-Methylmorpholin
- N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC)
- Ninhydrin Sprühreagens
- Phosphate Buffered Saline (PBS) mit Calcium und Magnesium 0,003 M, pH 7,2-7,3 (Waschpuffer)
- Polyethylenimine (PEI)
- RPMI-1640 Medium
- TripLE™ Select 12563

5 Ergebnisse

5.1 Entwicklung einer Methode zur Kopplung von TPP und PEI

Im Folgenden wird die Entwicklung sowie Optimierung einer Kopplungsmethode für den Photosensitizer 5-(4-Carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-21, 23H-porphyrin (TPP) an Polyethylenimin (PEI) beschrieben. Mittels N,N'-dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und N-Methylmorpholin als Katalysator soll die Carboxylgruppe von TPP in einen reaktiven Ester übergeführt werden. Anschließend soll der Ester mit Aminogruppen von Polyethylenimin (PEI) unter Bildung einer stabilen Amidbindung zwischen TPP und PEI reagieren. Dabei soll durch Variieren der Ansatzverhältnisse von TPP und PEI das optimale Reaktionsverhältnis ermittelt werden, bei dem die höchstmögliche Menge TPP an PEI konjugiert, jedoch gleichzeitig das Konjugat noch wasserlöslich ist.

Für die Kopplung dient Chloroform als Lösungsmittel, da die Reaktion nur im wasserfreien Milieu erfolgt und alle Reaktionskomponenten darin löslich sind. Zudem wird die Eigenschaft von Chloroform, dass es mit Wasser nicht mischbar ist, zur Isolierung von wasserlöslichem Konjugat genutzt.

Praktische Durchführung

Zur Bildung des Aktivesters wird TPP in Chloroform gelöst (1 mg/ml) und DCC in 4-fachem molarem Überschuss (12,25 mg/mg TPP) zugegeben. Anschließend wird N-Methylmorpholin in äquimolarer Menge zu TPP (153,4 µl/mg TPP) zugesetzt und die Mischung bei Raumtemperatur eine Stunde am Magnetrührer gerührt. Da die Carboxylgruppe von TPP innerhalb einer Stunde in einen reaktionsfreudigen Ester übergeführt sein sollte, wird dieser Schritt im Weiteren als Aktivierung bezeichnet. Zur Reaktionskontrolle wird TPP nur mit jeweils DCC oder Methylmorpholin unter den gleichen Bedingungen inkubiert.

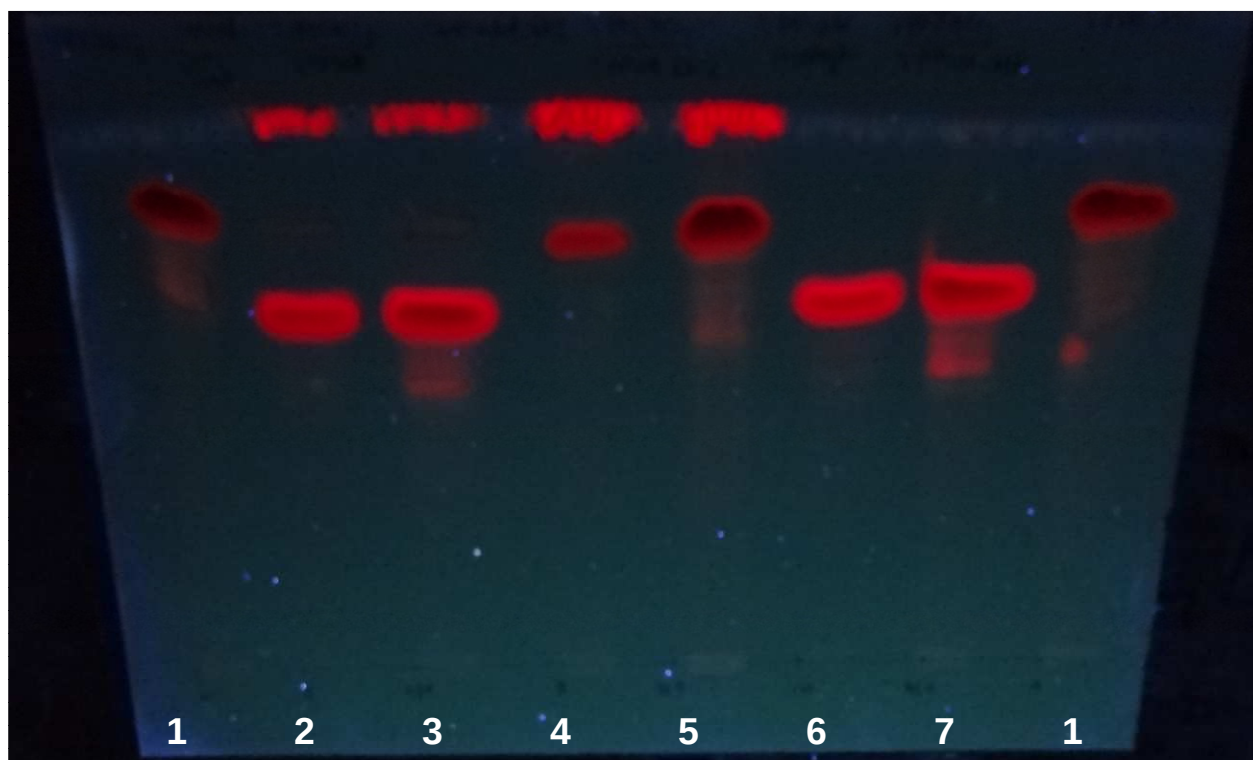
Dem Aktivester wird eine Lösung von PEI in Chloroform in unterschiedlichen molaren Verhältnissen zugegeben und der Ansatz eine Stunde unter Ausschluss von Licht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird, wie in Unterkapitel 5.2.2. beschrieben, das Konjugat isoliert und die RFI bestimmt.

Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch dokumentiert, wobei als Fließmittel CHCl₃/MeOH (80/20) verwendet wird. Das Auftragevolumen beträgt 5 µl.

Variation des Aktivierungsschrittes

Die molaren Verhältnisse von TPP und DCC werden im Folgenden variiert, um die optimalen Mengen zur Aktivierung zu ermitteln. Bei diesem Versuch wird dieselbe Menge TPP in CHCl_3 (1 mg/ml) mit dem vier (12,25 mg) - bzw. achtfachen (24,50 mg) molaren Überschuss an DCC in CHCl_3 versetzt und eine Stunde unter Lichtschutz gerührt.

Zusätzlich wird die Aktivierungsdauer optimiert, wofür TPP in CHCl_3 gelöst (1 mg/ml) und mit dem vierfachen molaren Überschuss von DCC (12,25 mg/mg TPP) versetzt wird. Parallel werden die Ansätze 60 Min. bzw. 45 Min. unter Lichtschutz aktiviert.



Substanz		Rf - Hauptbande	Rf - Nebenbanden
1	TPP/ CHCl_3	0,84	0,73/0,67
2	TPP mit DCC/Methylmorpholin aktiviert	0,67	0,8/0,96
3	TPP/ CHCl_3 + TPP mit DCC/Methylmorpholin aktiviert	0,67	0,53/0,8 intensiv 0,96
4	TPP mit DCC aktiviert	0,83	0,96
5	TPP/ CHCl_3 + TPP mit DCC aktiviert	0,79	(am Start schwache Fluoreszenz) schwach 0,6; Intensiv 0,96

6	TPP mit Methylmorpholin	0,67	
7	TPP/CHCl ₃ + TPP mit Methylmorpholin	0,67	0,55

Abb. 4: Dünnschichtchromatogramm der unterschiedlichen Reaktionsansätze nach Aktivierung von TPP mit DCC/Methylmorpholin.

(„+“ bedeutet, dass die Reaktionsmischungen übereinander aufgetragen wurden).

Ergebnisse der Variationen

Auf der DC-Platte (Abb. 4) ist nahe der Fließmittelfront nach Aktivierung von TPP mit DCC (Bande 2, 3, 4, 5) eine zusätzliche intensive Bande mit dem R_f-Wert 0,96 erkennbar, welche bei der Reinsubstanz (Bande 1, R_f_{TPP} 0,84) nicht vorhanden ist. Die lange Laufstrecke resultiert aus verminderten polaren Wechselwirkungen, sodass diese Substanz den Aktivester darstellen könnte. Bei Umsetzung von TPP mit Methylmorpholin (Bande 6, 7) tritt diese Bande nicht auf. Zusätzlich sinkt durch Zusatz bzw. in Gegenwart von Methylmorpholin (Bande 2, 3, 6, 7) der R_f-Wert von TPP von 0,84 auf 0,67. Diese Abnahme der Wanderungsweite von TPP ist unabhängig davon, ob Methylmorpholin während der Aktivierung zugesetzt wurde oder mit TPP nur gemischt wurde. Die Variation der molaren Verhältnisse von TPP zu DCC ergibt keine Intensitätsunterschiede zwischen Haupt- und Nebenbande. Eine Variation der Aktivierungsdauer bewirkt ebenfalls keinen Unterschied in der Intensität der Banden. Jedoch ist die Wasserphase nach 60 Minuten Aktivierung sichtbar stärker gefärbt und auch die RFI des Konjugates bei 420/650 nm ist um das Doppelte höher als nach 45 Minuten Aktivierung.

Zusammenfassung

Aufgrund der Resultate der Vorversuche wird die Carboxylgruppe von TPP nur mit DCC aktiviert, da Methylmorpholin als ein in der Literatur beschriebener Katalysator keinen zusätzlichen positiven Einfluss zeigte. DCC für wird in vierfachem molaren Überschuss eingesetzt, da höhere Mengen Carbodiimid keine Intensitätssteigerung der Banden verursachen. Die Aktivierungsdauer wird auf 60 Minuten festgelegt, da aufgrund der höheren RFI offensichtlich mehr Aktivester gebildet wird, der für die weitere Umsetzung mit PEI entscheidend ist.

5.2 Reinigung des Konjugates

Um das Konjugat aus der Chloroformphase zu isolieren, werden zwei Methoden untersucht. Einerseits das Ausschütteln der Chloroformphase mit Aqua dest. (Methode A),

und andererseits die Zugabe von Aqua dest. zur Chloroformphase mit anschließendem Abdampfen des organischen Lösungsmittels unter verminderten Druck (Methode B).

5.2.1 Bradford Test von PEI

Dieser Vorversuch zur Quantifizierung von PEI mittels Bradford-Test ist notwendig, um die Verteilung von PEI zwischen Chloroform und Wasser abschätzen zu können, sobald es mit CHCl_3 gemischt wird und mit Aqua dest. ausgeschüttelt wird. Im Idealfall sollte das gesamte PEI von der Chloroform- in die Wasserphase übergehen, sodass das Produkt nach Methode A isolierbar ist. Falls sich PEI zwischen Chloroform und Wasser verteilt, sollte mit Hilfe dieses Tests eine Abschätzung getroffen werden, inwieweit Ausschütteln eine sinnvolle Methode zur Isolierung des wasserlöslichen Konjugates darstellt. Der Test wird wie in Unterkapitel 3.5. beschrieben verwendet.

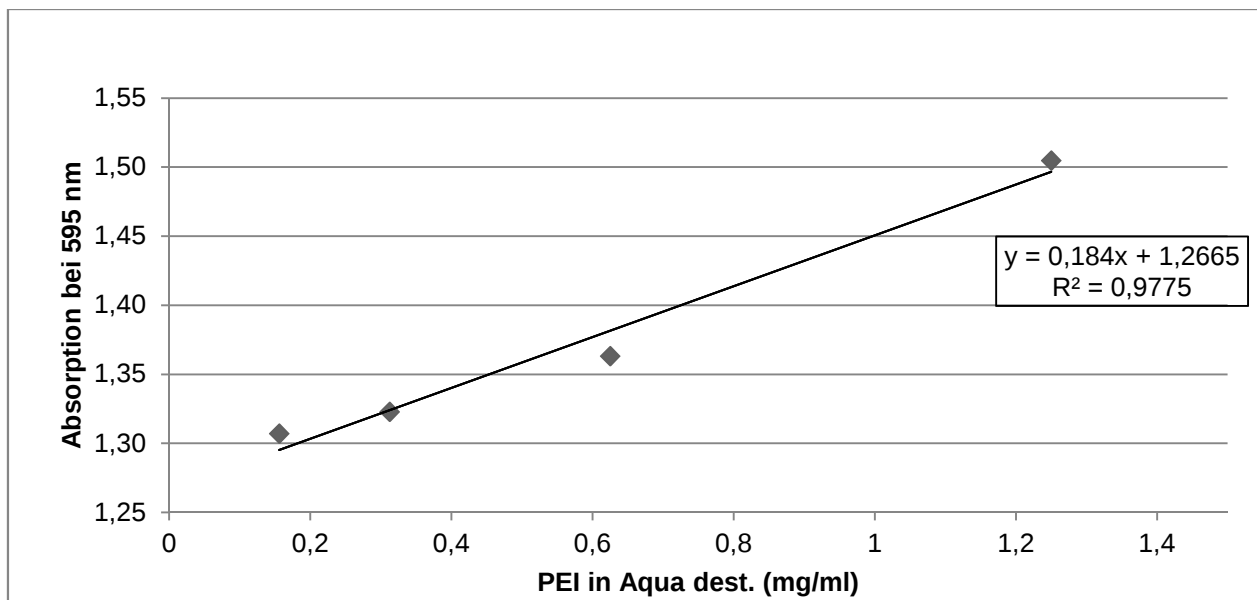


Abb. 5: Eichgerade von PEI in Aqua dest. nach Umsetzung mit Coomassie Brilliant Blue G-250 Reagens.

Praktische Durchführung

Eine Mischung von 5 mg PEI und 1 ml CHCl_3 wird mit 2 ml Aqua dest ausgeschüttelt. Nach der Phasentrennung werden 50 μl Wasserphase mit 350 μl Coomassie Brilliant Blue G-250 Reagens versetzt und die Absorption nach 20 Minuten Inkubation bei 595 nm gegen einen entsprechenden Leerwert ohne PEI bestimmt. Zusätzlich wird eine Verdünnung der Wasserphase 1:5 mit Aqua dest. hergestellt und analog analysiert. Die Ermittlung des PEI-Gehaltes an Hand einer Eichgeraden ergibt keinen relevanten Unterschied zwischen den beiden Messungen.

Durch den Test kann qualitativ gezeigt werden, dass PEI durch das Ausschütteln in die Wasserphase übergeht. Da die Schwankungsbreite der ermittelten Werte sehr hoch ist, kann keine quantitative Aussage getroffen werden.

5.2.2 Vergleich der Reinigungsmethoden

Das wasserlösliche Konjugat wird nach Methode A gewonnen, wobei bezogen auf den Reaktionsansatz zweimal mit dem doppelten Volumen an Aqua dest. ausgeschüttelt und zwischen den einzelnen Schritten die vollständige Phasentrennung abgewartet wird. Anschließend wird die erhaltene Wasserphase gegen Aqua dest. erschöpfend dialysiert (Ausschlussgrenze 12 kDa) und lyophilisiert, um das Konjugat in fester Form zu erhalten.

Andererseits wird nach Methode B der Reaktionsansatz in Chloroform mit dem vierfachen Volumen an Aqua dest. versetzt und das organische Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Danach wird die wässrige Phase bei Raumtemperatur bei 14.000 Umdrehungen pro Minute (UpM) 10 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand gegen Aqua dest. dialysiert (Ausschlußgrenze des Dialyseschlauches 12 kDa). Der Niederschlag wird in zwei Milliliter Aqua dest. resuspendiert und lyophilisiert.

Bestimmung des TPP-Gehaltes:

In den nach Methode A oder B gewonnen Lyophilisaten wird die Menge an TPP pro mg Lyophilisat photometrisch bestimmt und die Belegungsrate wie in Punkt 5.3.3 beschrieben berechnet. Der Substitutionsgrad des nach Methode B hergestellten Konjugates ist mit 1,74 Mol TPP/Mol PEI geringfügig niedriger als jenes nach Methode A dargestellten Konjugates, das 1,85 Mol TPP pro Mol PEI enthält. Deshalb wird bei allen weiteren Studien das Konjugat durch Ausschütteln aus der Chloroformphase nach Methode A isoliert.

Um eine zusätzliche Steigerung der Ausbeute zu erzielen, wird im Folgenden viermal mit Aqua dest. ausgeschüttelt.

Praktische Durchführung

Wiederum wird das doppelte Volumen an Aqua dest. zum Ausschütteln eingesetzt und nach jedem Ausschütteln die vollständige Phasentrennung abgewartet. Nach dem ersten Ausschütteln sind die Phasen nach 10 Minuten, nach dem zweiten Ausschütteln nach 30 Minuten klar getrennt. Nach dem dritten Ausschütteln tritt nach einer Wartezeit von 6

Stunden und auch nach Zusatz von einem Tropfen 1-Pentanol (Amylalkohol) keine Phasentrennung auf.

Ein möglicher Grund für die mangelnde Phasentrennung wird anhand der DC und Besprühen mit Ninhydrin Reagens offensichtlich. PEI wandert nicht als distinkte Bande, sondern zeigt ausgeprägtes „fronting“ und „tailing“. Diese Eigenschaft ist vermutlich für die Entstehung einer Zwischenphase verantwortlich, die bei geringeren Mengen an PEI weniger stark gebildet wird.

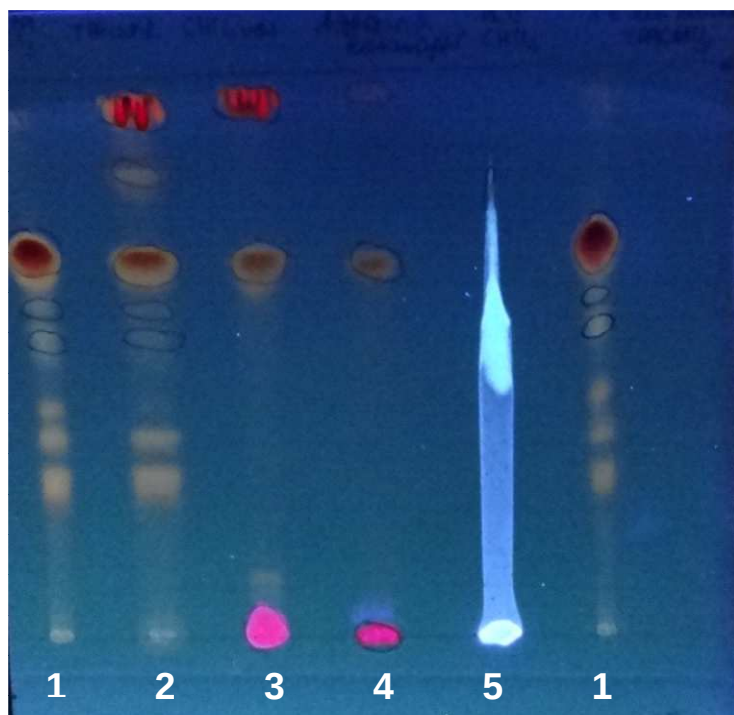
Aus diesem Grund wird bei allen folgenden Studien die Chloroformphase zweimal mit dem doppelten Volumen des Reaktionsansatzes an Aqua dest. ausgeschüttelt.

5.2.3 Aufarbeitung der Chloroformphase

Nach der Isolierung des wasserlöslichen Konjugates soll aus dem restlichen Reaktionsansatz das in der Chloroformphase zurückgebliebene, wasserunlösliche Konjugat möglichst quantitativ gewonnen werden. Es soll bestimmt werden, ob der gesamte aktivierte Ester mit PEI umgesetzt wurde oder noch freie, reaktive TPP-Ester vorhanden sind. In diesem Fall soll das Mengenverhältnis von PEI zu TPP variiert werden.

Praktische Durchführung

Die Kopplung und Aufarbeitung wird wie in Unterkapitel 5.2. durchgeführt und die einzelnen Reaktionsschritte mittels DC überprüft. Hierzu werden nach jedem Schritt der Kopplungsreaktion jeweils 5 µl aliquot auf eine DC aufgetragen.



Substanz		Rf - Hauptbande	Rf – Nebenbanden
1	TPP in CHCl_3 (1 mg/ml)	0,82	0,24/0,30/0,37/0,67/0,73
2	TPP mit DCC nach 1h	0, 81	0,24/0,32/0,48/0,53 intensiv 0,96
3	CHCl_3 -Phase vor dem Ausschütteln	0,82	Start 0,2 intensiv 0,96
4	CHCl_3 -Phase nach dem Ausschütteln	0,82	Start/schwach 0,96
5	PEI in CHCl_3 (1 mg/5ml)	0,79	Schlieren

Abb. 6: Dünnschichtchromatogramm der Konjugation von TPP an PEI nach Besprühen mit Ninhydrin Reagens.

Im Chromatogramm (Abb. 6) sind nach Reaktion von TPP mit DCC deutliche Banden mit einem Rf von 0,96 sichtbar (Bande 2 und 3), die den apolaren TPP-Aktivester darstellen und damit auf eine erfolgreiche Aktivierung hinweisen. Diese Bande ist jedoch auch nach Reaktion mit PEI (Bande 3) erkennbar, wird aber durch das Ausschütteln mit Wasser entfernt, da sie nach dem Ausschütteln (Bande 4) kaum mehr sichtbar ist. Die zahlreichen Nebenbanden von TPP mit DCC sind nach der PEI-Zugabe nicht mehr erkennbar. Ein wesentlicher Unterschied besteht in der Intensität der Startbanden der beiden Chloroformphasen nach Umsetzung mit PEI (Bande 3 und 4). Diese Startbande ist vor dem Ausschütteln doppelt so groß als nach dem Ausschütteln und weist auf nicht

extrahiertes und damit wasserlösliches Konjugat in der Chloroformphase hin. Zusätzlich ist bei Bande 4 nach dem Ausschütteln eine Ninhydrin-positive Schliere erkennbar, die wie bei Bande 5 durch PEI hervorgerufen wird. Da die Fluoreszenz von TPP und die Schliere von PEI an der Startbande ersichtlich sind, kann von Konjugatbildung ausgegangen werden. Auf Grund der Tatsache, dass die TPP-Aktivester nach Umsetzung mit PEI noch vorhanden sind (Bande 3), wird eine Methode zur Aufarbeitung der Chloroformphase entwickelt.

5.2.3.1 Entwicklung einer Aufarbeitungsmethode

Um die Chloroformphase bestmöglich aufzuarbeiten und zu analysieren, werden die folgenden Versuche durchgeführt.

Säulenchromatographie an Kieselgel

Eine Auftrennung des Produktes durch Säulenchromatografie (SC) sollte auf Grund der unterschiedlichen Polaritäten den TPP-Aktivester als erste Fraktion, TPP als zweite und das gebildete TPP-PEI Konjugat die dritte Fraktion ergeben. Die SC wird mit Kieselgel als stationärer Phase durchgeführt und als Fließmittel zunächst CHCl_3 gewählt, das jedoch auf Grund seiner Apolarität und der dadurch geringen Trennwirkung durch $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 80/20 ersetzt wird. Die Trennung ergibt zunächst eine stark lila gefärbte Fraktion, die rasch durch die Säule diffundiert. Anschließend bildet sich ein gefärbter Ring etwas unterhalb der Auftragezone. Diese Phase diffundiert auch nach langer Laufzeit nicht weiter. Es ist vermutlich PEI, welches durch seine hohe molekulare Größe und Polarität nicht weiter aufgetrennt werden kann. Deshalb wird das Kieselgel mit möglicherweise adsorbiertem Konjugat abgehoben und mit Methanol versetzt, um das restliche TPP-Konjugat zu eluieren. Nach Entfernen von Methanol unter vermindertem Druck ist das Kieselgel noch gefärbt und wird mit CH_2Cl_2 eluiert. Durch die beiden Lösungsmittel konnte zwar das Konjugat vom Kieselgel gelöst werden, jedoch war durch eine Verschiebung des Absorptionsmaximums in das grüne Farbspektrum eine quantitative Auswertung nicht möglich. Um das Phänomen der Grünfärbung zu untersuchen wird ein Versuch, der im Weiteren beschrieben ist, durchgeführt.

Dieser Nachweis belegte, dass sich in der Chloroformphase verschiedene Produkte mit unterschiedlicher Polarität anreichern, wobei die erste, relativ große Fraktion nicht umgesetztes, aktiviertes TPP sein könnte. Die Säulenchromatografie ist jedoch nicht ideal für Trennung der beiden hochmolekularen Substanzen, PEI und Konjugat.

Eine andere untersuchte Methode zur Aufarbeitung ist die Kombination aus Zentrifugation und Dialyse.

Die nach dem Ausschütteln mit Aqua dest. verbleibende CHCl_3 -Phase wird unter vermindertem Druck zur Trockenen eingedampft und der Rückstand unter Verwendung von Ultraschall in Aqua dest. gelöst. Um ungelöste Teilchen abzutrennen, wird die Lösung 10 Minuten bei 10.000 UpM bei RT zentrifugiert und der Überstand gegen Aqua dest. erschöpfend dialysiert (Ausschlussgrenze 12.000 kDa). Der wasserunlösliche Niederschlag wird in Aqua dest. suspendiert und gemeinsam mit dem Dialysat lyophilisiert.

Die photometrische Analyse ergab, dass im wasserlöslichen Produkt noch restliches Konjugat mit gleicher Belegungsrate wie nach Methode A gewonnenes Produkt enthalten ist. Der hydrophobe Niederschlag enthält nicht umgesetztes TPP in relativ hohen Mengen.

5.2.3.1.1 TPP Verdünnungsversuche zur Untersuchung des Farbumschlages

In den folgenden Versuchen soll der während der Säulenchromatografie auftretende Farbumschlag von TPP näher untersucht werden.

Praktische Durchführung

Violett gefärbte 500 μl Aliquote von TPP-Lösungen (1 mg/ml) in DMF werden zunächst mit der gleichen Menge CHCl_3 versetzt, woraufhin sich eine Grünfärbung einstellt. Nach anschließender Zugabe von 200 μl MeOH färbt sich die Lösung wieder violett. Bei erneuter Zugabe von CHCl_3 tritt wieder ein Farbumschlag nach grün auf. Bei dem Versuch, die Ausgangslösung nur mit MeOH zu verdünnen (ohne Zusatz von CHCl_3) bleibt die violette Farbe bestehen.

Analoge Versuche werden mit Lösungen von TPP in DMSO durchgeführt. Bei Zusatz von CHCl_3 erfolgt ein olivgrüner Farbumschlag, der sich durch Zugabe von MeOH nicht in die ursprüngliche Violettffärbung umkehren lässt. Bei Zugabe von MeOH allein kommt es zu keinem Farbumschlag. Durch Ansäuern einer Lösung von TPP in DMSO mit einem Tropfen konzentrierter Ameisensäure erfolgt ein Farbumschlag nach grün, während ein Tropfen 4 M HCl eine intensiv hellgrüne Färbung verursacht. Gibt man zu dieser Lösung eine wässrige 15%-ige NaCl-Lösung, dann tritt eine orangegelbe Farbe auf.

Dementsprechend dürfte der Farbumschlag von Grün auf Rosa nicht umkehrbar sein und wahrscheinlich durch Änderung des pH-Wertes bedingt sein. Die Farbänderung ist allerdings nicht vorhersehbar und kalkulierbar, sodass für Untersuchungen nur Lösungen der ursprünglich rosavioletten Farbe quantitativ analysiert werden.

Wegen dieser Resultate wurde eine Aufarbeitung der verbliebenen Chloroformphase aus einer Kombination aus Zentrifugation und Dialyse vorgenommen, um das wasserlösliche Konjugat möglichst quantitativ zu gewinnen. Dieses Konjugat wird bei weiteren Versuchen als Konjugat B bezeichnet.

5.3 Analytik des Konjugates

5.3.1 Eichgerade von TPP

Um TPP im Konjugat zu quantifizieren und damit die Belegungsrate bestimmen zu können, wird sowohl im UV/VIS als auch im Fluorimeter eine Eichgerade erstellt. Da TPP nicht hydrophil ist, wird als Lösungsmittel eine Mischung von DMF/0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 verwendet.

Praktische Durchführung

TPP wird in DMF (1 mg/ml) vollständig gelöst und mit DMF auf 50 µg/ml verdünnt. Alle weiteren Verdünnungen werden mit DMF/0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 (1+1) in einem Konzentrationsbereich von 0,195 – 6,25 µg/ml hergestellt und deren Absorption bei 420 nm bestimmt. Um die Stabilität der Lösungen zu überprüfen, werden diese nach der Herstellung, nach 24 sowie nach 72 Stunden bei 10.000 UpM zentrifugiert und die Überstände erneut photometrisch analysiert. Die Absorption der Lösungen bleibt über diesen Zeitraum weitgehend konstant.

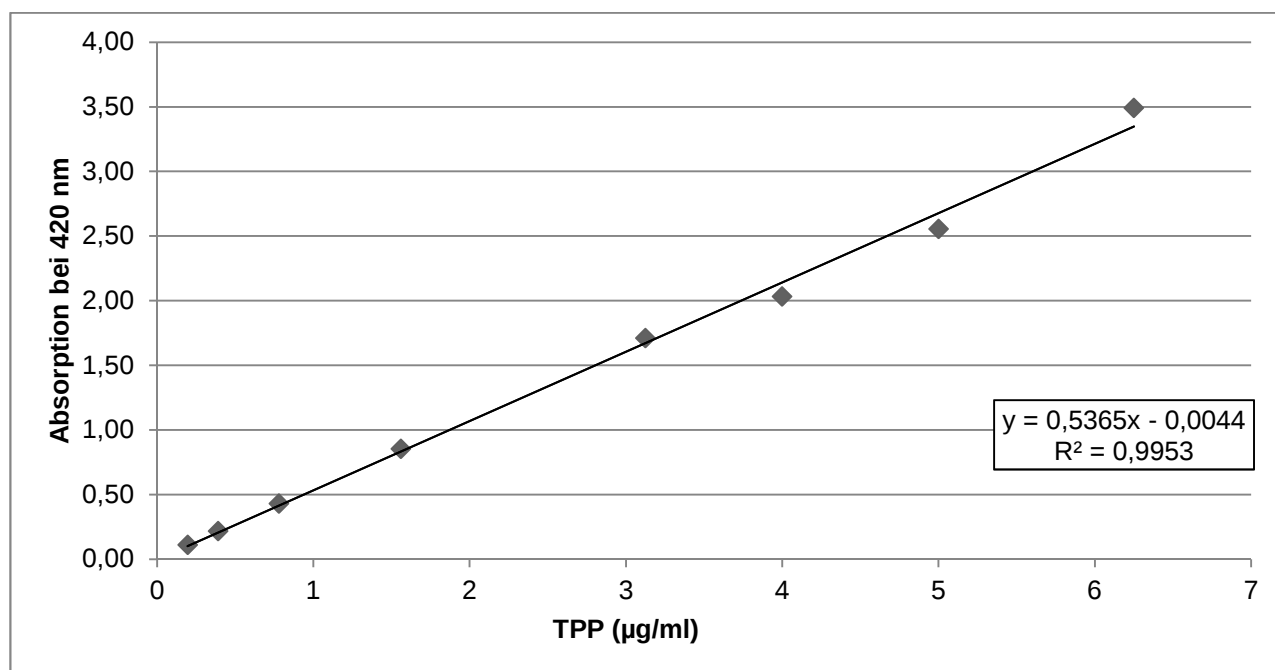


Abb. 7: UV/VIS Eichgerade von TPP in DMF/0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 (50/50, V/V).

Die Eichgerade im Fluorimeter wird in derselben Weise in einem Konzentrationsbereich von 0,488-1,56 µg/ml erstellt. Die Emission wird nach Anregung bei 420 nm bei 650 nm detektiert.

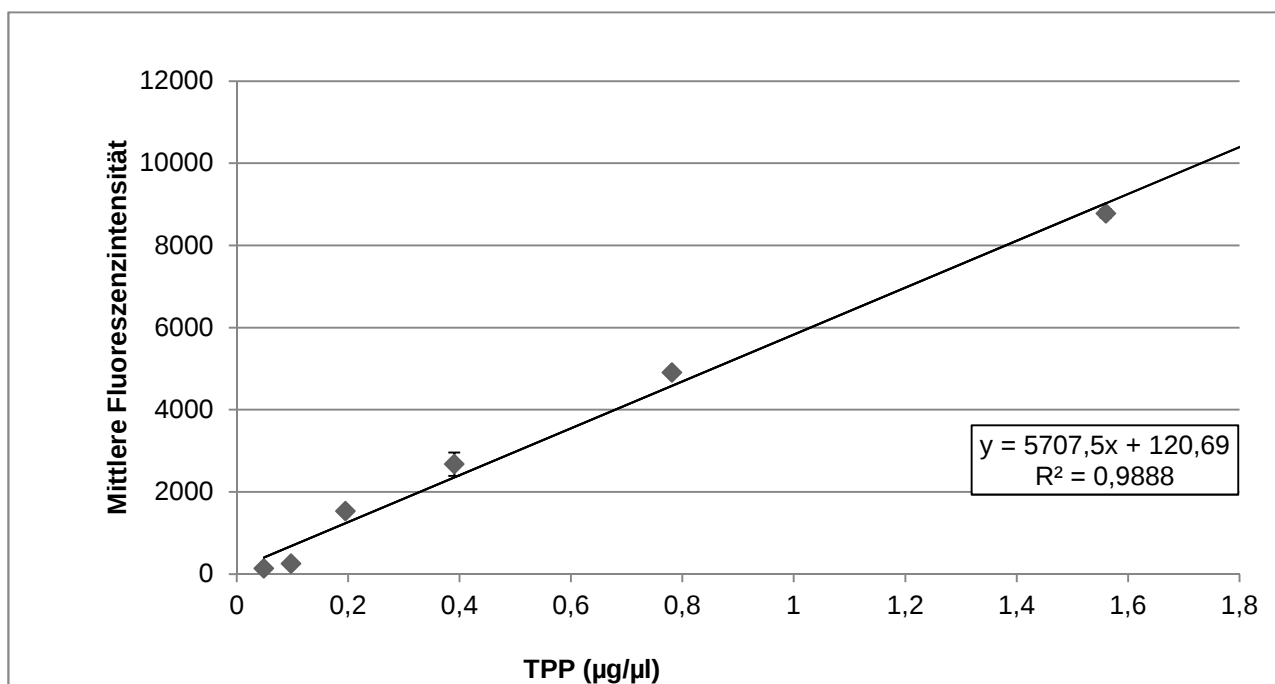


Abb. 8: Fluorimetrische Eichgerade von TPP in DMF/0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 (50/50; V/V).

5.3.2 Eichgerade PEI

Der Substitutionsgrad des Konjugates soll durch Differentialspektroskopie bestimmt werden, wozu eine Eichgerade von PEI im UV/VIS - Bereich notwendig ist.

Praktische Durchführung

Das Absorptionsmaximum von PEI liegt bei 222 nm. Daher kann das zur Erstellung der TPP-Eichgeraden eingesetzte DMF-haltige Lösungsmittelgemisch nicht verwendet werden, da DMF bei Wellenlängen unter 255 nm Licht absorbiert. Aus diesem Grund wird die PEI-Eichgerade in 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 im Konzentrationsbereich von 0,1-10 mg/ml erstellt, da Lösungen mit höheren Mengen an PEI alkalisch reagieren und das Absorptionsmaximum zu höheren Wellenlängen verschieben. Aus diesem Grund wird in weiteren PEI-Lösungen der pH-Wert der Probelösungen mit 1 M HCl auf 7,4 gestellt, um Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Der lineare Bereich der PEI-Eichgerade liegt im Bereich von 0,427-1,2 mg/ml.

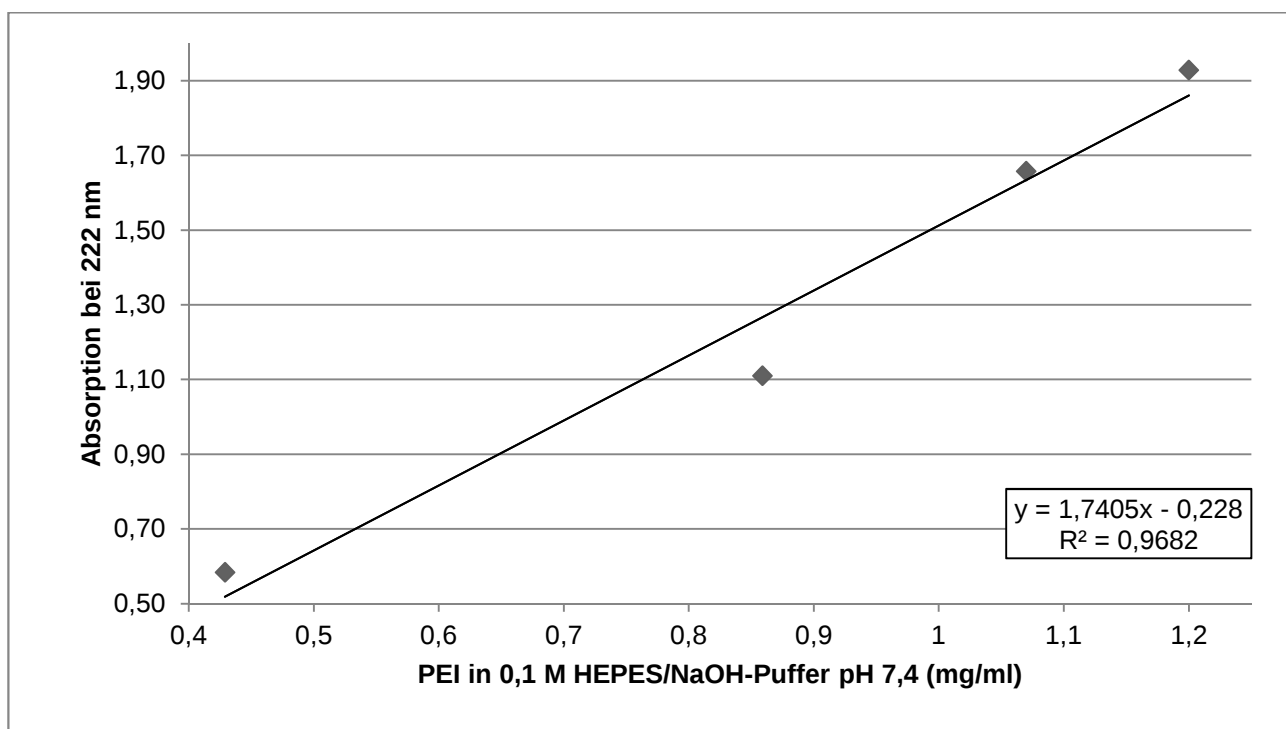


Abb. 9: UV/VIS Eichgerade von PEI in 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4.

5.3.2.1 Untersuchung des wechselseitigen Einflusses von TPP/PEI auf die Absorption

Aufgrund der pH-Sensitivität des Absorptionsmaximums von PEI soll der Einfluss von TPP sowie der Einfluss von PEI auf die Absorption von TPP untersucht werden. Um detaillierte Aussagen treffen zu können, wird einerseits eine Mischung von TPP mit PEI und andererseits das Konjugat, sowie eine Lösung von aktiviertem TPP analysiert.

Praktische Durchführung

Für diesen Versuch wird PEI in 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 gelöst und dessen Absorption bestimmt. Anschließend werden unterschiedliche Mengen an TPP zugesetzt und erneut die Absorption bei 222 nm bestimmt.

Absorption von PEI (1 mg/ml) bei 222 nm	Menge an TPP (1 mg/ml DMF) in DMF/0,1 M HEPES/NaOH-PUFFER pH 7,4 (1+9; V/V) verdünnt	Absorption bei 222 nm nach TPP Zugabe
1,760	1	2,063
1,787	5	2,148

1,799	10	2,300
-------	----	-------

Tabelle 1: Einfluss von TPP auf die Absorption von PEI.

Zur Erfassung des Einflusses von PEI auf die Absorption von TPP werden TPP-Probeflösungen von 1 mg/ml in DMF (A) bzw. CHCl_3 (C) hergestellt und die Absorption bei 420 nm bestimmt. Anschließend wird Probelösung A ohne DCC Zusatz eine Stunde am Magnetrührer und Probelösung C mit DCC versetzt und zur Aktivierung ebenfalls eine Stunde gerührt. Nach der Zugabe von 1 mg PEI zu jeder Lösung werden die Mischungen zur Kopplung eine weitere Stunde am Magnetrührer gerührt (A/C). Als Kontrolle dient eine Probelösung ohne PEI-Zusatz (B).

Probe	Absorption bei 420 nm					
	zu Beginn	nach 1 h Rühren	nach PEI-Zugabe und 1 h Rühren	nach 1h Rühren nach Aktivierung durch DCC	nach Zugabe von DMF und 1 h Rühren	nach Zugabe von PEI und 1 h Inkubation
A	0,854	0,786	0,778	---	---	---
B	0,829	0,789	---	---	0,811	---
C	0,527	---	---	0,517	---	0,373

Tabelle 2: Einfluss von PEI auf die Absorption von TPP mit und ohne DCC-Aktivierung.

Die Ergebnisse in Tabelle 1 zeigen eine relevante Veränderung der Absorption von PEI in Gegenwart steigender Mengen TPP, sodass eine Quantifizierung des PEI-Anteiles im Konjugat durch TPP im UV/VIS erschwert wird. Deshalb wird keine Differentialspektroskopie durchgeführt und PEI gravimetrisch bestimmt.

PEI allein scheint die Absorption von TPP nicht zu beeinflussen, jedoch kommt es nach kovalenter Bindung von TPP an PEI zu einem relevanten Absorptionsverlust, der jedoch in weiteren Bestimmungen nicht berücksichtigt wird.

5.3.3 Berechnung der Belegungsrate

Die Belegungsrate oder der Substitutionsgrad ist die Anzahl der TPP-Moleküle pro PEI-Molekül und wird herangezogen, um das Konjugat zu charakterisieren. TPP besitzt ein Molekulargewicht von 658,76 g/Mol und das verwendete PEI eines von 10.000 g/Mol. Es wird angenommen, dass durch die Reinigungsschritte alle eingesetzten Reaktionspartner entfernt wurden und daher das Lyophilisat nur Konjugat enthält.

Zur Bestimmung wird eine genau bestimmte Masse an Lyophilisat in DMF/0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 (1+1; V/V) gelöst und die Absorption von TPP bei 420 nm ermittelt. Anschließend wird an Hand der Eichgeraden die Masse an TPP im Konjugat berechnet. Die Masse an PEI ergibt sich aus der Differenz aus Einwaage und TPP-Masse. Die so kalkulierten Massen werden durch die entsprechenden Molgewichte dividiert und die Belegungsrate in Mol TPP/ Mol PEI angegeben.

5.3.3.1 Bestimmung der optimalen Belegungsrate

Um bei einer optimalen Belegungsrate gleichzeitig noch Wasserlöslichkeit des Konjugates zu gewährleisten werden in unterschiedlichen Reaktionsansätzen die molaren Verhältnisse von TPP zu PEI variiert.

Die Hydrophilie der einzelnen Konjugate wird durch Lösungsversuche in 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 überprüft und diese anschließend zur Bestimmung der Belegungsrate mit DMF 1+1 (V/V) verdünnt. Von diesen Lösungen wird die Absorption bei 420 nm bestimmt und die Menge von TPP über die Eichgerade (5.3.1.) berechnet. Mit Hilfe von genauen Einwaagen wird die Menge an PEI und weiters die Belegungsrate bestimmt.

Molares Ansatzverhältnis PEI:TPP	Menge an TPP im Konjugat (µg/mg)	errechnete Belegungsrate (Mol TPP/Mol PEI)
1 : 0,0253	0,706	0,0107
1 : 0,0337	0,858	0,0130
1 : 0,0506	0,869	0,0132
1 : 0,1012	2,092	0,0318
1 : 0,6072	9,59	0,1470
1 : 1,518	43,87	0,6965
1 : 3,036	86,84	1,44
1 : 6	106,8	1,865
1 : 12	68,48	1,12
1 : 30*	40,04	0,633
1 : 60**	20,98	0,325

Tabelle 3: Substitutionsgrad von PEI mit TPP bei unterschiedlichen molaren Ansatzverhältnissen.

*Lösung in 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 erst durch Ultraschall-Behandlung (eine Minute bei 80% Intensität) möglich.

**unlöslich in 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4; erst durch Zugabe von DMF löslich.

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, dass die optimale Belegungsrate von 1,86 bei einem molaren Ansatzverhältnis von 1:6 erreicht wird. Somit werden bei einem sechsfachen molaren Überschuss an TPP etwa ein Drittel der TPP-Moleküle an PEI gebunden. Eine weitere Erhöhung des molaren Ansatzverhältnisses bewirkt eine steigende Lipophilie des Konjugates, da bei einem Ansatzverhältnis von 1:30 nur unter Einsatz von Ultraschall eine Lösung erzielt wird. Bei einem Ansatzverhältnis von 1:60 bewirkt auch die Zugabe von DMF keine vollständige Lösung, weshalb die Bestimmung der TPP-Menge sowie die kalkulierte Belegungsrate nicht zuverlässig sind.

5.3.4 Ionischer Komplex

Um mögliche ionische Wechselwirkungen zwischen der Carboxylgruppe von TPP und den Aminogruppen von PEI für eine Konjugatbildung auszunützen, soll ein ionischer Komplex hergestellt werden. Eine Lösung von TPP in DMF wird ohne Aktivierung eine Stunde am Magnetrührer gerührt und anschließend der sechsfache molare Überschuss an PEI zugesetzt. Nach einer weiteren Stunde Rühren wird das Produkt nach Methode A aufgearbeitet und nach erschöpfender Dialyse lyophilisiert. Die Bestimmung der Belegungsrate ergab einen Substitutionsgrad von nur 0,29 Mol TPP/Mol PEI. Dieses Ergebnis beweist, dass ionische Wechselwirkungen eine Bindung von TPP an PEI bewirken, jedoch bei weitem nicht den Substitutionsgrad einer kovalenten Kopplung erreichen. Um das Produkt zu charakterisieren wird in den folgenden Versuchen der ionische Komplex, der in weiterer Folge als Polyelektrolytkomplex (PEK) bezeichnet wird, als Vergleich mitgeführt.

5.3.5 Stabilitäts- und Lösungsversuche des Konjugates

Die Stabilität des Konjugates sollte im Vergleich zum PEK in artifiziellen physiologischen Flüssigkeiten zumindest theoretisch durch die kovalente Bindung von TPP erhöht sein. Zur Überprüfung dieser Annahme werden Stabilität sowie Lösungseigenschaften des wasserlöslichen Konjugates mit der höchsten Belegungsrate (5.2 – Methode A), das Konjugat B aus der verbliebenen Chloroformphase (5.2.3) und die des PEK untersucht.

5.3.5.1 Stabilitäts- und Verdünnungsversuche des Konjugates in artifiziellen physiologischen Flüssigkeiten

Die Stabilität der Konjugate sowie des PEK in artifiziellen Körperflüssigkeiten wie 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 oder PBS sollte für weitere Anwendung überprüft werden.

Praktische Durchführung

Das Konjugat A, das Konjugat B von der Aufarbeitung der Chloroformphase und der PEK werden in 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 oder PBS vollständig gelöst (1 mg/ml) und die RFI bestimmt. Zur Überprüfung der Stabilität werden Verdünnungen von 1:2 oder 1:4 in 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 und 1:2 sowie 1:20 in PBS hergestellt. Diese Lösungen werden anschließend bei 10.000 UpM 2 Minuten bei RT zentrifugiert und erneut die RFI des Überstandes bestimmt. Eine Abnahme der RFI kann durch Niederschlagsbildung bedingt sein und somit auf Instabilität des Produktes hinweisen. Die Messergebnisse sind in Tabelle 4 (0,1 M HEPES/ NaOH-Puffer pH 7,4) und Tabelle 5 (PBS) zusammengefasst.

Probelösung	Konjugat A (Methode A)					Konjugat B					PEK				
Verdünnung	RFI-Bestimmung			MW	%	RFI-Bestimmung			MW	%	RFI-Bestimmung			MW	%
	1	2	3			1	2	3			1	2	3		
1:1	10940	10870	10743	10851 ± 100	100	1066	1080	1064	1070 ± 9	100	2763	2834	2736	2778 ± 51	100
1:2	11533	12113	12033	11883 ± 308	100	11340	11163	11392	11298 ± 120	100	2060	2052	2019	2044 ± 22	100
Nach dem Zentrifugieren	11662	11794	11642	11699 ± 83	98	11402	11538	11436	11459 ± 71	101	1806	1818	1795	1806 ± 11	88
1:4	10502	10475	10349	10442 ± 83	100	11230	11186	10960	11125 ± 145	100	1627	1750	1669	1682 ± 63	100
Nach dem Zentrifugieren	10328	10434	10404	10388 ± 55	99	11105	11109	11163	11125 ± 33	100	927	932	931	930 ± 23	55

Tabelle 4: Stabilität des Konjugates A, des Konjugates B und des PEK in 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4.

Probelösung	Konjugat A (Methode A)					Konjugat B					PEK				
Verdünnung	RFI-Bestimmung			MW	%	RFI-Bestimmung			MW	%	RFI-Bestimmung			MW	%
	1	2	3			1	2	3			1	2	3		
1:1	12374	12069	12248	12230 ± 153	100	12567	13117	13311	1333 ± 226	100	864	684	760	769 ± 90	100
1:2	11425	11737	11528	11563 ± 159	100	11911	12245	12248	12135 ± 120	100	502	515	531	516 ± 15	100
Nach dem Zentrifugieren	11115	11242	11214	11190 ± 67	97	11482	11983	11921	11910 ± 79	98	314	320	303	312 ± 8	60
1:20	4039	3813	3996	3949 ± 120	100	3769	3748	3612	3710 ± 85	100	36	44	45	42 ± 4,9	100
Nach dem Zentrifugieren	3877	3985	4045	3969 ± 85	101	3644	3355	3570	3523 ± 150	95	33	33	34	33 ± 0,6	79

Tabelle 5: Stabilität des Konjugates A, des Konjugates B und des PEK in PBS.

Die Ergebnisse in Tabelle 4 und 5 zeigen, dass die RFI der beiden wasserlöslichen Konjugate in Gegenwart von Elektrolytlösungen mit maximal 5 % nicht nennenswert verändert wird und kein fluoreszierendes TPP freigesetzt wird, das aufgrund seiner Wasserunlöslichkeit einen Niederschlag bilden würde. Daher sind die wasserlöslichen Konjugate in Elektrolyt-hältigen Medien über den Versuchszeitraum stabil.

PBS und 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 bewirken jedoch eine Ausfällung von TPP aus den PEK und damit eine bis zu 45%-ige Abnahme der RFI in der wasserlöslichen Fraktion. Dieses Verhalten gegenüber Elektrolytlösungen beweist einerseits eine ionische Assoziation von TPP und PEI und somit das Vorliegen eines PEK, andererseits ist dieser PEK in Puffern instabil und zerfällt innerhalb kurzer Zeit.

5.3.5.2 Harnstoff Versuch – Anteil der kovalenten Bindung

Die Bildung einer kovalenten Bindung durch die Carbodiimid-Kopplung im Konjugat soll mittels Harnstoff nachgewiesen werden. Harnstoff übt in hohen Konzentrationen einen chaotropen Effekt aus, der zum Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen führt. Somit werden alle nicht kovalenten Bindungen wie Wasserstoffbrückenbindungen zerstört, nur kovalente Bindungen bleiben erhalten. [10]

Praktische Durchführung

Für diesen Versuch werden die Probelösungen des Konjugates A (Methode A), des Konjugates B aus der Chloroformphase und des PEK in 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 sowie der PEK B aus der Aufarbeitung der Chloroformphase hergestellt und die RFI bestimmt. Anschließend wird den Probelösungen fester Harnstoff zur Herstellung von 7 molaren Lösungen zugegeben und nach erneuter Bestimmung der RFI die Lösungen eine Stunde am „end over end“-Mischer bei RT rotiert. Um einen eventuell gebildeten Niederschlag abzutrennen werden die Probelösungen bei 14.000 UpM 5 Min. zentrifugiert und die RFI wiederum bestimmt. Dieser Schritt wurde nach 24 Stunden wiederholt. Die Ergebnisse sind in Abb. 10 zusammengefasst.

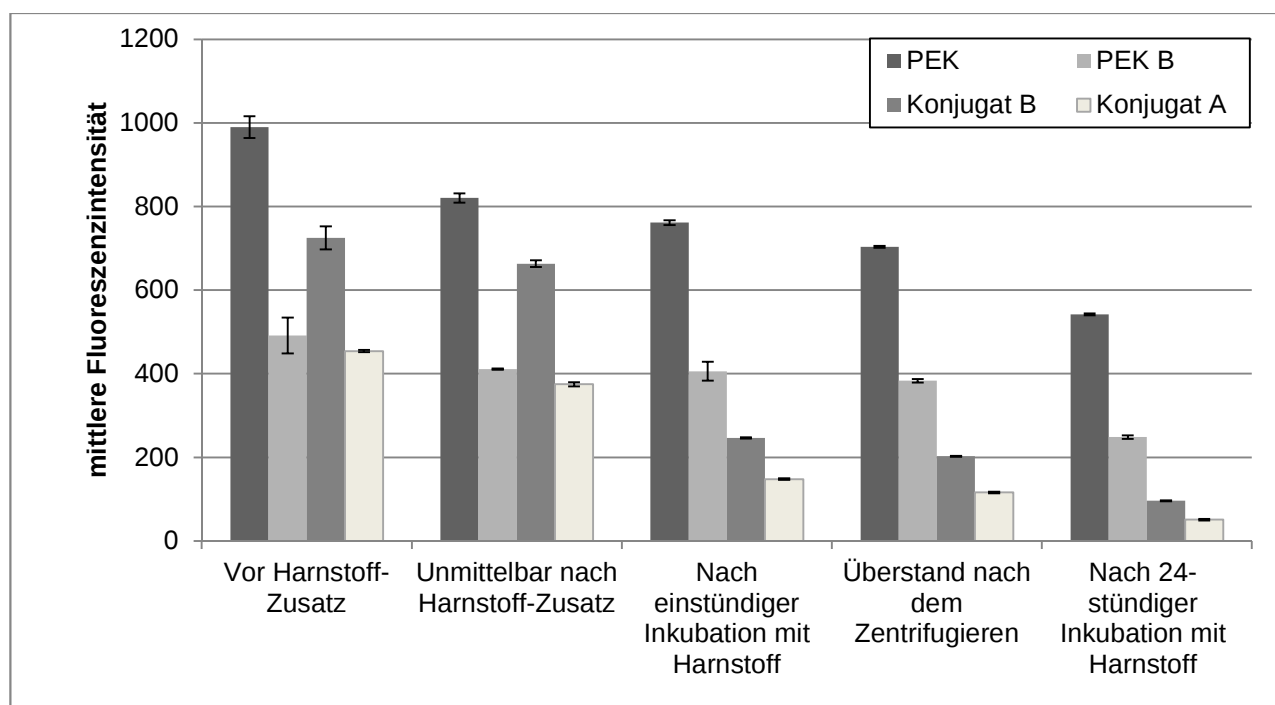


Abb. 10: Stabilität von Konjugat A, Konjugat B, PEK und PEK B in Gegenwart von 7 M Harnstoff.

Prozentuelle Abnahme der RFI durch Harnstoff								
	Konjugat A/0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4		PEK/0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4		Konjugat B/0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4		PEK B/0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4	
	RFI	%	RFI	%	RFI	%	RFI	%
Vor Harnstoff-Zusatz	453	100	990	100	725	100	491	100
Unmittelbar nach Harnstoff-Zusatz	375	83	820	83	663	92	411	84
Nach einstündiger Inkubation mit Harnstoff	148	33	762	77	246	34	406	83
Überstand nach einstündiger Inkubation mit Harnstoff und Zentrifugieren	116	26	703	71	203	28	383	78
Überstand nach 24-stündiger Inkubation mit Harnstoff und	51	11	542	55	96	13	249	51

Zentrifugieren								
----------------	--	--	--	--	--	--	--	--

Tabelle 6: Stabilität von Konjugat A, Konjugat B, PEK und PEK B in Gegenwart von 7 M Harnstoff.

Aus Tabelle 6 und Abb. 10 ist ersichtlich, dass durch Harnstoff die RFI im gelösten Anteil deutlich abfällt, sodass ein beträchtlicher Anteil von TPP an PEI trotz kovalenter Kopplung bei den Konjugaten durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden ist. Um die Unterschiede zwischen PEK und Konjugat A zu verdeutlichen wird der Versuch mit den beiden Probelösungen in 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 wiederholt.

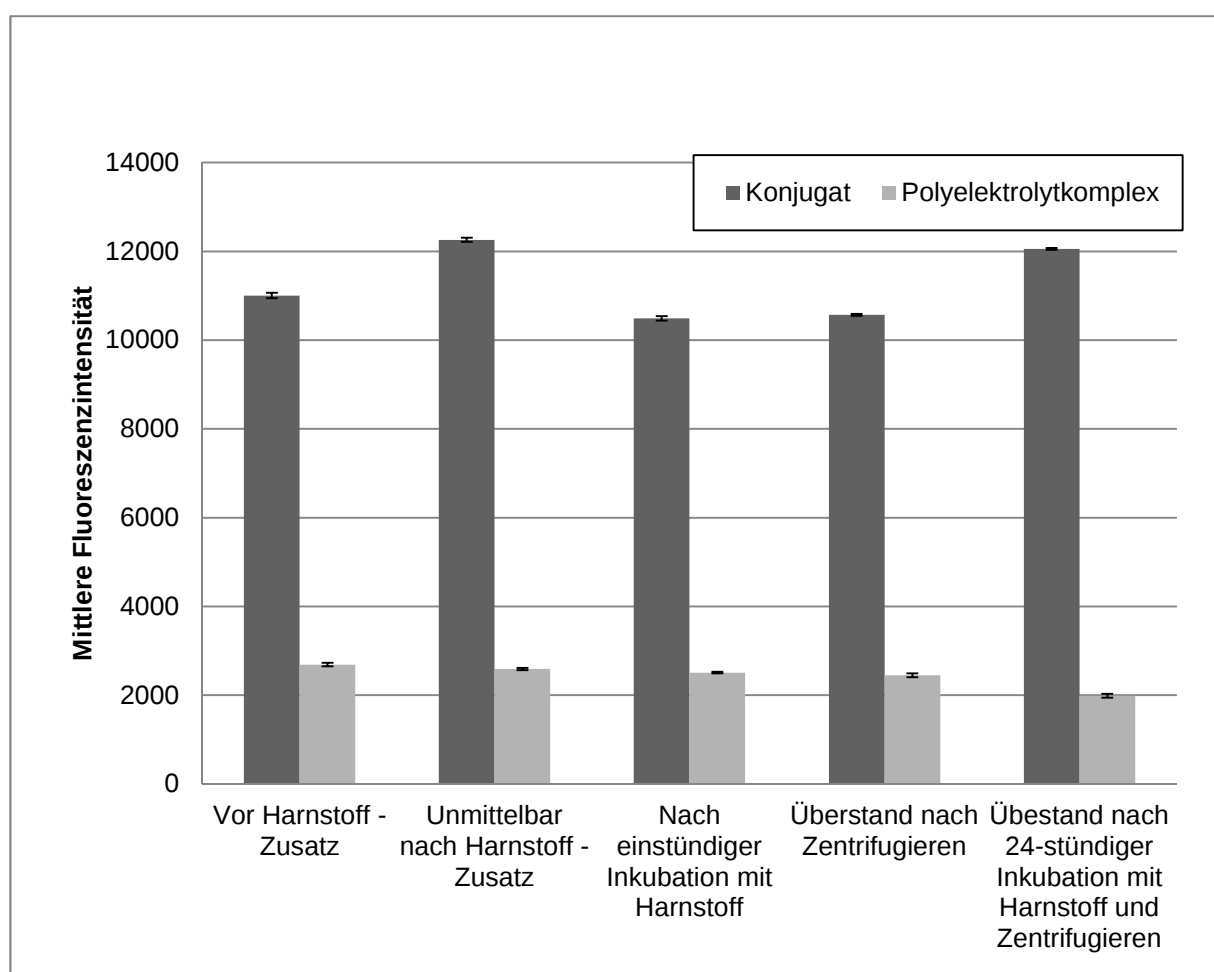


Abb. 11: Stabilität von Konjugat A und PEK in Gegenwart von 7 M Harnstoff (2. Versuch).

Im Gegensatz zum ersten Versuch konnte bei Einsatz höher Mengen an Konjugat und PEK eine Sensitivität gegenüber dem Chaotrop Harnstoff nicht bestätigt werden (Abb. 11). Obwohl die Standardabweichungen relativ gering sind, würde die TPP-PEI Bindung in beiden TPP-PEI Konjugaten weitgehend einer kovalenten Bindung entsprechen. Demgegenüber steht jedoch die Art der Herstellung des PEK, die eine Ausbildung von

kovalenten Bindungen ausschließt. Deshalb wird der Versuch nochmals unter Einsatz geringerer Konjugat- bzw. PEK-Konzentrationen in 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 wiederholt.

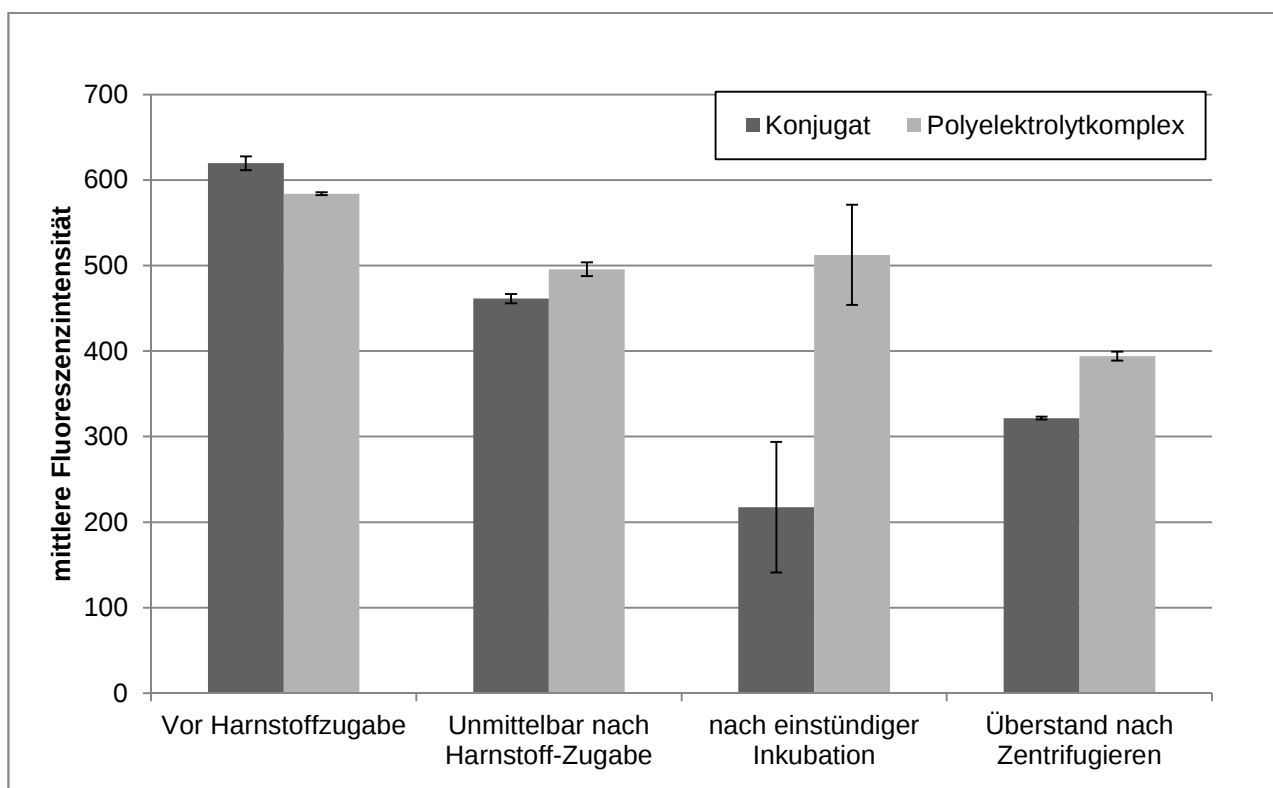


Abb. 12: Stabilität von Konjugat und Polyelektrolytkomplex in Gegenwart von 7 M Harnstoff bei niedrigen Konzentrationen (3. Versuch).

Prozentuelle Abnahme der RFI durch Harnstoff				
Konjugat A			PEK	
	RFI	%	RFI	%
Vor Harnstoffzugabe	620	100	584	100
Unmittelbar nach Harnstoffzugabe	461	75	496	85
Nach einstündiger Inkubation	218	35	513	88
Überstand nach Zentrifugieren	322	52	68	67

Tabelle 7: Stabilität von Konjugat A und PEK in Gegenwart von 7 M Harnstoff bei niedrigen Konzentrationen.

Hier kann man erkennen, dass der Abfall der RFI des Konjugates mit 65% nach einer Stunde am „end over end“ deutlicher ausfällt als bei dem PEK mit 22%. Nach dem Zentrifugieren steigt die RFI des Konjugates von 35% auf 52%. Beim PEK ist ein Abfall der RFI von 88% auf 67% zu erkennen. Allerdings ist der Abfall der RFI bei beiden Probelösungen zu groß als das von einer kovalenten Bindung ausgegangen werden kann.

5.3.6 IR-Spektren

Zur Charakterisierung des Konjugates wird eine Fourier Transform Spektroskopie durchgeführt. Dabei werden Proben des Konjugates mit der höchsten Belegungsrate unter Verwendung von TPP und PEI als Referenzen analysiert. Alle Proben werden für die Untersuchung vollständig in DMF/0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4-7,4 50/50 gelöst.

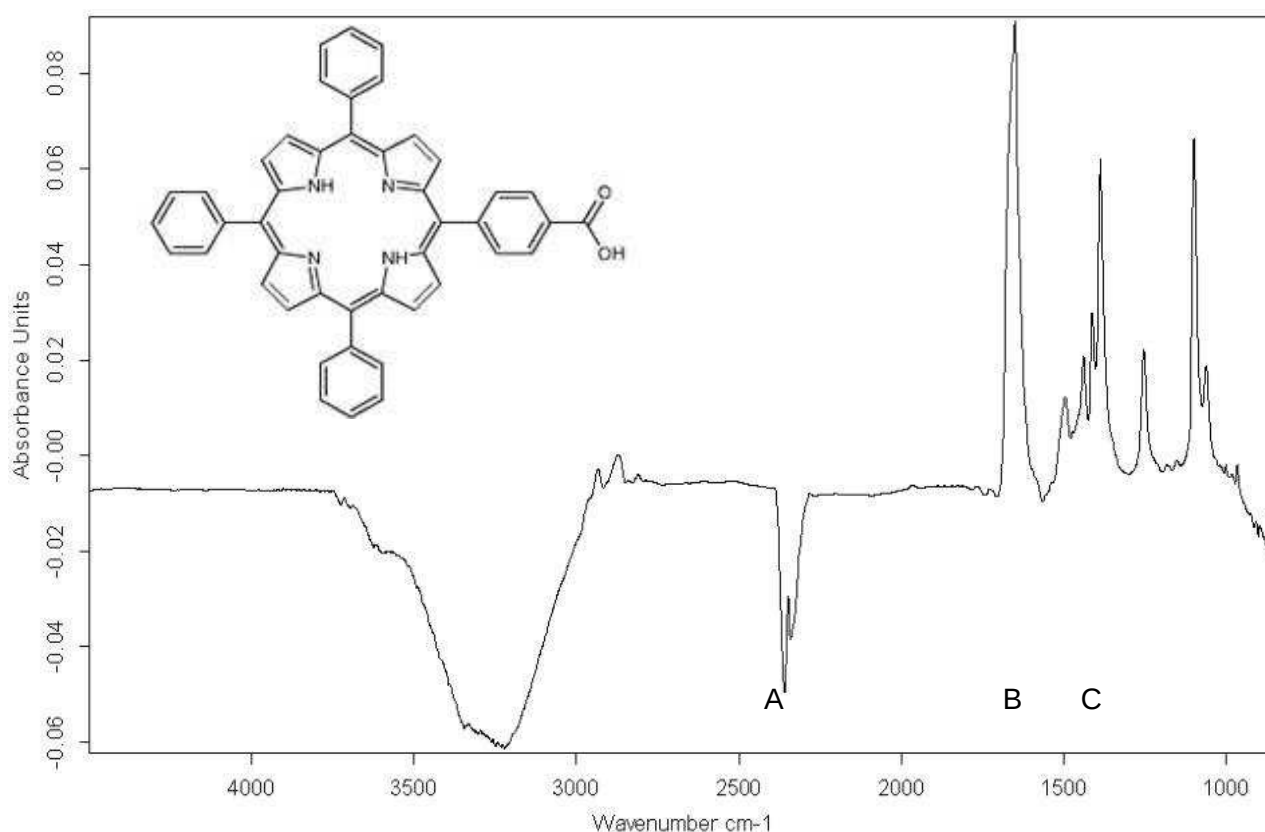


Abb. 13: FTIR-Spektrum von TPP in DMF/0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 (1+1; V/V).

Das IR-Spektrum von TPP zeigt einen starken Peak (A) bei einer Wellenlänge von 2400 nm, der einen durch das Aufnahmeverfahren bedingten CO₂-Peak darstellt. Die Wechselwirkungen der C=C Doppelbindungen im aromatischen System von TPP zeigen sich in den Peaks bei 1650 nm (B) und bei ~1400 nm (C).

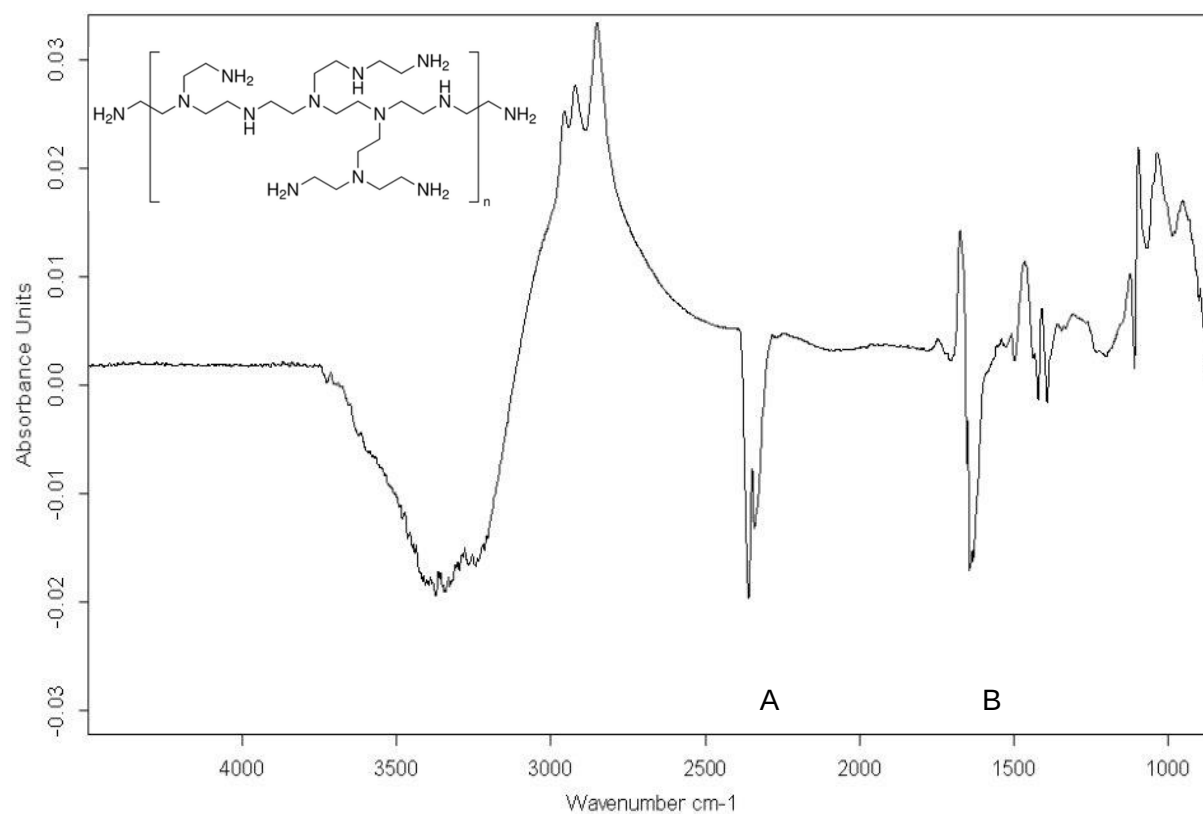


Abb. 14: FTIR-Spektrum von PEI in DMF/0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 (1+1; V/V).

Das Spektrum von PEI (Abb. 14) zeigt neben dem CO₂-Peak bei 2400 nm Peaks bei einer Wellenlänge von 1490–1650 cm⁻¹, die durch NH₂⁻ bzw. NH-Schwingungen der Aminogruppen zu Stande kommen.

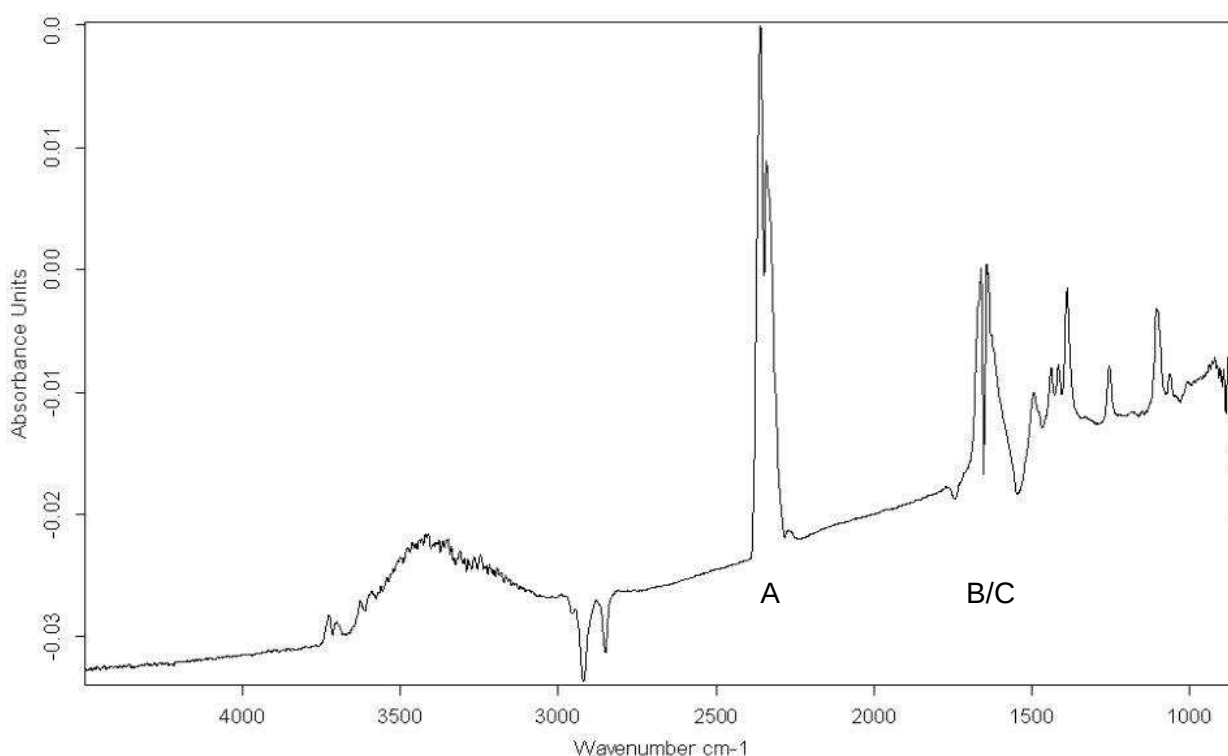


Abb. 15: FTIR - Spektrum von Konjugat nach Methode A in DMF/0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 (1+1; V/V).

Das Spektrum des Konjugates in Abb. 15 zeigt wiederum den CO₂-Peak (A). Die zwei knapp nebeneinander liegenden Peaks B und C einer Wellenlängenbereich von 1500–1600 nm diese deuten auf die entstandene Amidbindung durch die Kopplung hin. Im Fingerprintbereich sind Ähnlichkeiten mit TPP erkennbar, wobei die Banden möglicherweise durch Überlagerung mit PEI-Peaks in ihrer Intensität abgeschwächt sind.

5.3.7 Biologische Aktivität von Konjugat A und PEK

Photosensitizer können bei Bestrahlung freie Radikale bilden. Diese Eigenschaft sollte durch die Kopplung an PEI nicht verloren gehen. Um zu überprüfen, ob PEI-gebundenes TPP noch Sauerstoffradikale bilden kann und dadurch eine zytotoxische Wirkung nach Aktivierung besitzt, werden im Folgenden die Bildung des ROS mit dem SOSG-Reagens bzw. die zytotoxische Wirkung auf Caco-2 Monolayer untersucht.

5.3.7.1 Singulett Oxygen Sensor Green Reagens

In einem Vorversuch wurde die optimale molare Konzentration des SOSG-Reagens mit 1 µM ermittelt. Für den Versuch werden Lösungen des Konjugats, den Ausgangssubstanzen TPP und PEI sowie einer Mischung von TPP und PEI in DMF/0,1 M HEPES/NaOH-Puffer

pH 7,4 (1+1; V/V) hergestellt. Zudem wird als Kontrolle die Lösungsmittel DMF und DMF 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 (1+1; V/V) untersucht. Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Quantifizierung von TPP (siehe Kapitel 5.3.2.1) werden die Lösungen auf einen Gehalt von 1,5 µg TPP/ml eingestellt. Die Fluoreszenz Messungen erfolgen vor der SOSG-Reagens Zugabe, nach der Zugabe des Reagens, nach 30 Sekunden Bestrahlung mit Weißlicht und während der Nachinkubation nach 15, 30, 60 und 90 Minuten. Das Bestrahlen mit Weißlicht wird im Weiteren als Aktivierung bezeichnet. Zwischen den Messvorgängen wird die 96-Wellplatte unter Lichtschutz aufbewahrt, um eine mögliche weitere Aktivierung zu verhindern.

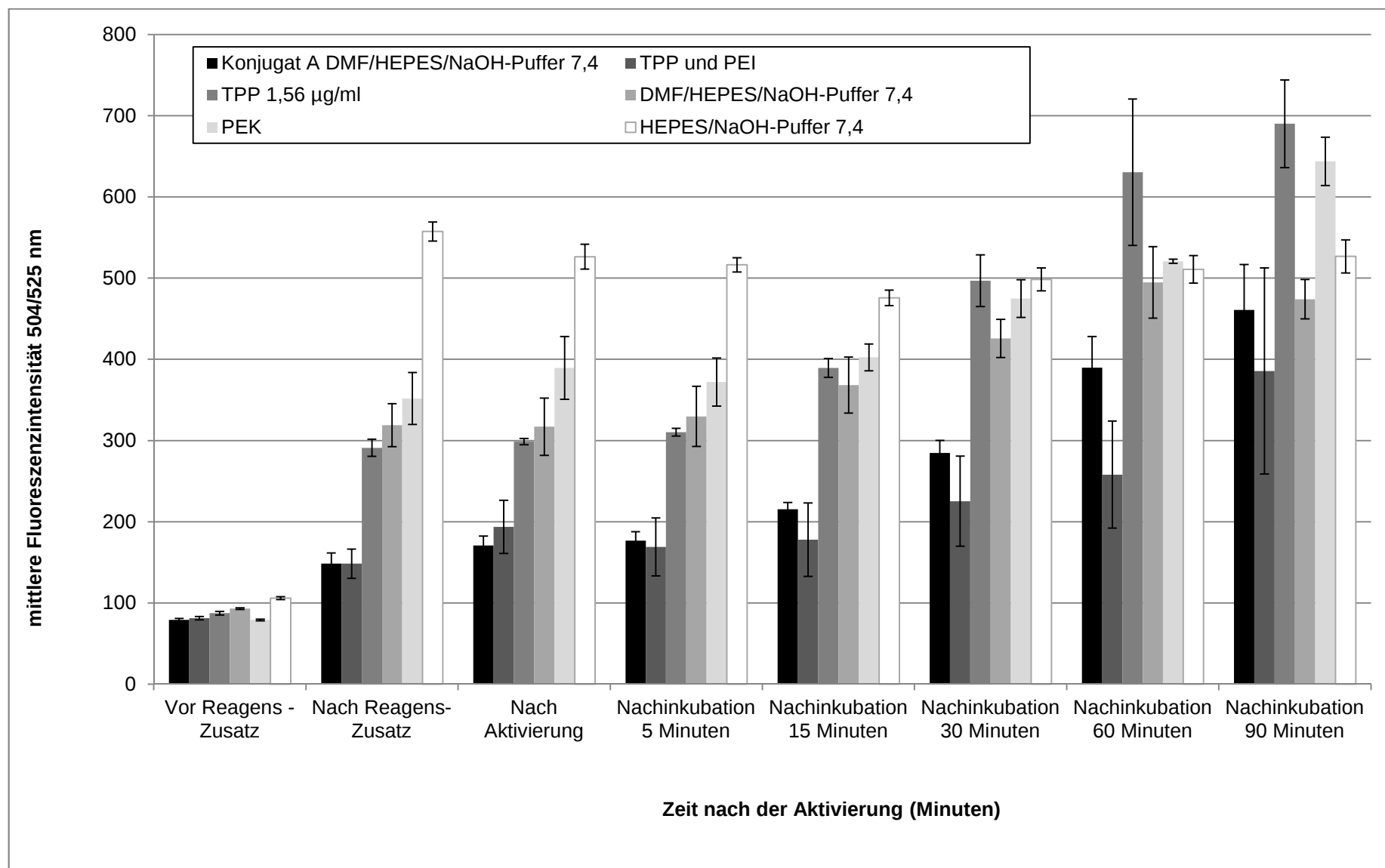


Abb. 16: SOSG-Test von Konjugat A, PEK und den Einzelkomponenten mit Aktivierung durch Weißlicht.

Wie aus Abb. 16 hervorgeht, steigt die mittlere Fluoreszenzintensität durch alleinigen Zusatz des Reagens insbesondere bei den Lösungsmitteln stark an. Die Aktivierung des Photosensitizers durch Weißlicht bewirkt scheinbar eine mit der Zeit zunehmende Bildung von ROS, sowohl im Konjugat als auch im PEK und der physikalischen Mischung von TPP und PEI. Die Emission von grüner Fluoreszenz, die auf die Bildung von ROS hinweisen soll, tritt jedoch besonders in den Lösungsmitteln allein auf und lässt das Gesamtergebnis äußerst zweifelhaft erscheinen.

Daher sollte in einer nächsten Versuchsreihe überprüft werden, ob der Fluoreszenzfarbstoff auch ohne Aktivierung von TPP mit Weißlicht bzw. auch ohne TPP die Bildung von ROS indiziert.

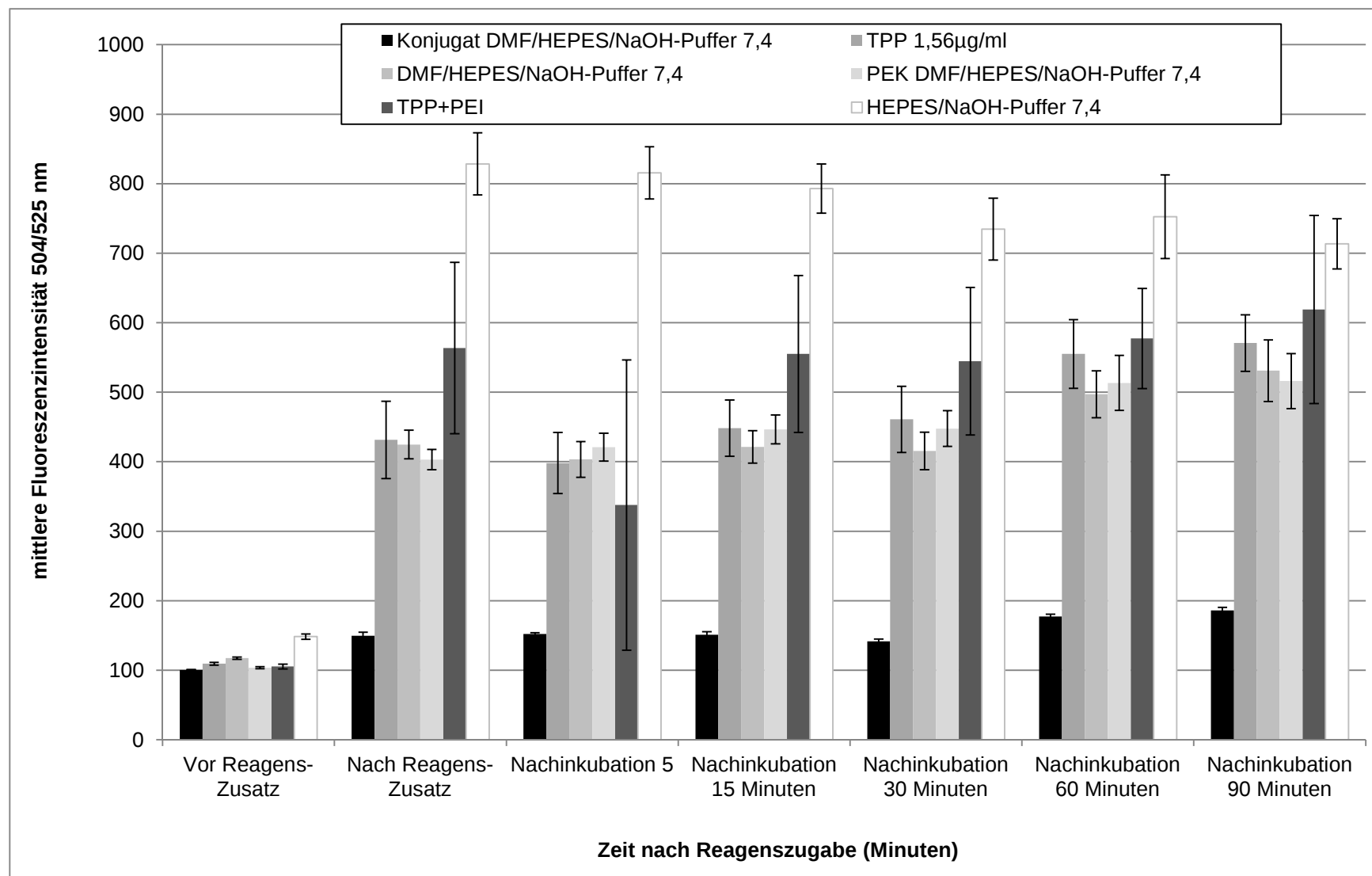


Abb. 17: SOSG-Test von Konjugat A, PEK und den Einzelkomponenten ohne Bestrahlung mit Weißlicht.

Wie bereits im vorangegangenen Versuch beobachtet, bewirkt der Reagens-Zusatz zu allen Probelösungen eine starke Zunahme der Fluoreszenzintensität, die sich unter Berücksichtigung der breiten Standardabweichungen während der Nachinkubation nicht ändert. Insbesondere die hohe Fluoreszenzintensitäten von 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 und auch der Mischung aus DMF und 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 sind bemerkenswert, da sie den Leerwert für alle weiteren Proben darstellen sollten. Proben, die Photosensitizer enthalten, zeigen keine Änderung der RFI mit zunehmender Inkubationsdauer.

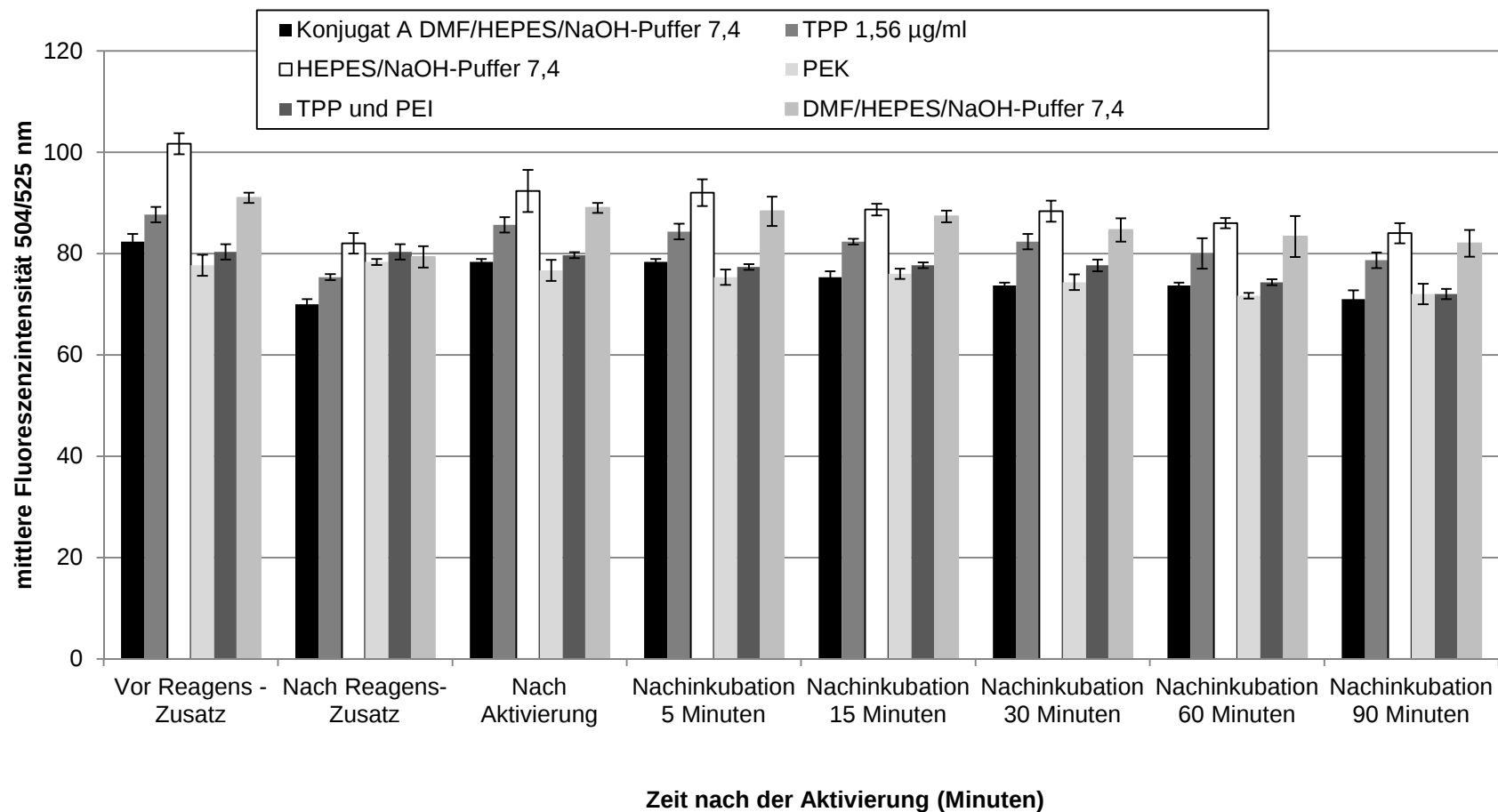


Abb. 18: Kontrollversuch des SOSG - Test, ohne Zugabe von SOSG – Reagens.

Ein weiterer Kontrollversuch wurde durchgeführt, um einen Einfluss der substanzeigenen Fluoreszenz von TPP auf die Wellenlänge des Reagens auszuschließen. Bei diesem Versuch wurde anstelle von Reagens nur MeOH zugesetzt, da das SOSG-Reagens bei den vorigen Versuchen in diesem Lösungsmittel zugesetzt wird. Dieser Versuch zeigt, dass ohne Zugabe des SOSG-Reagens bei einer Wellenlänge von 525 nm nur geringste Fluoreszenzzunahmen detektiert werden können.

Insgesamt ergibt der SOSG-Test einen Hinweis, dass TPP im Konjugat noch eine biologische Aktivität besitzt. Zur endgültigen Bewertung muss jedoch abgeklärt werden, worauf der deutliche Anstieg der RFI bei den Probelösungen ohne TPP-Gehalt zurückzuführen ist. Möglicherweise ist das Lösungsmittel und der darin enthaltene Sauerstoff als Störfaktor für die Selektivität des SOSG-Reagens zu betrachten. Zudem sollte auch die Anwesenheit von PEI als möglicher Störfaktor für die Ergebnisse untersucht werden.

5.3.8 Versuche mit Caco-2 Monolayern

5.3.8.1 Evaluierung der Affinität des TPP-Konjugates zu Caco-2 Monolayern mittels Mikroskopie

In diesem Versuch sollte durch Mikroskopie qualitativ die Interaktion des TPP-PEI Konjugates mit Caco-2 Monolayern untersucht sowie die biologische Aktivität des Konjugates nach Bestrahlung mit Weißlicht beurteilt werden.

Als Probelösungen werden in den folgenden Studien 3 bzw. 6 μ M Lösungen von TPP und Konjugat A in 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 verwendet. Als Kontrolle dienen der Puffer und Lösungen von PEI im Puffer, die die gleiche Menge an PEI wie im Konjugat enthalten.

Praktische Durchführung:

Caco-2 Zellen werden auf Deckgläsern im FlexiPERM-System bis zur Konfluenz kultiviert. Der Monolayer wird mit 100 μ l isotonem 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 gewaschen und anschließend mit je 100 μ l Probelösung bedeckt. Um vorwiegend nur die Bindung an die Zelloberfläche zu ermöglichen, werden die Zellen 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Um nicht gebundenen PS zu entfernen, werden die Monolayer zweimal mit je 100 μ l Puffer gewaschen und die Monolayer anschließend mikroskopisch beurteilt. Zusätzlich werden die Zellkerne viabler Zellen mit Höchst 33342 bzw. die der toten Zellen mit DAPI-dilactat gefärbt.

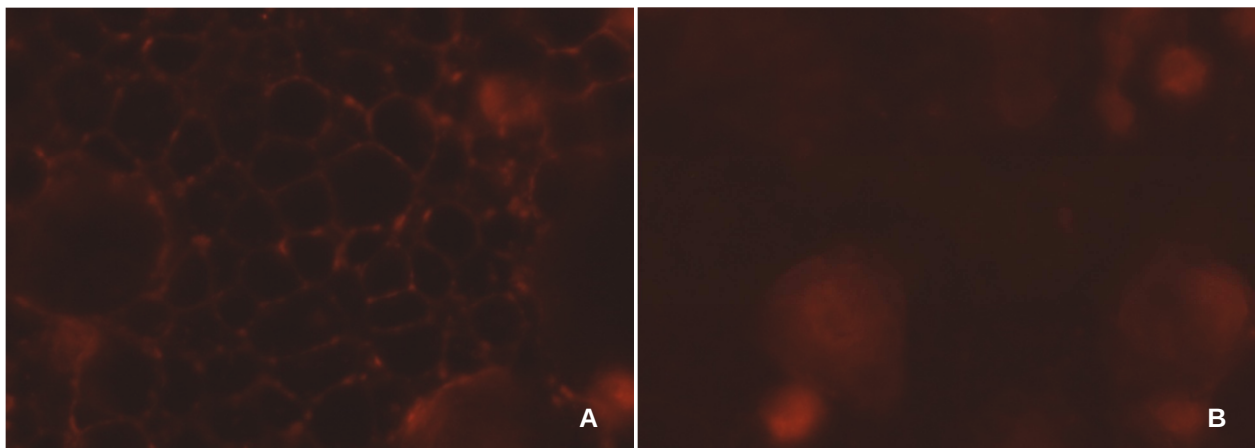


Abb. 19: Fluoreszenzmikroskopie von Caco-2 Monolayern nach 30 Min. Inkubation bei 4°C mit 6 mM Konjugat (A) und 6 µM TPP (B).

In Abb. 19 ist nur eine diffuse Fluoreszenz erkennbar, die auf eine nur sehr schwache Interaktion von TPP mit den Monolayern schließen lässt. Im Vergleich dazu interagiert das Konjugat (A) offensichtlich intensiver mit dem Zell-Monolayer, was an der Spinnenweben-artigen Fluoreszenz erkennbar ist. Möglicherweise wird die erhöhte Zellbindung des Konjugates durch den PEI-Anteil verursacht.

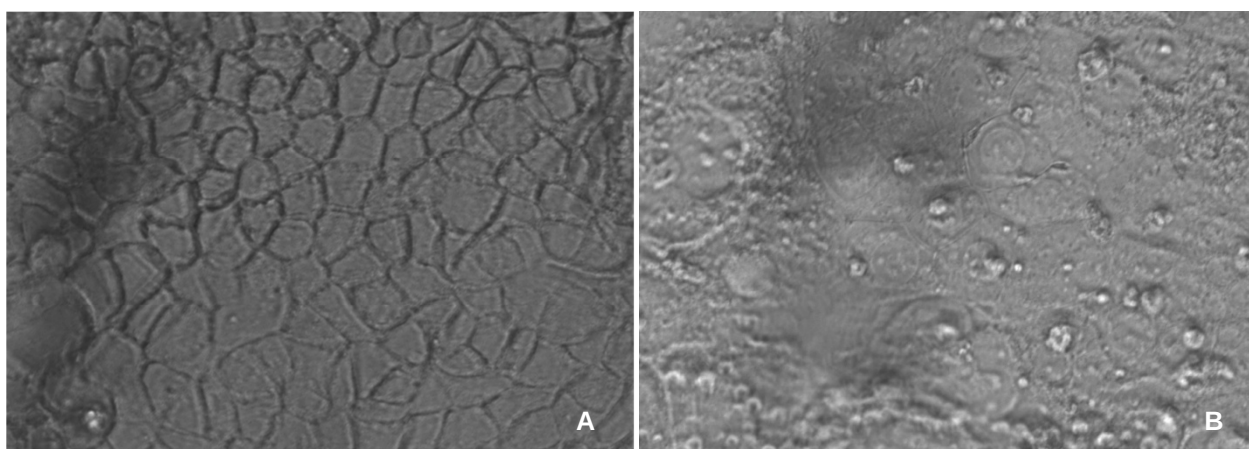


Abb. 20: Caco-2 Monolayer nach 30 Min. Inkubation bei 4 °C mit 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 (A) oder PEI (B) bei 40-facher Vergrößerung.

Während nach Inkubation mit Puffer der Monolayer intakt ist (Abb. 20-A) und die Zellgrenzen im Durchlicht klar erkennbar sind, bewirkt PEI (Abb. 20-B) ein diffuses Erscheinungsbild der Zellgrenzen. Zusätzlich sind Partikel an der Zellmembran vorhanden, die wahrscheinlich aus PEI bestehen, das in 0,1 M HEPES/NaOH Puffer pH 7,4 instabil ist und während der Inkubation bei 4°C sedimentiert.

Um nicht nur die Bindung von TPP und Konjugat A an Caco-2 Monolayer, sondern auch deren biologische Aktivität und möglicherweise Internalisation zu erfassen, werden die mit

den Probelösungen beladenen Zellen gewaschen, 30 Sekunden mit Weißlicht bestrahlt, eine Stunde bei 37°C inkubiert und die Zellkerne nicht viabler Zellen mit DAPI-dilactat gefärbt. Vor dem Betrachten im Mikroskop werden die Monolayer zweimal mit je 100 µl 0,1 M HEPES/NaOH Puffer pH 7,4 gewaschen.

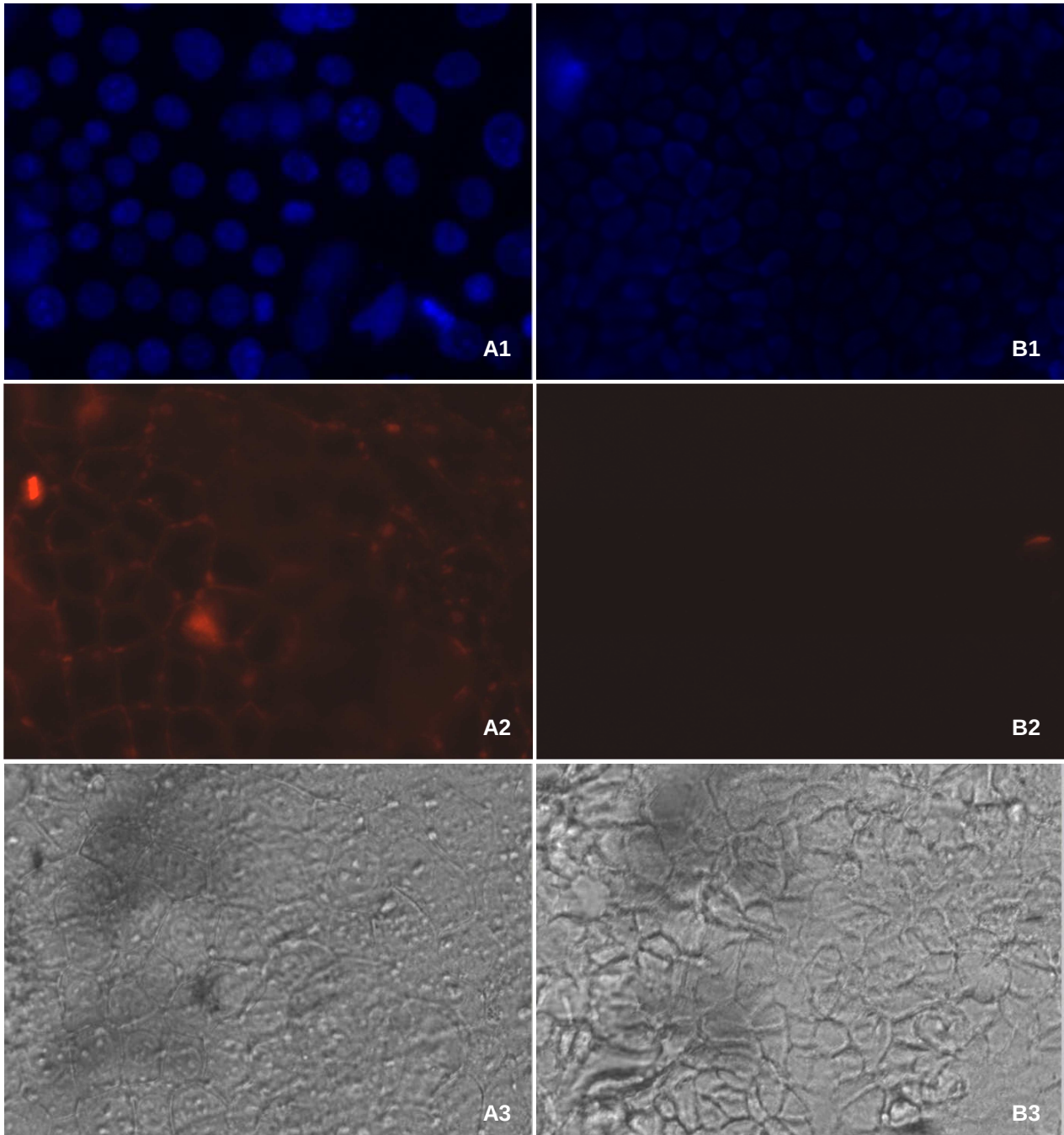


Abb. 21: Mikroskopische Bilder von Caco-2 Monolayern nach 30 Min. Beladung mit 6 µM Konjugat (A1-A3) oder TPP (B1-B3), Bestrahlung mit Weißlicht und 60 Min. Nachinkubation bei 37°C (Zellkerne nicht viabler Zellen blau, TPP rot).

Die mikroskopische Auswertung (Abb. 21) zeigt im Vergleich zu TPP (B2) mit nur einer diffusen Fluoreszenz eine deutlich stärkere Zellinteraktion des Konjugates (A2). Die

punktueller Verteilung der Fluoreszenz des Konjugates kann auf eine Präzipitation durch Instabilität bei hoher Konzentration im Versuchsmedium hinweisen. Diese möglicherweise partikuläre Verteilung des Konjugates ist auch im Durchlicht (Abb. 21-A3) ersichtlich und wurde bereits oben beobachtet (Abb. 20-B). Jedoch weist die deutlich sichtbare Fluoreszenz des Konjugates auf eine gezielte Interaktion mit der Zelloberfläche im Vergleich zu TPP hin. Die Färbung der Zellkerne mit DAPI zeigt eine zytotoxische Wirkung sowohl des TPP (B1) als auch des Konjugates (A1), wobei diese durch die erhöhte Zellinteraktion des Konjugates intensiver ausfällt.

Um eine Abhängigkeit der Zellinteraktion von der Konzentration der Liganden zu untersuchen, werden im folgenden Versuch die Caco-2 Monolayer mit 3 oder 6 μM TPP oder Konjugat A 30 Minuten bei 4°C beladen, mit 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 gewaschen und 30 Minuten bei 37°C nachinkubiert. Anschließend wird die durch TPP verursachte, zellassozierte Fluoreszenz nach Anregung bei 530-585 nm bei 615 nm detektiert.

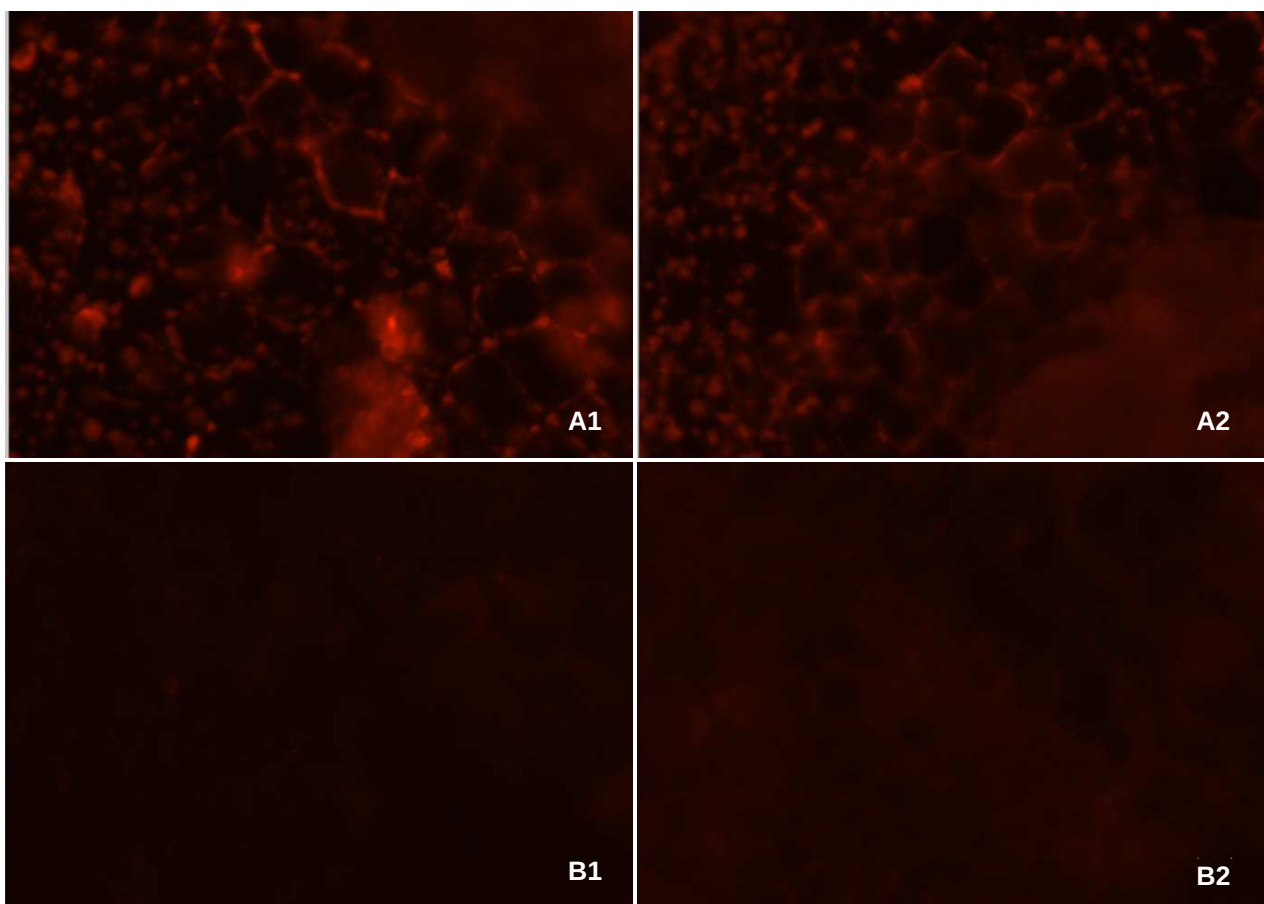


Abb. 22: Caco-2 Monolayer nach Beladung mit 3 μM (1) bzw. 6 μM (2) TPP (B) oder Konjugat A (A) und 30 Min. Inkubation bei 37°C (TPP – rot).

Während das Konjugat A bereits in 3 μM -Lösung eine deutliche Interaktion mit den Monolayern zeigt (Abb. 23-A1), ist beim Photosensitizer (Abb. 23-B2) erst ab einer Konzentration von 6 μM eine schwache Interaktion erkennbar.

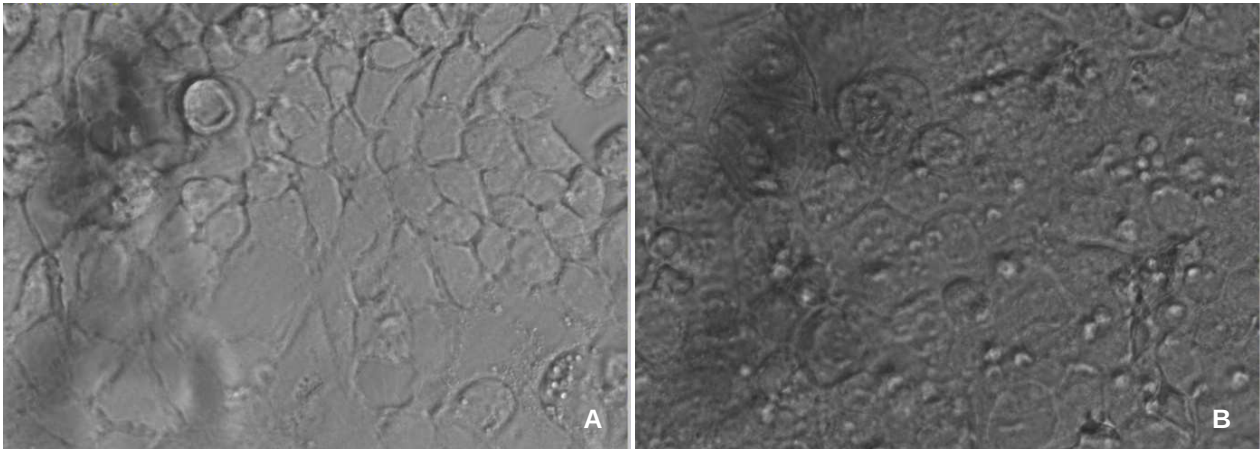


Abb. 23: Caco-2 Monolayer nach 30 Min. Inkubation bei 37°C mit Mikroskopischer Vergleich von 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 (A) und PEI im gleichen Puffer.

In Analogie zur Inkubation bei 4°C wird auch der Effekt von 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 und PEI auf Caco-2 Monolayer bei 37°C untersucht. Wie bereits bei 4°C beobachtet (Abb. 21) treten bei Inkubation mit PEI partikuläre Strukturen auf, die am Monolayer haften. Ob diese durch Instabilität von PEI im Puffer bedingt sind und die zytotoxische Wirkung des Konjugates beeinflussen, muss in weiteren Studien geklärt werden.

Insgesamt zeigen die mikroskopischen Studien, dass sowohl der Photosensitizer allein als auch das Konjugat bei minimaler metabolischer Aktivität der artifiziellen humanen Dünndarmgewebe an die Zellen binden, wobei die Intensität der Bindung des Konjugates wesentlich höher ist als jene von TPP. Versuche bei 37°C bei optimaler metabolischer Aktivität der Monolayer zeigen eine etwa doppelt so hohe Zellinteraktionsrate im Vergleich zu TPP allein. Nach Bestrahlung mit Weißlicht zur Aktivierung des Photosensitizers ist die Zytotoxizität des Konjugates deutlich höher als von TPP allein wie durch die Färbung der Kerne nicht viabler Zellen mit DAPI nachgewiesen wird. Inwieweit die mögliche zytotoxische Wirkung von PEI zur unspezifischen Zytotoxizität des Konjugates beiträgt oder auch die Aufnahme des gekoppelten Photosensitizers in die Zelle begünstigt, wird Gegenstand weiterführender Arbeiten sein.

6 Zusammenfassung

Die Therapie mit Photosensitizern stellt eine nebenwirkungsarme Alternative zu den herkömmlichen Behandlungen von vielen Hauterkrankungen und oberflächlichen Tumoren dar. Jedoch ist die Anwendung wegen der für die praktische Handhabung nachteiligen Eigenschaften wie geringer Löslichkeit der Wirkstoffe limitiert. Um diese lipophilen Photosensitizer in Zukunft in der Praxis einsetzen zu können, bestand das Ziel dieser Diplomarbeit darin, eine Methode zu entwickeln, die Hydrophilie hochpotenter Porphyrine ohne Wirkungsverlust zu erhöhen.

Als hydrophiles Trägermolekül für den lipophilen Photosensitizer 5-(4-Carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-21, 23H-porphyrin (TPP) wurde Polyethylenimin (PEI) eingesetzt, das durch seine Vielzahl an primären, aber auch sekundären Aminogruppen hohe Wasserlöslichkeit besitzt. Zur Synthese eines Konjugates sollte die Carboxylgruppe von TPP mit Hilfe von Carbodiimid mit primären Aminogruppen von PEI unter Ausbildung einer stabilen Amidbindung kovalent verknüpft werden.

Eine effiziente Aktivierung von TPP mit N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid war nur in organischen Lösungsmitteln möglich, was durch dünnschichtchromatographischen Nachweis des TPP-Aktivesters bestätigt wurde. Ein Katalysator war, wie in der Literatur beschrieben, dazu nicht nötig. Die Optimierung der Kopplungsmethode als auch die Reinigung des Konjugates wurde durch Dünnschichtchromatographie dokumentiert. Das wasserlösliche TPP-PEI Konjugat konnte in fester Form durch Ausschütteln der organischen Phase mit Wasser Aqua dest. erschöpfende Dialyse und anschließender Lyophilisation dargestellt werden.

Die Variation der molaren Ansatzverhältnisse von TPP und PEI ergab, dass ein Konjugat mit höchstem Substitutionsgrad bei gleichzeitigem Erhalt der Wasserlöslichkeit bei einem Ansatzverhältnis von 1:6 (PEI:TPP) entsteht und durch eine Belegungsrate von 1,8 Mol TPP/Mol PEI charakterisiert ist. Qualitative Hinweise auf eine kovalente Bindung von TPP an PEI ergab die FTIR-Spektroskopie durch die Detektion von Amidschwingungen im Konjugat.

Da neben der kovalenten Bindung auch eine ionische Bindung zwischen dem Carboxylat-hältigen Photosensitizer und dem Amin-hältigen makromolekularen Träger möglich sein sollte, wurde im gleichen molaren Ansatzverhältnis ein ionischer Komplex ohne Aktivesterbildung hergestellt, der als Polyelektrolytkomplex (PEK) bezeichnet wird. Durch

vergleichende Untersuchungen sollte der Einfluss ionischer TPP-Bindung im kovalenten Konjugat evaluiert werden.

Um die Stabilität beider Produkte, Konjugat und PEK, zu untersuchen wurden einerseits Löslichkeitsversuche durchgeführt. Diese Verdünnungsversuche zeigten deutlich, dass die ionischen Wechselwirkungen des PEK durch Elektrolyt-Zusatz aufgehoben werden und der PEK wieder in seine Einzelkomponenten zerfällt. Das Konjugat hingegen war in allen untersuchten artifiziellen physiologischen Flüssigkeiten stabil. Andererseits bewirkte Harnstoff als Chaotrop, demgegenüber nur kovalente Bindungen stabil sind, auch beim Konjugat eine deutliche Abnahme des PEI-gebundenen TPP-Anteiles.

Während die Bestimmung der biologischen Aktivität durch den Singulett Oxygen Sensor Green-Test widersprüchliche Ergebnisse ergab, vorwiegend bedingt durch die scheinbar hohe Reaktivität des Reagens mit den eingesetzten Lösungsmitteln, ermöglichte die Evaluierung der Konjugat-Zellinteraktion durch (Fluoreszenz)-Mikroskopie qualitative Schlüsse. Dazu wurden Caco-2 Monolayer als humanes artifizielles Dünndarmepithel eingesetzt. Sowohl Konjugat als auch TPP assoziieren mit den Geweben, wobei die Interaktion mit dem Konjugat etwa doppelt so hoch ist. Ebenso ist die Zytotoxizität des Konjugates nach Aktivierung durch Licht doppelt so hoch wie jene des Wirkstoffes. Hinsichtlich der biologischen Aktivität, insbesondere im Hinblick auf einen möglichen unspezifischen additiven toxischen Effekt des Trägermoleküls sind jedoch weitere Untersuchungen für eine klare Beurteilung notwendig.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit erstmals ein wasserlösliches, biologisch aktives Photosensitizer-Polyethylenimin Konjugat synthetisiert, gereinigt und in fester Form dargestellt werden. Verdünnungsversuche bestätigten die Stabilität des Konjugates in physiologischen Flüssigkeiten und in-vitro Interaktionsstudien mit humanen Dünndarmepithelien ergaben erste fundierte Hinweise auf die zytotoxische Aktivität des TPP-PEI - Konjugates.

7 Summary

Photodynamic therapy using photosensitizers emerges as a beneficial alternative to conventional therapies of skin diseases and several tumors. However, the practical applicability of photosensitizers is limited due to their high lipophilicity and hence disadvantageous characteristics for use in clinical practice.

To meet this challenge, the aim of this diploma thesis was the development of a hydrophilic photosensitizer conjugate. At this, the lipophilic photosensitizer 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-21,23H-porphyrin (TPP) was covalently coupled with polyethyleneimine (PEI) by carbodiimide in two steps. First, the carboxylate group of TPP was activated with N,N'-dicyclohexylcarbodiimide yielding the active-ester derivate in organic solvent. Second, the reactive intermediate was linked to amino groups of PEI to form amid bounds. The hydrophilic conjugate was isolated and purified by extraction with water, exhaustive dialysis and freeze drying. The highest degree of substitution amounting to 1.86 TPP/PEI (mol/mol) and a still water-soluble conjugate was obtained at an initial molar ration of 1:6 (PEI:TPP). Additionally, covalent coupling was confirmed by FTIR due to presence of amide vibrations in the conjugate. To elucidate contribution of ionic interactions to formation of the conjugate an ionic complex without pre-activation was prepared. Whereas the covalent conjugate proved to be stable in physiological fluids, the ionic complex disintegrated.

Whereas assessment of biological activity by the Singulett Oxygen Sensor Green-test yielded contradictoray results, cell interaction and cytotoxicity of the conjugate could be qualitatively confirmed by microscopy. Both, the TPP-PEI conjugate and TPP bound to artificial intestinal epithelium but the Caco-2 binding rate of the conjugate was two times higher. After activation of the photosensitizer the cytotoxicity of the conjugate was about two fold higher than that of the pure drug. In terms of the biological effect, however, there are further studies necessary to investigate possible contribution of the carrier molecule.

All in all, this work reports about the synthesis, purification and characterization of a water-soluble photosensitizer-PEI conjugate for the first time. The conjugate proved to be stable in physiological fluids and in-vitro studies with human cells layers strongly suggested cytotoxic activity of the conjugate.

Literaturverzeichnis

- [1] K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guillard. The Porphyrin Handbook Volume 6: Applications: Past, Present and Future, 2000, 43, 160-163.
- [2] Jamil, Basil. Elektronenspinresonanz-Untersuchungen zur Singulett-Sauerstoff-Generierung verschiedener Photosensibilisatoren für die Photodynamische Therapie, Dissertation, Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin, 2004.
- [3] H. Driemel. Untersuchungen zur Phototoxizität des wasserlöslichen Photosensibilisators Perinaphtenon (PNS) in Zellkulturen humaner dermaler Fibroblasten (NHDF), Inaugural-Dissertation, Universität Regensburg, 2011.
- [4] Ingrid Kaniak 2013, Diplomarbeit. Entwicklung von Photosensitizer – Konjugaten und Evaluierung im Caco – 2 Modell, Universität Wien, Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
- [5] www.triportech.com/porphyrin_ger/porphyrin1/4-carboxyphenyl-101520-triphenyl-2123h-porphyrin/index.php
- [6] <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/tetrapyrrole/>
- [7] Vorlesung W. Holzer, Instrumentelle pharmazeutische Analytik
- [8] Vorlesung M. Wirth, Zellkultur als Modelle in der pharmazeutisch-technologischen Analytik.
- [9] Singulett Oxygen Sensor Green-Special Packaging, Molecular Probes^R, life technologiesTM
- [10] Werner Müller-Esterl: Biochemie Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler, korrigierter Nachdruck 2009 der 1. Auflage 2004, 101
- [11] http://www.porphyrin-systems.de/porphyrins/porphyr_de.htm
- [12] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/408727?lang=de®ion=AT>
- [13] Manfred Hesse, Herbert Meier, Bernd Zeeh Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie 7. überarbeitete Auflage 2005, 1-24; 33-57
- [14] Michaela Olga Kubal, 2012. Diplomarbeit, Einfluss von Härte und Proteinbeschichtung auf die Adhäsion und Differenzierung von Zellen auf Polyacrylamidsubstraten; Universität Wien, Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
- [15] http://www.biologie.uni-hamburg.de/lehre/mikro/kurs2_netz/bradford.pdf

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	Aqua destillata
CH ₂ Cl ₂	Dichlormethan
CHCl ₃	Chloroform
DC	Dünnschichtchromatografie
DCC	N, N' - Dicyclohexylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
FCS	Fetales Kälberserum
HEPES	1-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
MeOH	Methanol
PBS	Phosphate buffered saline
PEI	Polyethylenimin
PS	Photosensitizer
RFI	Relative Fluoreszenzintensität
ROS.	Reaktiv oxygen species, reactive Sauerstoffspezies
SC	Säulenchromatografie
Sek	Sekunde
SOSG	Singulett Oxygen Sensor Green
TPP	5-(4-Carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-21,23H-porphyrin
UpM	Umdrehungen pro Minute

Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name: Michaela Johanna Gruber
Geburtsdatum: 17.04.1988
Staatsbürgerschaft: Österreich

Ausbildung

03/2013-10/2013 Diplomarbeit am Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
10/2007 Beginn des Pharmaziestudiums an der Universität Wien
06/2007-2002 Besuch der HBLA Pitzelstätten für Land-und Ernährungswirtschaft, Abschluss mit Matura
2002-1998 Besuch des Bundesrealgymnasiums Feldkirchen
1998-1994 Besuch der Volksschule Feldkirchen

Praktische Erfahrung

WS 2013/14 Tutor Universität Wien (Industrielle Arzneimittelherstellung)
SS 2013 Tutor Universität Wien (Anwendung von Zellkulturen in der pharmazeutischen Technologie)
SS 2013 Tutor Universität Wien (Grundpraktikum magistrale Arzneimittelherstellung)