



Nicole Hildebrandt (Autor)

Herstellung funktionalisierter Eisenoxid-Nanopartikel für die spezifische Verwendung als Kontrastmittel



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/2106>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

1 Einleitung und Zielsetzung

MRI (*magnetic resonance imaging*, Magnetresonanztomographie) ist eine Methode, mit deren Hilfe in der Medizin unterschiedliche Gewebearten nachgewiesen werden können.^[1] Dies ist besonders wichtig, da viele Krankheiten, unter anderem Krebserkrankungen, mit einer Veränderung des betroffenen Gewebes einhergehen. Bei der MRI wird das magnetische Verhalten von Protonen betrachtet, die im Gewebewasser gebunden sind. Dieses Verhalten ist von der direkten Umgebung der Wassermoleküle abhängig, so dass eine Unterscheidung zwischen Gewebewasser unterschiedlicher Körperkompartimente mittels MRI möglich ist. Ebenso ist ein Unterschied zwischen krankem und gesundem Gewebe zu erkennen. Gemessen werden dabei die Relaxationszeiten T_1 (longitudinale Relaxationszeit) und T_2 (transversale Relaxationszeit) der Protonen. Häufig werden zusätzlich Kontrastmittel eingesetzt, um die Qualität der Aufnahmen zu verbessern.^[2] Sehr erfolgreich ist dabei der Einsatz von superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln (SPIO), die die Relaxationszeit T_2 von (Wasser)-Protonen in unmittelbarer Umgebung erniedrigen.^[3]



Abb. 1: MR-Aufnahme von Blutgefäßen im Gehirn.^[1]

Eisenoxidkristalle sind superparamagnetisch, wenn sie eine bestimmte Größe nicht überschreiten.^[2] Um dies zu gewährleisten, aber auch um das Eisen an Aggregationen mit z.B. Proteinen zu hindern, werden die SPIO's mit einer Schutzhülle aus Biopolymeren umgeben. Medizinische Anwendung finden Partikel, die Dextran als Stabilisator enthalten.^[4] Durch diese Partikel ist mittels MRI eine Unterscheidung zwischen Gewebeteilen möglich, die Partikel enthalten und solchen, in denen keine SPIO's vorliegen. So lassen sich beispielsweise Krebszellen in der Leber entdecken.^[5] Solange sich die Eisenoxidpartikel noch in den Blutbahnen befinden, können auch detaillierte Aufnahmen der Blutgefäße gemacht und so z.B. Engstellen erkannt werden (Abb. 1).^[6]

Für solche Aufnahmen werden Partikel mit einer langen Bluthalbwertszeit benötigt, was bei sehr kleinen SPIO's der Fall ist (*ultrasmall superparamagnetic iron oxide*, USPIO) (5-15 nm).^[7] Je kleiner die Partikel sind, desto langsamer werden sie von den Kupferzellen in der Leber bzw. von Makrophagen in der Milz aufgenommen. Die Größe ist somit ein Faktor, über den sich eine spezifische Verteilung der Eisenoxidpartikel erreichen lässt. Eine der häufigsten Erkrankungen der Blutgefäße ist die Artherosklerose, eine Krankheit, die durch Einlagerung von Fetten in die Zellen der Gefäßwände hervorgerufen wird. Dadurch kommt es zu einer Gefäßwandverdickung, den so genannten Plaques, an denen sich zusätzlich Verkalkungen entwickeln können. Im weiteren Verlauf der Erkrankung reißt die innere Gefäßwand und der Riss bindet Blutplättchen, was zum Verschluss der Blutbahn führen kann. Mit USPIO's ist die Artherosklerose leider erst im Spätstadium erkennbar, wenn die Blutgefäße schon teilweise verstopft sind. Eine Verbesserung stellen Nanopartikel mit Dextranmethylcarboxylat als Hülle dar. Sie zeigen eine schwache aber spezifische Bindung an Thromben und Macrophagen, wie sie im Bereich der Artherosklerose vorkommen.^[8] Es können so zwei krankheitstypische Kriterien mit einem Kontrastmittel erkannt werden.

Target-spezifische Peptidsequenzen sind in der Lage, Plaques im Anfangsstadium zu erkennen und zu binden.^[9] Ein solches Oligomer ist Ile-Glu-Leu-Leu-Gln-Ala-Arg (IELLQAR) (**1**), das eine Affinität gegenüber Rezeptoren in den Zellen der Blutgefäßwände aufweist,^[10] die nur bei beschädigten Endothelzellen exprimiert werden. Eine Verknüpfung von USPIO's mit **1** könnte eine Aufnahme dieser in die

aktivierten Zellen von Plaqueablagerungen bewirken. Die Partikel würden so aus der Blutbahn in die Plaquematrix gelangen. Dort würden sie im Magnetfeld eine Verringerung des T_2 -Signals der Wasserprotonen bewirken, so dass die Plaquebereiche von den gesunden Gefäßwänden zu unterscheiden wären.

Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, mit Dextran umhüllte superparamagnetische Nanopartikel soweit zu modifizieren, dass sie target-spezifischer reagieren. Dabei sollte zum einen Dextran und somit SPIO's derivatisiert werden, aber auch nichtkovalente Verknüpfungsmöglichkeiten über elektrostatische Wechselwirkungen in Betracht gezogen werden. Durch die Verknüpfung eines Nanopartikels mit unterschiedlichen Peptidsequenzen oder Funktionalitäten könnten mit einem Kontrastmittel verschiedene Aspekte einer Krankheit untersucht werden. Dies könnte durch Zelltests *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden.

Erkennung über nicht kovalente Wechselwirkungen spielt auch beim Informationsaustausch zwischen Nukleinsäuren eine große Rolle. Die vielen verschiedenen Krankheiten, die durch genetische Fehlbildung hervorgerufen werden, wie Krebs, Mukoviszidose oder α_1 -Antitrypsinmangel, zeigen, dass die korrekte Übertragung der Erbinformation von Generation zu Generation sehr wichtig ist.^[11] Diese Information ist in der DNA gespeichert und wird von nur vier Nucleobasen, Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin codiert, deren Nucleoside über die 3'- und 5'-Position als Phosphordiester zu einem Polymer verknüpft sind.^[12,13,14]

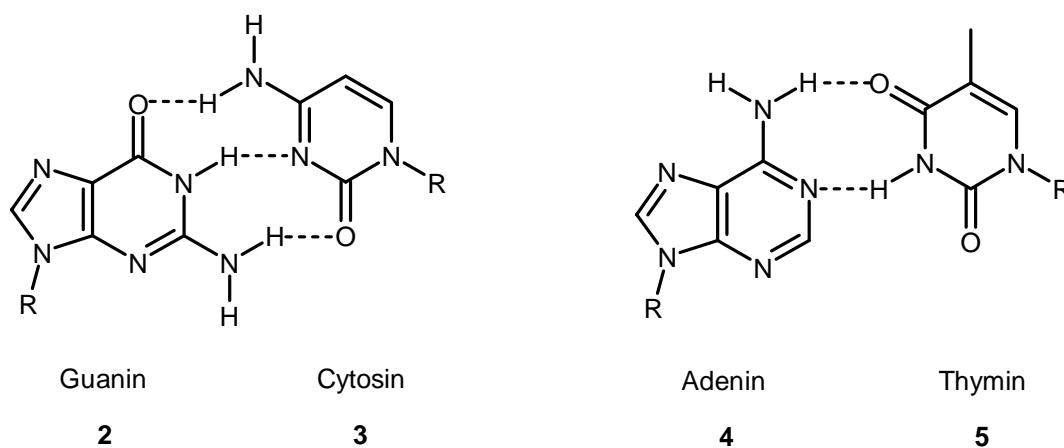


Abb. 2: Basenpaarung zwischen Guanin-Cytosin und Adenin-Thymin nach dem Watson-Crick Modus.

Um die Information bei der Replikation der DNA nicht zu verlieren, muss sich die Nucleobasenabfolge genau übertragen lassen. Das Ablesen erfolgt unter anderem mittels molekularer Erkennung durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Nucleobasen. Komplementäre Basenpaare bilden sich in DNA aus topologischen Gründen nach Watson-Crick zwischen Guanin (2) und Cytosin (3), sowie Adenin (4) und Thymin (5) (Abb. 2). Ein DNA-Strang repliziert somit sein komplementäres Gegenstück und dieses wiederum eine Kopie des Originalstranges.

Um die Erbinformation in die entsprechenden Proteine zu übersetzen, wird die Basenabfolge der DNA im Zellkern zunächst auf mRNA-Moleküle übertragen. Diese codieren dann an den Ribosomen die Abfolge der Aminosäuren im Endprotein.^[15] Durch eine Fehlstelle in der DNA oder der RNA kann ein völlig falsches und im Falle eines Enzymes auch ein nicht-funktionsfähiges Protein gebildet werden.

RNA-Moleküle codieren nicht nur Information, sondern sind auch bei Transportvorgängen (Transfer-RNA) in den Zellen, sowie katalytischen Prozessen an den Ribosomen wirksam. Diese komplexe Wirkweise veranlasste zu der Annahme, dass RNA in der biologischen Entwicklung der Vorläufer der DNA gewesen sein könnte.^[16] Welche Moleküle der RNA vorausgegangen sein könnten, ist unklar, doch steht fest, dass sich unter präbiotischen Bedingungen Nucleotide nur schwer ausbilden.^[17,18] *L. E. Orgel* hat die Möglichkeit beschrieben, dass einfachere Moleküle, wie PNAs (Peptidnucleinsäuren) diese Aufgabe übernommen haben könnten.^[19] PNA besitzt alle zur Informationsübertragung und -sicherung wichtigen Eigenschaften, weist aber ein peptidisches Rückgrat anstelle eines Desoxyribosyl-Phosphor-diester-Rückgrats auf. Die von *P. E. Nielsen* 1991 entwickelte Aminoethylglycin-Peptidnucleinsäure ist synthetisch leicht zugänglich.^[20,21]

Da die Wechselwirkungen in der DNA sehr komplex und vielfältig sind, erscheint es sinnvoll, ein einfacheres Modellsystem zu entwickeln. Zu diesem Zweck kann neben der Aminoethylglycin-PNA auch die Alanyl-PNA dienen.^[22,23,24,25] Sie besteht aus alternierend konfigurierten Alanyl-Nucleoaminosäureeinheiten, wobei die Nucleobasen über die β -Position kovalent mit der Aminosäure Alanin verknüpft sind. Aufgrund des starren Peptidrückgrats bildet die Alanyl-PNA keine Helix, sondern einen linearen, starren, gut definierten Nucleobasenstapel aus. Dieses Modellsystem eignet sich sehr gut, um die einzelnen stabilisierenden Effekte wie van-der-Waals- und

hydrophobe Wechselwirkungen, bzw. Wasserstoffbrückenbindungen im Nucleobasenstapel getrennt voneinander zu betrachten. Dies ist in natürlichen Systemen aufgrund konformationeller Umorientierung nahezu unmöglich.^[26] Die komplizierten Zusammenhänge eines DNA-Doppelstranges werden demnach auf ein geometrisch einfacheres System reduziert. Die hohe konformationelle Rigidität der Alanyl-PNA-Stränge bewirkt allerdings auch, dass es zu keiner Wechselwirkung zwischen Alanyl-PNA und DNA kommt, da letztere eine helicale Struktur bevorzugt.^[27,28] Somit ist kein Informationsaustausch zwischen dem gut untersuchten Alanyl-PNA-System und der natürlichen DNA möglich.

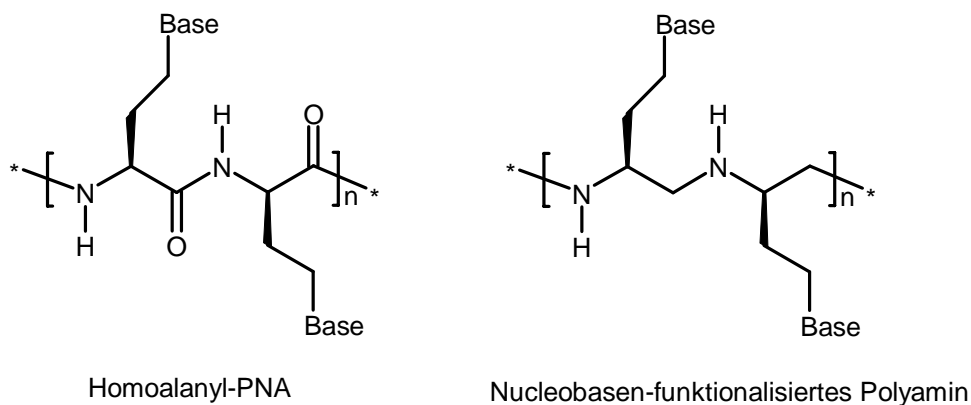


Abb. 3: Vergleich Homoalanyl-PNA und dem entsprechenden Polyamin aus reduktiver Aminierung von Aminoaldehyd-Homoalanyl-Monomeren.

In der Alanyl-PNA beträgt der Abstand zwischen Nucleobase und Rückgrat zwei Bindungen. In der DNA erstreckt sich der gleiche Abstand über drei Bindungen. Wird die Seitenkette zwischen Rückgrat und Nucleobase um eine Methyleinheit erweitert, so entsteht die Homoalanyl-PNA (Abb. 3).^[29,30] Dadurch beträgt der Abstand ebenfalls drei Bindungen. Homoalanyl-PNA weist wie die Alanyl-PNA ein Peptidrückgrat auf und ist somit gleichermaßen rigide. Würden die Amid-Bindungen durch Amin-Bindungen ersetzt, so würde das System wesentlich flexibler werden und hätte eventuell die Möglichkeit, Helices auszubilden und an DNA zu binden. Ein solches Oligomer könnte möglicherweise zum Informationsaustausch zwischen Alanyl-PNA und DNA dienen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, ein Oligomer, dessen Monomer-Verknüpfung aus Aminbindungen besteht, am Alanyl-PNA-Templat zu oligomerisieren. Amine lassen sich durch Reduktion von Iminen erhalten. Somit sollten zunächst Aminoaldehyde aus den entsprechenden Homoalanyl-Nucleoaminosäuren gebildet und anschließend oligomerisiert werden.

2 Nanopartikel – Anwendungen und Analytik

2.1 Kontrastmittel in der MRT

Bei der Diagnose von Krankheiten, wie Krebs, Leberzirrhose, Hepatitis oder Plaque-Bildung in den Blutbahnen ist in der heutigen Medizin die Verwendung von NMR-spektroskopischen Methoden (MRI, *magnetic resonance imaging*, Magnetresonanztomographie (MRT)) von großer Bedeutung.^[1] Dabei wird der Effekt eines äußeren Magnetfeldes auf die magnetischen Eigenschaften von Wasserprotonen gemessen, die sich in dem zu untersuchenden Gewebe befinden oder dieses umgeben.^[2] Die Signale der einzelnen Wassermoleküle sind stark von der Umgebung abhängig, so dass eine Unterscheidung zwischen krankem und gesundem Gewebe möglich ist. Die Vorteile dieses Untersuchungsverfahrens sind, dass die Magnetfelder keine Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit haben und dass mehrere Parameter gleichzeitig aufgenommen werden können. Dabei werden hauptsächlich die Relaxationszeiten T_1 (longitudinale Relaxationszeit) und T_2 (transversale Relaxationszeit) der Protonen gemessen. Schwierigkeiten ergeben sich bei sehr ähnlichen Signalen. In diesen Fällen kann entweder die Feldstärke des äußeren Magnetfeldes erhöht oder ein Kontrastmittel eingesetzt werden.^[2] Der erste Ansatz hätte eine Erhöhung der eingestrahlten Radiofrequenz zur Folge. Je höher die Frequenz ist, desto weniger tief dringen die Strahlen in das Gewebe ein, das heißt, die Feldstärke kann nicht beliebig erhöht werden, weswegen die Verwendung von Kontrastmitteln die bessere Lösung zu sein scheint. Diese sollten biologisch abbaubar sein aber dennoch lange genug stabil vorliegen, um ihre Aufgabe zu erfüllen. Kontrastmittel haben einen Einfluss auf die Relaxationszeiten der Protonen des Wassers. Der Effekt ist in der direkten Umgebung des Mittels stärker, so dass durch die Wahl des richtigen Kontrastmittels, das z.B. nur von gesunden Zellen inkorporiert wird, eine differenzierte Aufnahme möglich wird. Kontrastmittel benötigen magnetische Eigenschaften, um die Relaxationszeiten der Protonen des H_2O zu verändern, daher enthalten sie meistens Metallatome wie Gadolinium, Mangan und Eisen.^[31] Als Kontrastmittel wurden zunächst paramagnetische und ferromagnetische Substanzen eingesetzt.

2.1.1 Paramagnetische Kontrastmittel

Paramagnetische Substanzen besitzen ungepaarte Elektronen im High-spin-Zustand mit langen Elektronenspin-Relaxationszeiten.^[32] Sie werden durch eine geringe magnetische Suszeptibilität und ein hohes magnetisches Moment charakterisiert.^[33] Eine durch ein äußeres Feld induzierte Magnetisierung lässt schnell wieder nach, wenn dieses entfernt wird. Ihr Effekt auf Nachbarkerne beruht auf einer Erhöhung von T_1 . Ein Beispiel sind Gadolinium(III)-Komplexe. Sie binden Wasser in ihrer Koordinationssphäre, das im ständigen Austausch mit Körperwasser steht.^[33] So wird die Relaxation (T_1 und T_2) der Wasserprotonen erhöht und damit auch der Kontrast in der MRI-Aufnahme. Am idealsten wäre daher $[\text{Gd}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})_8]^{3+}$, doch dieses Ion ist unter physiologischen Bedingungen unlöslich und zudem stark toxisch. Durch die Einführung von Chelat-Liganden wird die Toxizität kontrollierbar. Eines der ersten Beispiele war ein Chelatkomplex von Gd mit DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure) (**6**) (Abb. 4).^[34] Neben **6** sind noch drei weitere Gadolinium-Komplexe aus DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-*N-N'-N''-N'''*-tetraacetat) (**7**), DTPA-BMA (Diethylentriaminpentaessigsäure-bimethylamid) (**8**) und HP-DOTA (*N*-2-Hydroxypropyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-*N'-N''-N'''*-triacetat) (**9**) zugelassen, die medizinisch eingesetzt werden.

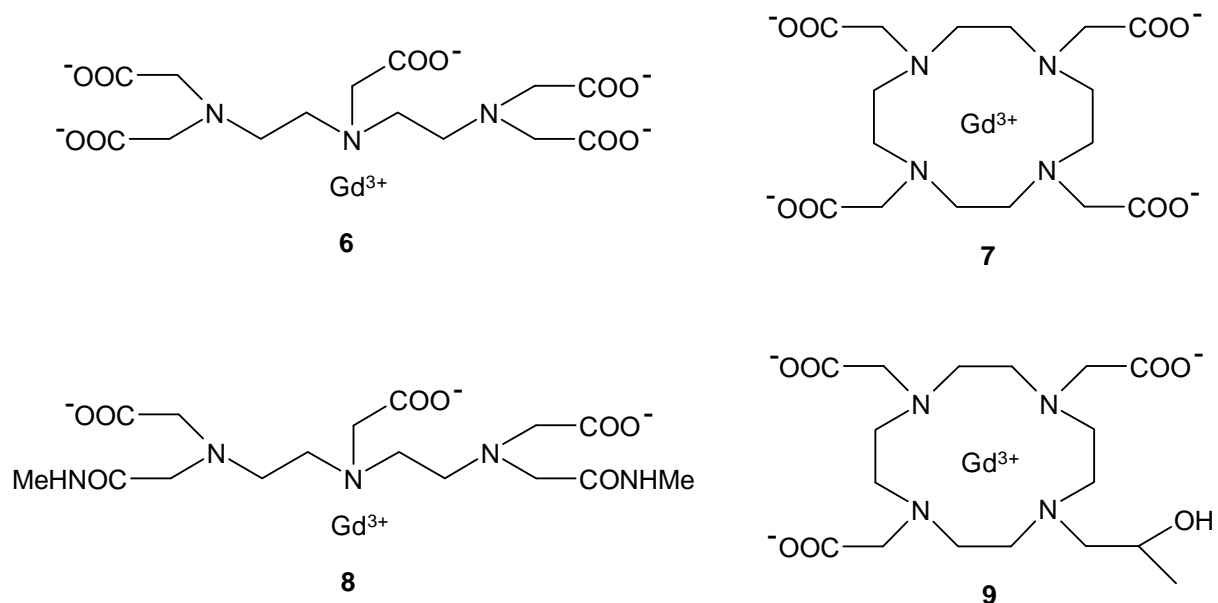


Abb. 4: Als Kontrastmittel zugelassene Gd^{III} -Komplexe. **6** und **7** sind ionisch, während **8** und **9** neutral sind.

Alle vier sind nicht zellgängig, diffundieren aber sehr schnell in die interstitielle Gewebeflüssigkeit im extrazellulären Raum.^[31] Neben den Liganden ist auch ein Wasser-Molekül an das Gd^{III} koordiniert, welches austauschbar ist. Die Komplexe **6** und **7** weisen Salzcharakter auf und wirken daher im Körper osmotisch.^[31] Dies kann zu unerwünschten Nebenwirkungen führen, so dass die neutralen Kontrastmittel **8** und **9** bevorzugt werden. Die Stabilität der Komplexe ist unterschiedlich und pH-abhängig. Dies ist für einzelne Körper-Kompartimente von Bedeutung, so kann in Lysosomen der pH-Wert auf $pH = 5$ sinken. Desweiteren beeinflusst auch die Elimination der Kontrastmittel aus dem biologischen System ihre Verwendung. Der DTPA-Komplex (**6**), der hauptsächlich über die Niere ausgeschieden wird, kann durch eine einfache strukturelle Änderung eine gänzlich andere Eliminierung nach sich ziehen. Werden z.B. an den C_{α} -Atomen der Acetatreste Benzyloxymethylsubstituenten eingeführt, so dringt der Komplex in Leberzellen ein und wird mit der Gallenflüssigkeit ausgeschieden.^[35] Im ersten Fall lassen sich mit dem Komplex **6** kontrastreiche Aufnahmen der Niere, mit Derivatisierung Aufnahmen der Leber machen. Für eine Kontrasterhöhung innerhalb der Leber eignen sich auch paramagnetische Mangankomplexe, wie Teslascan (**10**), ein oktaedrisch verzerrter Mn^{II} -Komplex (Abb. 5).^[36] Er enthält kein direkt koordiniertes H_2O und weist daher ein geringeres Relaxationsvermögen auf als die Gadolinium-Komplexe.^[37]

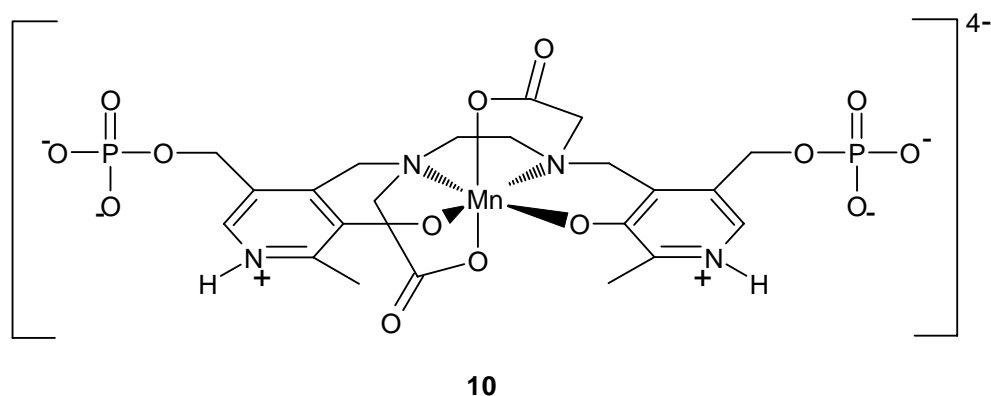


Abb. 5: Teslascan (**10**) ist das Trinatriumsalz.

Alle bisher beschriebenen Verbindungen haben den Nachteil, dass sie aufgrund ihrer geringen Größe nach Injektion in den extravaskulären Raum diffundieren und deshalb