

**Darstellung von peptidbasierten, rezeptorspezifischen
Kontrastmitteln für die Magnetresonanztomographie und
Evaluation ihrer Rezeptorspezifität im Zellversuch**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

André Milz

aus Rostock

Marburg / Lahn 2007

Vom Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 16.04.2007 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. H. Jungclas

Zweitgutachter: Prof. Dr. W. Ensinger

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2007

Vorwort

Die thematischen Unterschiede der in dieser Arbeit behandelten Fragestellungen erfordern eine Zweiteilung der Arbeit. Der erste Teil der Arbeit hat die Synthese von rezeptorspezifischen, peptidbasierten Kontrastmitteln für die Magnetresonanztomographie und die Evaluation ihrer Rezeptorspezifität im Zellversuch zum Thema. Der zweite Teil dieser Arbeit handelt von der Sichtbarmachung des Gentransferreagenzes Polyethylenimin für die radiologischen Bildgebungsverfahren MRT und SPECT.

Bei den peptidbasierten, rezeptorspezifischen Kontrastmitteln für die Magnetresonanztomographie erfolgt die Bildbeeinflussung auf unterschiedlichen Wegen. Zum einen wird die Bildbeeinflussung durch ein Gadolinium(III)-chelat und zum anderen durch einen superparamagnetischen Eisenoxidpartikel bewirkt. Aufgrund der unterschiedlichen Bildbeeinflussungsarten wurde der erste Teil der Arbeit in zwei Abschnitte gegliedert.

Zunächst werden im ersten Abschnitt die physikalischen Grundlagen der Magnetresonanztomographie genauer vorgestellt. Nachdem der Aufbau eines Magnetresonanztomographen beschrieben und die Vorgänge bei der Bilderzeugung in diesem erörtert sind, werden die verschiedenen bei der Magnetresonanztomographie zur Anwendung kommenden Kontrastmittel näher betrachtet. Im daran anschließenden Kapitel zur Motivation der Arbeit werden die Gründe für eine Entwicklung von rezeptorspezifischen Kontrastmitteln für die Magnetresonanztomographie und die Anforderungen an diese, gefolgt von der Synthesepaltung vorgestellt. Vor der Beschreibung der Synthesen der verschiedenen Gastrin-DTPA-Derivate wird dann zum besseren Verständnis ein Kapitel zur Festphasenpeptidsynthese eingeschoben. Nach der Rohproduktreinigung und den Analysen der synthetisierten Kontrastmittel werden diese in Zellversuchen hinsichtlich ihrer spezifischen Bindung an den Gastrinrezeptor untersucht. Als Abschluss des ersten Abschnitts der Arbeit werden die Ergebnisse vorgestellt und zusammengefasst.

Der zweite Abschnitt über die Synthese eines rezeptorspezifischen, peptidbasierten Kontrastmittels für die Magnetresonanztomographie mit superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln als bildbeeinflussender Komponente beginnt mit einem allgemeinen Kapitel über superparamagnetische Eisenoxidpartikel, in dem die Terminologie, der Partikelbau und die

Partikeleigenschaften von superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln, sowie die typischen applizierten Dosen und ihr Bioabbau vorgestellt werden. Anschließend werden die Arten der Bildbeeinflussung im MRT durch diese Partikel vorgestellt. Nach einem kurzen Kapitel über die verwendeten superparamagnetischen Eisenoxidpartikel AMI-25 wird der Syntheseplan erläutert. Im Experimentellen Teil dieses Abschnitts werden die einzelnen Syntheseschritte und die Bindungsversuche mit CCK/2-Zellen genauer beschrieben. Den Abschluss dieses Abschnitts bilden die Zusammenfassung und die Vorstellung der Ergebnisse.

Der zweite Teil der Arbeit, über die Sichtbarmachung des Gentransferreagenzes Polyethylenimmins (PEI) für die radiologischen Bildgebungsverfahren SPECT und PET, beginnt mit der Vorstellung der Gentherapie. Im Anschluss werden die Ziele dieses Teils der Arbeit erläutert und die Chemie des Gentransferreagenzes Polyethylenimin näher betrachtet. Der folgende experimentelle Teil beginnt mit allgemeinen Betrachtungen zur Synthese der PEI-DTPA-Derivate und wird mit der Beschreibung der Synthese dieser fortgesetzt. Die UV/Vis-Analysen, die radioaktiven Probemarkierungen und die Ermittlung der maximalen Indium(III)-Aufnahme der PEI-DTPA-Derivate werden im Kapitel Analysen des Experimentellen Teils beschrieben. Den Abschluss des zweiten Teils der Arbeit bildet die Vorstellung der Ergebnisse und eine Zusammenfassung.

Auf den ersten Blick bestehen zwischen den Teilen der Arbeit keine thematischen Gemeinsamkeiten. Betrachtet man die Themen jedoch genauer, sind viele Gemeinsamkeiten zu erkennen. So wird sowohl bei der Sichtbarmachung des Polyethylenimmins für radiologische Bildgebungsverfahren als auch bei der Synthese des rezeptorspezifischen, peptidbasierten Kontrastmittels für die Magnetresonanztomographie auf die Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) als Chelator für die bilderzeugenden bzw. bildbeeinflussenden Metallionen zurückgegriffen. Bei Beiden wird der Chelator durch die gleiche chemische Reaktion an das Peptid beziehungsweise an das Gentransferreagenz angeknüpft.

Die Verwendung des radioaktiven Isotops Indium-111 bei den analytischen Untersuchungen stellt eine weitere Gemeinsamkeit aller Teile der Arbeit dar. Nach der Anknüpfung des Chelators an das Polyethylenimin wird seine maximale Indiumaufnahme durch Komplexbildung mit radioaktiv (^{111}In) getracertem Indium(III)-chlorid, anschließende chromatographische Trennung und betaspektrometrische Messung ermittelt. Zur Überprüfung der

Rezeptorspezifität der synthetisierten Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie werden die Kontrastmittel für die Zellversuche und die Bindungsstudien mit Indium-111 radioaktiv markiert.

Die größte Gemeinsamkeit der verschiedenen Teile dieser Arbeit besteht ohne Frage in deren Ziel, sowohl die Kontrastmittel als auch das Gentransferreagenz für die Magnetresonanztomographie sichtbar zu machen. Beim Gentransferreagenz Polyethylenimin erfolgt dieses nach der Anknüpfung des Chelators DTPA durch Markierung mit dem paramagnetischen dreiwertigen Metallion Gadolinium (Gd^{3+}). Der gleiche Weg wird beim ersten peptidbasierten, rezeptorspezifischen Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie beschrieben. Auch hier wird das Peptid (Minigastrin) mit dem Chelator DTPA versehen und anschließend mit Gadolinium(III) (Gd^{3+}) markiert. Beim zweiten Kontrastmittel wird die Sichtbarkeit im MRT durch die Anknüpfung eines superparamagnetischen Eisenoxidpartikels erreicht.

Teil Ia

1	Einleitung	1
1.1	MRT - Physikalische Grundlagen	3
1.1.1	Theorie der Kernresonanz	3
1.1.2	Energieniveaus im magnetischen Feld	4
1.1.3	Spinverteilung auf die magnetischen Quantenzustände	5
1.1.4	Verhalten des Atomkerns im Magnetfeld	6
1.1.5	Die NMR Absorption	7
1.1.6	NMR Relaxationsprozesse	8
1.1.6.1	Spin-Gitter-Relaxation	9
1.1.6.2	Spin-Spin-Relaxation	9
1.1.7	Impulsanregung	10
1.2	MRT - Aufbau und Bilderzeugung	14
1.3	MRT - Kontrastmittel	15
1.3.1	Unterscheidung der MRT-Kontrastmittel	15
1.3.2	Magnetische Eigenschaften der MRT - Kontrastmittel	16
1.3.2.1	Paramagnetische Kontrastmittel	16
1.3.2.2	Superparamagnetische Kontrastmittel	16
1.3.3	Bioverteilung der MRT-Kontrastmittel	17
1.3.3.1	Extrazelluläre Flüssigkeitskontrastmittel	17
1.3.3.2	Blut-Pool-Kontrastmittel	17
1.3.3.3	Organ-/Gewebespezifische Kontrastmittel	18
1.3.4	Grundprinzipien der MRT-Kontrastmittel	18
1.3.4.1	Inner- und Outer-Sphere Relaxation	18
1.3.4.2	Suszeptibilitäts induzierte Relaxation	19
1.4	Motivation der Arbeit	21
1.4.1	Warum rezeptorspezifische MRT-Kontrastmittel?	21
1.4.2	Anforderungen an das rezeptorspezifische MRT-Kontrastmittel	22
1.4.3	Syntheseplanung	24
1.5	Festphasenpeptidsynthese, SPPS	27
1.5.1	Allgemeine Standardvorgehensweise SPPS	29
1.5.1.1	Kupplung	29
1.5.2	Lösungsmittel	31
1.5.3	Reaktionskontrolle	32

Teil Ib

2	Experimenteller Teil	34
2.1	Synthese der Gastrin-DTPA-Derivate	34
2.1.1	Synthese Ast-1 (Gastrin-Lys-DTPA ₂)	35
2.1.2	Synthese Ast-2 (Gastrin-Lys-(Lys-DTPA ₂) ₂)	37
2.1.3	Synthese Ast-3 (Gastrin-Lys ₇ -DTPA ₈)	39
2.1.4	Synthese Ast-4 (Gastrin-Lys ₁₅ -DTPA ₁₆)	42
2.1.5	Synthese Ast-1 (Gastrin-Lys-DTPA ₂ , 50 mg Harz)	45
2.1.6	Synthese Ast-2 (Gastrin-Lys ₃ -DTPA ₄ , 50 mg Harz)	46
2.2	HPLC-Analyse der Rohprodukte	48
2.3	HPLC-Reinigung	48
2.3.1	HPLC-Analysen der Aufreinigung	50
2.3.2	Konzentrationsbestimmung	51
2.3.3	HPLC-Analyse der radioaktiv markierten Gastrin-DTPA-Derivate	53

2.4 Bindungsstudien	55
2.4.1 Bindungsstudie mit AR42J-Zellen	55
2.4.1.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift AR42J-Zellen	55
2.4.2 Ergebnisse der Bindungsstudie mit AR42J-Zellen	57
2.4.3 Bindungsstudie CCK/2-Zellen	60
2.4.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift CCK/2-Zellen	61
2.4.4 Ergebnisse der Bindungsstudie mit CCK/2-Zellen	63
3 Ergebnisse und Zusammenfassung	67

Teil II

4 Einleitung	70
4.1 Partikelarten und -eigenschaften	71
4.1.1 Terminologie	71
4.1.2 Partikel Aufbau und -eigenschaften	71
4.1.3 Dosis und Bioabbau	74
4.2 Bildbeeinflussung, relaxationsverstärkende Eigenschaften	74
4.3 Motivation der Arbeit	76
4.3.1 AMI-25	76
4.3.2 Syntheseplanung	76
5 Experimenteller Teil	78
5.1 Berechnung der Partikelkonzentration pro mL Endorem®	78
5.2 Darstellung des Gastrinisoithiocyanats	79
5.3 Aminierung des AMI-25	80
5.4 Darstellung des Gastrin-AMI-25	81
5.5 Bindungsversuch mit CCK/2-Zellen	81
6 Ergebnisse und Zusammenfassung	84
7 Einleitung	86
7.1 Gentherapie	86
7.2 Ziel der Arbeit	89
7.3 PEI Chemie	90
8 Experimenteller Teil	92
8.1 Allgemeine Betrachtungen zur Synthese der PEI-DTPA-Derivate	92
8.2 Synthese der PEI-DTPA-Derivate	93
8.3 Analysen	94
8.3.1 UV/Vis-Analyse (Reaktionskontrolle)	94
8.3.2 Radioaktive Probemarkierung (Reaktionskontrolle)	95
8.3.3 UV/Vis-Analyse	96
8.3.4 Ermittlung der maximalen Indium(III)-Aufnahme	99
9 Ergebnisse und Zusammenfassung	105

Anhang

10 Abkürzungen	107
11 Chemikalien	110
12 Literatur	113

Synthese eines peptidbasierten, rezeptorspezifischen
Kontrastmittels für die Magnetresonanztomographie

Teil Ia

1 Einleitung

Die Magnetresonanztomographie (MRT) hat sich in den letzten Jahren zu einem enorm leistungsstarken Bildgebungsverfahren für die medizinische Diagnostik und die biomedizinische Forschung entwickelt. Ursprünglich für die anatomische Bildgebung entwickelt ist die Magnetresonanztomographie heute in der Lage zusätzlich auch Informationen über den physiochemischen Zustand von Geweben und die Funktion von Organen zu liefern. Die exzellente Bildqualität der Magnetresonanztomographie führte in den Anfangsjahren in der medizinischen Bildgebung zu der Ansicht, dass eine Verwendung von Kontrastmitteln, wie sie in der etwa zeitgleich eingeführten Computertomographie (CT) zur Anwendung kommen, nicht nötig sei [1, Merbach] [2, Krause].

Die fortschreitende Verbreitung der Magnetresonanztomographie führte schließlich doch zur Einführung von Kontrastmitteln, die den Patienten mit der Zielsetzung verabreicht werden, den Kontrast zwischen „normalem“, gesundem Gewebe und pathologischem Gewebe zu erhöhen, den Blutfluss abzubilden oder Organfunktionen zu überprüfen. Heute sind Kontrastmittel bei der Magnetresonanztomographie weitverbreitet und werden für etwa 30% aller MRT-Untersuchungen genutzt.

Das erste und lange Zeit einzige zur Verfügung stehende MRT-Kontrastmittel war ein Gadolinium-Chelat, das Gd^{3+} -DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure). Dieser Kontrastmittelklassiker, der sich in der extrazellulären Flüssigkeit verteilt und über die Nieren ausgeschieden wird, fand so weit verbreitete Verwendung, dass „Gadolinium“ zum Synonym für MRT-Kontrastmittel wurde. Die Entwicklung der MRT-Kontrastmittel schreitet stetig voran: sie begann mit dem ionischen DTPA, führte über nichtionische Verbindungen, von den offenkettigen Chelatoren zu makrozyklischen Substanzen.

Nachdem sich die Kontrastmittel als wichtige Hilfsmittel für die statische Bildgebung durchgesetzt hatten, stellte sich heraus, dass sie auch für die Untersuchung von funktionellen Zusammenhängen, wie zum Beispiel der Funktion des Gefäßsystems oder des Herzens, geeignet sind. Die Chemie und das Design neuer gewebe- und organspezifischer Kontrastmittel und ihre Anwendungen ist ein äußerst aktives und aktuelles Gebiet der Forschung und wird in den folgenden Jahren zu einem noch umfassenderen Einsatz von Kontrastmitteln in der Magnetresonanztomographie führen.

Im folgenden Kapitel werden die physikalischen Grundlagen der Magnetresonanztomographie vorgestellt. Hierbei wird sowohl auf die Theorie der Kernresonanz und die Relaxationsprozesse als auch auf den allgemeinen Aufbau eines MRT-Scanners und die Bilderzeugung eingegangen. Anschließend folgt ein Kapitel über MRT-Kontrastmittel.

1.1 MRT - Physikalische Grundlagen

1924 wurde von W. Pauli eine Theorie vorgestellt, in der er vorschlug, dass bestimmte Atomkerne einen Spin und ein magnetisches Moment besitzen. Die Eigenschaften würden, wenn man diese Atomkerne einem magnetischen Feld aussetzt, zur Aufspaltung in verschiedene Energieniveaus führen.

1946 gelang Bloch (Stanford) und Purcell (Harvard) unabhängig voneinander der Beweis, dass Atomkerne in einem starken Magnetfeld ihre Energieniveaus aufspalten, und dass in Folge der Aufspaltung ihrer Energieniveaus elektromagnetische Strahlung absorbiert werden kann. Sie erhielten für ihre Arbeit 1952 gemeinsam den Nobelpreis.

1.1.1 Theorie der Kernresonanz

Atomkerne rotieren um ihre eigene Achse und haben daher einen Spin. Diese rotierenden Kerne besitzen einen Drehimpuls p , welcher gequantelt ist und nur ein halb- oder ganzzahliges Vielfaches von $h/2\pi$ annehmen kann (h - Planck-Konstante). Die maximale Anzahl der Spinkomponenten, der Werte für den Drehimpuls, ist abhängig von der Spinquantenzahl I des Kerns. Es gibt $(2I+1)$ diskrete Zustände mit den Werten $I, I-1, I-2, \dots, -I$. Ohne ein äußeres Magnetfeld sind alle diese Zustände energiegleich. Der für die Magnetresonanztomographie entscheidende Wasserstoffkern ^1H , das Proton, hat eine Spinquantenzahl von $\frac{1}{2}$ und demzufolge die Spinzustände $I = +\frac{1}{2}$ und $I = -\frac{1}{2}$ [3, Skoog].

Aufgrund seiner Ladung erzeugt ein rotierender Kern ein magnetisches Feld. Sein magnetisches Moment μ orientiert sich entlang der Drehachse und ist proportional zum Drehimpuls p . Es gilt:

$$\mu = \gamma \cdot p$$

Wobei die Proportionalitätskonstante γ , das gyromagnetische Verhältnis, von Kernart zu Kernart verschieden ist. Die Beziehung zwischen dem Kernspin und dem magnetischen Moment führt zu den folgenden beobachtbaren, magnetischen Quantenzuständen m :

$$m = I, I-1, I-2, \dots, -I$$

Das Proton (^1H) besitzt zwei magnetischen Quantenzustände $m = +\frac{1}{2}$ und $m = -\frac{1}{2}$.

1.1.2 Energieniveaus im magnetischen Feld

Das magnetische Moment m eines Kerns mit der Spinquantenzahl $\frac{1}{2}$ richtet sich in einem äußeren Magnetfeld mit der Flussdichte B [T] parallel oder antiparallel zu diesem aus (siehe Abbildung 1). Für die potentielle Energie dieser Orientierungen gilt:

$$E = -m \cdot \mu \cdot B_0$$

$$E = -\frac{m \cdot \gamma \cdot h}{2 \cdot \pi} B_0$$

Für die energieärmere parallele Orientierung gilt:

$$E_{+\frac{1}{2}} = -\frac{\gamma \cdot h}{4 \cdot \pi} B_0$$

Für die energiereichere antiparallele Orientierung gilt:

$$E_{-\frac{1}{2}} = \frac{\gamma \cdot h}{4 \cdot \pi} B_0$$

Demzufolge gilt für den Energieunterschied (ΔE) der beiden Orientierungen:

$$\Delta E = \frac{\gamma \cdot h}{4 \cdot \pi} B_0 - \left(-\frac{\gamma \cdot h}{4 \cdot \pi} B_0 \right)$$

$$\Delta E = \frac{\gamma \cdot h}{2 \cdot \pi} B_0$$

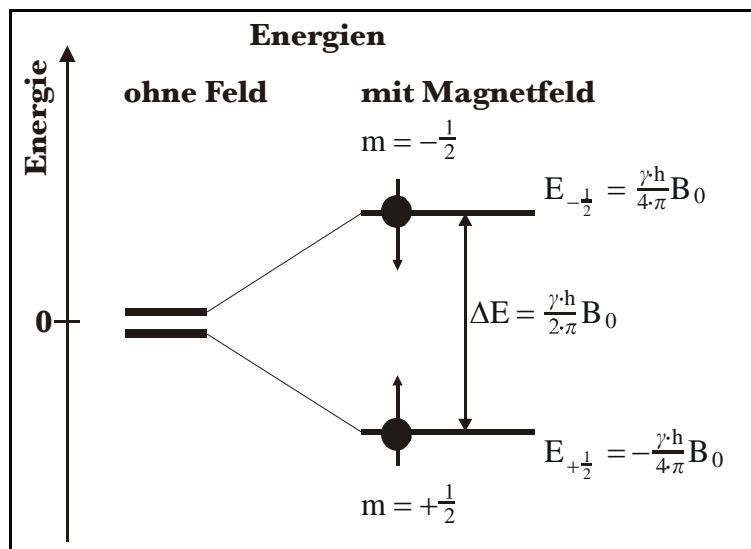


Abbildung 1: Energieniveaus eines Atomkerns mit einer Spinquantenzahl von $\frac{1}{2}$

Durch das Einstrahlen von elektromagnetischer Strahlung der Frequenz ν_0 kann der energieärmerere Energiezustand in den energiereicheren überführt werden, wenn die Energie gerade ΔE entspricht (Resonanzbedingung). Umgekehrt wird beim Übergang vom energiereicheren zum energieärmeren Zustand eine Energie vom Betrag ΔE mit der Frequenz ν_0 emittiert.

$$\begin{aligned}\Delta E &= h \cdot \nu_0 \\ h \cdot \nu_0 &= \frac{\gamma \cdot h \cdot B_0}{2 \cdot \pi} \\ \nu_0 &= \frac{\gamma \cdot B_0}{2 \cdot \pi}\end{aligned}$$

Die Frequenz ν_0 , die für eine Änderung der Orientierung nötig ist, hängt folglich nur von der Stärke des äußeren Magnetfelds und dem betrachteten Kern ab.

1.1.3 Spinverteilung auf die magnetischen Quantenzustände

Ohne ein äußeres Magnetfeld sind alle magnetischen Quantenzustände energiegleich, es gibt also gleich viele Protonen mit den magnetischen Quantenzuständen $m = +\frac{1}{2}$ und $m = -\frac{1}{2}$. Wird ein äußeres Magnetfeld angelegt, sind die magnetischen Quantenzustände nicht länger energiegleich; es erfolgt die parallele oder antiparallele Ausrichtung der Spins. Der energieärmerere magnetische Quantenzustand, der parallel zum Magnetfeld orientierte Spin, sollte hierbei bevorzugt besetzt werden. Wie groß der tatsächliche Besetzungsunterschied zwischen den beiden Energieniveaus ist, lässt sich mit der Boltzmann-Gleichung,

$$\frac{N_{m=-\frac{1}{2}}}{N_{m=+\frac{1}{2}}} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{kT}\right)$$

mit $N = -\frac{1}{2}$, Proton im angeregten Zustand, $N = +\frac{1}{2}$, Proton im Grundzustand, der Boltzmann-Konstante k ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$), der absoluten Temperatur T und der Energiedifferenz ΔE , berechnen. Einsetzen der Energiedifferenz ergibt:

$$\frac{N_{m=-\frac{1}{2}}}{N_{m=+\frac{1}{2}}} = \exp\left(-\frac{\gamma \cdot h \cdot B_0}{2 \cdot \pi \cdot k \cdot T}\right)$$

Die beispielhafte Berechnung des Besetzungsverhältnisses für eine Temperatur von 37°C (310 K, Körpertemperatur) und einer magnetischen Feldstärke von 2 Tesla ergibt:

$$\frac{N_{m=-\frac{1}{2}}}{N_{m=+\frac{1}{2}}} = \exp\left(-\frac{2,68 \cdot 10^8 \cdot 6,63 \cdot 10^{-34} \cdot 2}{2 \cdot \pi \cdot 1,38 \cdot 10^{-23} \cdot 310}\right)$$

$$\frac{N_{m=-\frac{1}{2}}}{N_{m=+\frac{1}{2}}} = 0,999987$$

Die Beispielrechnung zeigt, dass bei 1.000.000 Protonen im Grundzustand sich 999.987 Protonen im angeregten Zustand befinden. Diese 13 Protonen können zur Signalerzeugung Verwendung finden.

Die Erweiterung der Gleichung zu einer Maclaurin-Reihe und der Abbruch der Reihenentwicklung nach dem zweiten Term

$$\frac{N_{m=-\frac{1}{2}}}{N_{m=+\frac{1}{2}}} = 1 - \left(\frac{\gamma \cdot \hbar \cdot B_0}{2 \cdot \pi \cdot k \cdot T}\right)$$

der Gleichung zeigt, dass die relative Zahl der überschüssigen Protonen im Grundzustand linear von der Magnetfeldstärke abhängt. Je höher das äußere Magnetfeld ist, desto größer ist der Besetzungsunterschied zwischen Grundzustand und angeregtem Zustand und um so größer ist auch das erzeugbare Signal.

1.1.4 Verhalten des Atomkerns im Magnetfeld

Ein Atomkern, der ein magnetisches Moment besitzt, rotiert in einem Magnetfeld schnell. Sein magnetisches Moment bewegt sich hierbei auf einer Kreisbahn um die Längsachse des Magnetfeldes, es präzidiert oder präzessiert (siehe Abbildung 2).

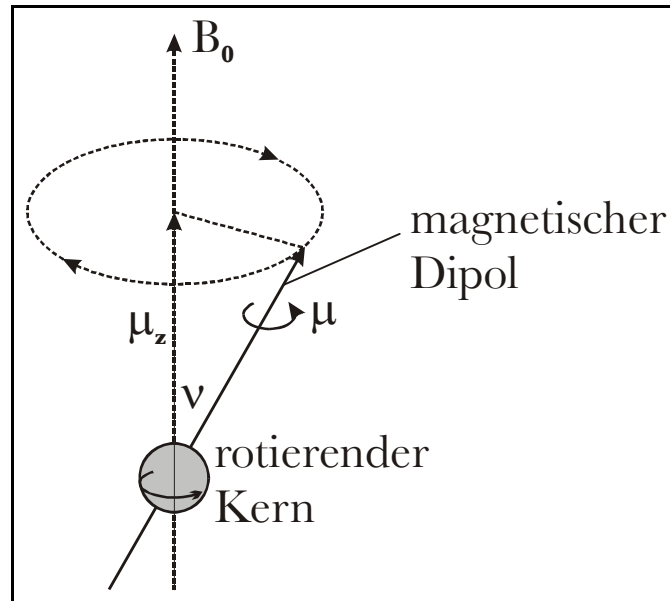


Abbildung 2: Präzession eines rotierenden Atomkerns im Magnetfeld

Für die Kreisfrequenz ω_0 dieser Bewegung gilt:

$$\omega_0 = \gamma \cdot B_0$$

Teilt man die Kreisfrequenz durch 2π , so kann sie in die Präzessionsfrequenz ν_0 (Lamorfrequenz) umgewandelt werden. Es gilt:

$$\nu_0 = \gamma \frac{B_0}{2 \cdot \pi}$$

Die Lamorfrequenz ist identisch mit der Frequenz der absorbierten Strahlung, also dem Energieunterschied zwischen Grund- und angeregtem Zustand.

1.1.5 Die NMR Absorption

Für die potentielle Energie eines präzidierenden Atomkerns im Magnetfeld gilt:

$$E = -\mu_z \cdot B_0$$

$$E = -\mu \cdot B_0 \cdot \cos \nu$$

Absorbiert der Kern nun Energie, muss sich der Winkel der Präzession ν ändern. Für einen Kern mit der Spinquantenzahl $\frac{1}{2}$, wie dem Proton, kann man sich diesen Prozess folgendermaßen vorstellen: die Absorption bewirkt eine Umkehr des in Feldrichtung orientierten magnetischen Moments (siehe Abbildung 3). Die Rückkehr des magnetischen Moments aus dem angeregten in den Grundzustand kann unter Emission von elektromagnetischer Strahlung erfolgen.

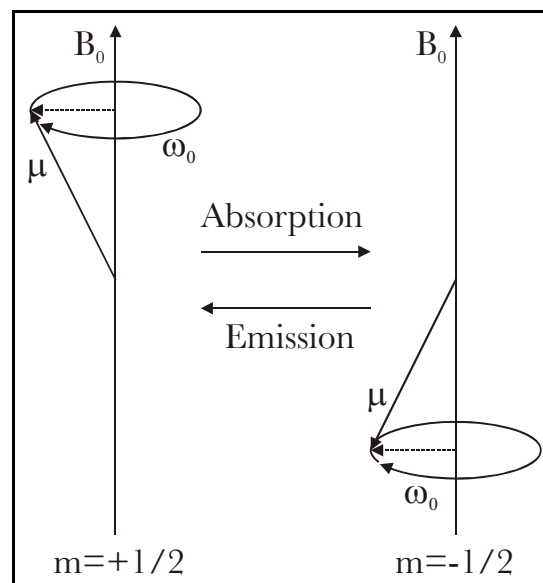


Abbildung 3: Modell der Strahlungsabsorption eines rotierenden Atomkerns

1.1.6 NMR Relaxationsprozesse

Wie bereits gezeigt wurde, können Atomkerne elektromagnetische Strahlung geeigneter Frequenz absorbieren. Sie sind hierzu in der Lage, da sich immer ein kleiner Überschuss von Atomkernen im Grundzustand befindet (siehe Beispielrechnung). Hat der Atomkern Strahlung absorbiert und befindet sich im angeregten Zustand, ist er bestrebt, mehr oder weniger schnell in den Grundzustand zurückzukehren, zu Relaxieren.

Der Relaxationsprozess, d.h. die spontane Emission von Strahlung der Frequenz, die der Energiedifferenz zwischen Angeregtem- und Grundzustand entspricht (Fluoreszenz), spielt bei der Kernresonanz eine untergeordnete Rolle und findet praktisch nicht statt. Dieses Phänomen lässt sich mit Hilfe der Strahlungstheorie erklären. Laut Strahlungstheorie sinkt die Wahrscheinlichkeit der spontanen Reemission eines Photons mit der dritten Potenz der Frequenz, so dass bei dem verwendeten hochfrequenten Anregungspuls dieser Prozess höchst

unwahrscheinlich ist. Spontane Emission findet bei der Kernresonanz also nicht statt, die Relaxation verläuft strahlungslos.

Zwei verschiedene strahlungslose Relaxationsprozesse werden bei der Kernresonanz beobachtet, zum einen die Spin-Gitter- oder longitudinale Relaxation, zum andern die Spin-Spin- oder transversale Relaxation.

1.1.6.1 Spin-Gitter-Relaxation

Jeder Atomkern ist von vielen anderen Atomkernen, dem Gitter, umgeben. Unabhängig davon ob es sich bei dem betrachteten Gitter um einen Festkörper, eine Flüssigkeit oder ein Gas handelt, schwingen und rotieren die Atomkerne. Dieses führt zur Ausbildung eines komplexen Feldes in der Umgebung eines jeden Atomkerns. Das Feld besteht aus einem Kontinuum von magnetischen Komponenten, von denen einige der Frequenz und der Phase der Präzessionsfrequenz des betrachteten Atomkerns entsprechen. Die daraus resultierende Wechselwirkung versetzt den Atomkern vom höheren in den niederen Energiezustand. Im Zuge dieser Wechselwirkung findet eine minimale Temperaturerhöhung im betrachteten Körper statt.

Die Spin-Gitter-Relaxation ist ein Prozess erster Ordnung und wird durch die Zeitkonstante T_1 charakterisiert. T_1 ist hierbei ein Maß für die durchschnittliche Lebensdauer des Atomkerns im höheren, angeregtem Energiezustand. Die Zeitkonstante ist abhängig vom gyromagnetischen Verhältnis des Atomkerns und wird außerdem stark durch die Beweglichkeit des Gitters beeinflusst. In kristallinen Festkörpern oder hochviskosen Flüssigkeiten ist die Beweglichkeit des Gitters klein und somit ist T_1 groß. Eine Erhöhung der Temperatur verursacht stärkere Schwingungen innerhalb des Gitters und führt zu einer Verkürzung von T_1 . Die Anwesenheit von Elementen mit ungepaarten Elektronen verkürzt die Spin-Gitter-Relaxationszeit erheblich, da diese Elemente aufgrund ihres Spins stark fluktuierende Magnetfelder erzeugen.

1.1.6.2 Spin-Spin-Relaxation

Mehrere andere sich überlagernde Prozesse verkürzen zusätzlich die Relaxationszeit und werden durch die Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 beschrieben. Die Spin-Spin-Relaxation wird durch die Wechselwirkung benachbarter Atomkerne mit gleicher Präzessionsgeschwindigkeit,

aber unterschiedlicher magnetischer Quantenzustände verursacht. Die Wechselwirkung zwischen diesen Atomkernen führt zu einem Austausch der Quantenzustände zwischen diesen Atomkernen. Dies bedeutet, dass ein Atomkern im unteren Spinzustand angeregt wird, während ein anderer angeregter Atomkern in den unteren Spinzustand relaxiert. Hieraus resultiert zwar keine makroskopische Veränderung der Spinzustände, aber die durchschnittliche Lebensdauer des einzelnen Atomkerns im angeregten Zustand wird verkürzt.

1.1.7 Impulsanregung

Für die folgenden Betrachtungen ist es hilfreich ein kartesisches Koordinatensystem einzuführen, bei dem die Magnetfeldlinien des äußeres Magnetfelds B_0 entlang der z -Achse verlaufen (siehe Abbildung 4a). In diesem Fall rotieren die magnetischen Momente von Kernen der Spinquantenzahl $m = +\frac{1}{2}$ mit der Larmorfrequenz ω_0 um die z -Achse. Aufgrund des zuvor beschriebenen Besetzungsunterschieds zwischen den beiden Energieniveaus der Atomkerne resultiert ein magnetisches Gesamtmoment M entlang der z -Achse. Stellt man sich für die nachfolgenden Betrachtungen das Koordinatensystem nicht fixiert vor, sondern lässt es um seine z -Achse rotieren, erscheinen die Vektoren der magnetischen Momente statisch in ihren Positionen fixiert.

Abbildung 4b zeigt das magnetische Gesamtmoment entlang der z -Achse zum Zeitpunkt eines Hochfrequenzpulses entlang der x -Achse, dessen magnetisches Feld mit B_1 bezeichnet wird. Hierbei erscheinen B_1 und M im um die z -Achse rotierenden Koordinatensystem statisch in Richtung der x -Achse bzw. im rechten Winkel zu ihr. Der Vektor der Gesamtmagnetisierung erfährt durch den Hochfrequenzpuls ein Drehmoment und wird aus der z -Richtung ausgelenkt.

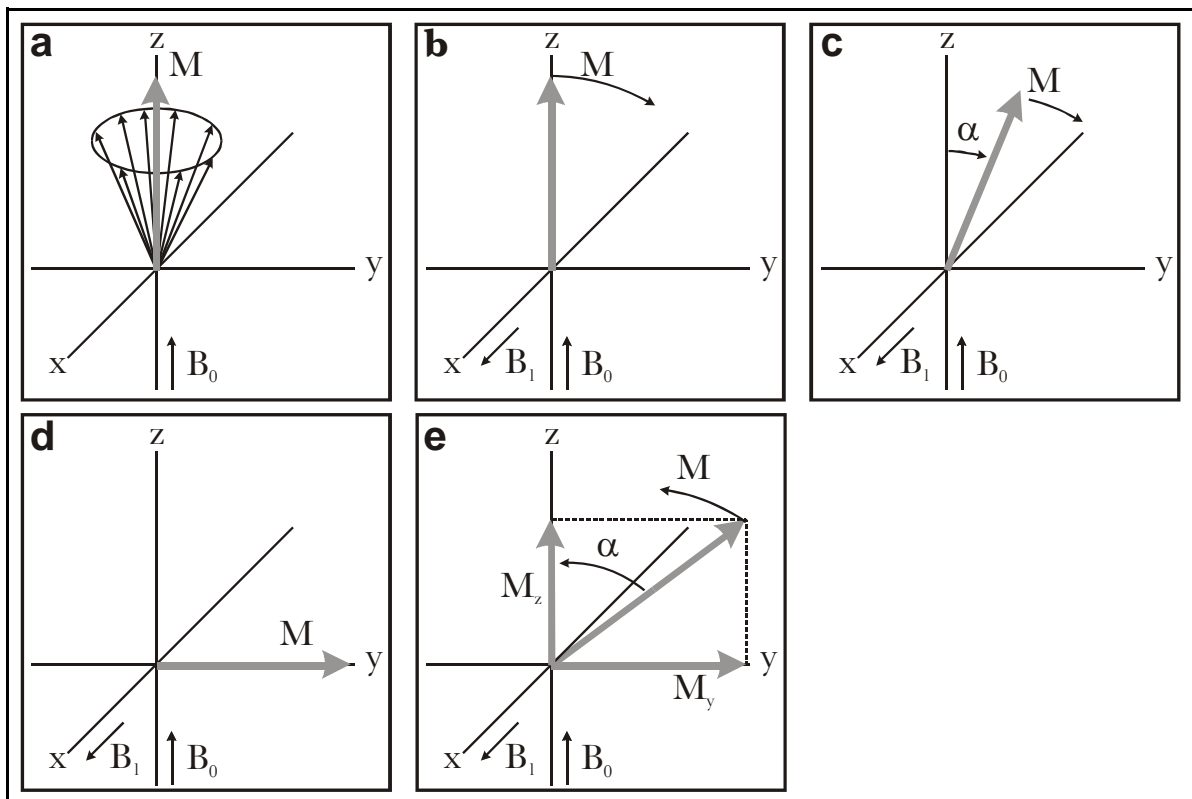


Abbildung 4: Verhalten der magnetische Momente bei 90° Impuls

In der Abbildung 4c und d wird gezeigt, wie der Vektor der Gesamtmagnetisierung durch das resultierende Drehmoment um die x-Achse gedreht wird. Das Ausmaß der Rotation ist hierbei abhängig von der Dauer des Hochfrequenzpulses und ist definiert durch

$$\alpha = \gamma \cdot B_1 \cdot \tau$$

mit dem Rotationswinkel α in rad. Die Impulsdauer wird üblicherweise so gewählt, dass der Winkel $\alpha = 90^\circ$ entspricht. Die Zeit, die hierfür nötig ist, beträgt etwa 1 bis 10 μs .

Nach dem Puls beginnt, wie in Abbildung 4e gezeigt, die Relaxation der magnetischen Momente zur Gleichgewichtsverteilung. Wie bereits erwähnt, sind im wesentlichen zwei voneinander unabhängige Prozesse für die Relaxation verantwortlich, die auf der Spin-Gitter- und der Spin-Spin-Wechselwirkung beruhen. Abbildung 4e zeigt, dass die Relaxation im Wesentlichen die Abnahme des magnetischen Moments entlang der y-Achse und die Zunahme magnetischen Moments entlang der z-Achse bewirkt.

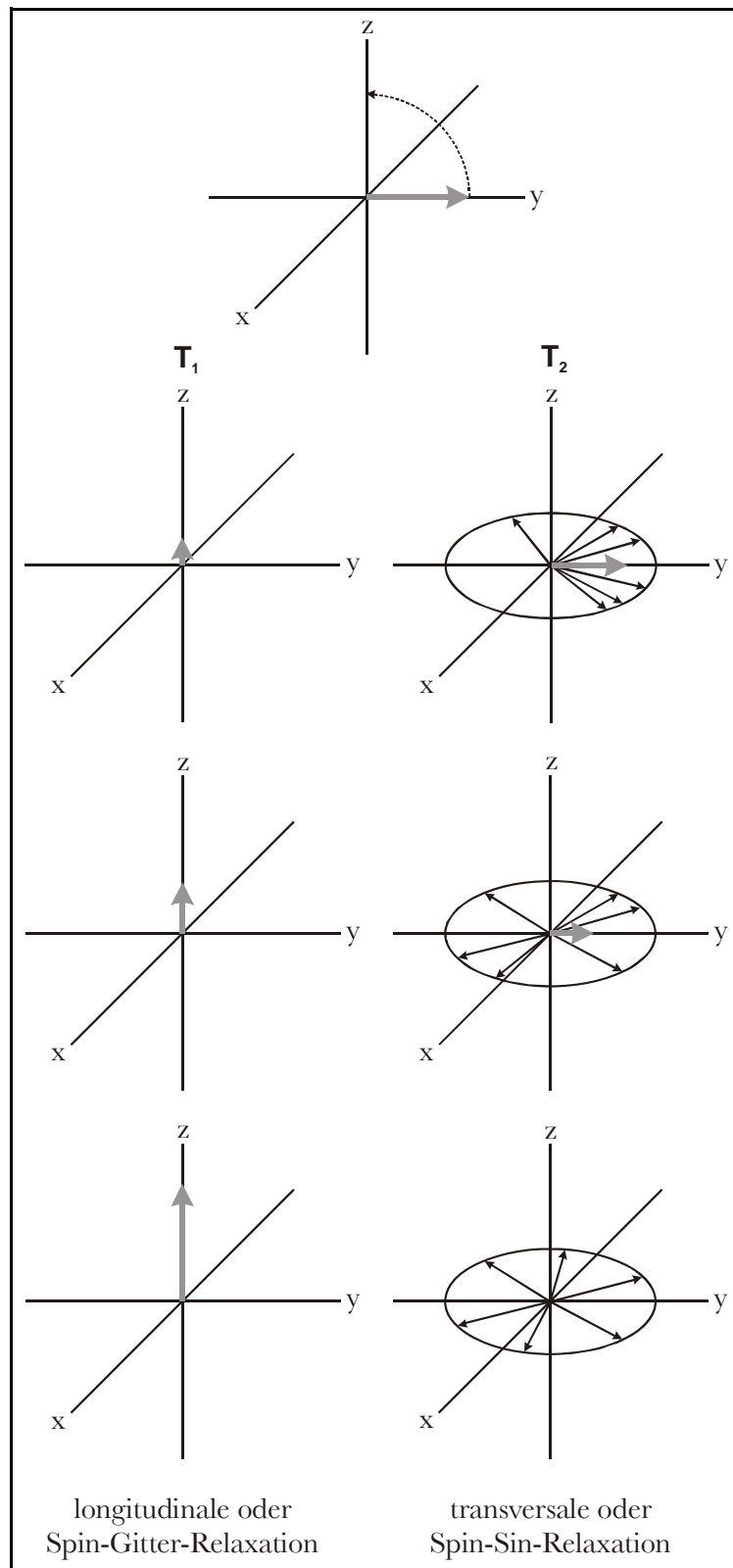


Abbildung 5: Kernrelaxationsprozesse

Abbildung 5 zeigt die beiden Relaxationsprozesse im Detail, jetzt wieder im statischen Koordinatensystem. Bei der Spin-Gitter-Relaxation nimmt die Magnetisierung entlang der

z-Achse solange zu, bis der in Abbildung 4a gezeigte Ausgangszustand wieder erreicht ist. Bei der Spin-Spin-Relaxation tauschen die Kerne untereinander Energie aus, wodurch die Spins sich unterschiedlich schnell bewegen, einige schneller andere langsamer als die Larmofrequenz. Hierdurch fächern sich die Spins, wie in Abbildung 5 rechts, in der xy-Ebene auf. Diese Auffächerung führt im Endeffekt zur Abnahme des magnetischen Moments entlang der y-Achse auf Null.

Da keine Restkomponente des magnetischen Moments in der xy-Ebene verbleiben kann, wenn die Relaxation entlang der z-Achse abgeschlossen ist, muss $T_2 \leq T_1$ sein, das heißt die Spin-Spin-Relaxation verläuft schneller als die Spin-Gitter-Relaxation.

1.2 MRT - Aufbau und Bilderzeugung

Ein Magnetresonanztomograph besteht im wesentlichen aus einem großen, meist supraleitenden Elektromagnet, in dessen Inneren mehrere Send- und Empfangsspulen angeordnet sind. In der Regel steht der MRT-Scanner in einem vollständig gegen elektromagnetische Strahlung abgeschirmten Raum, einem Faradayschen Käfig.

Die Bilderzeugung läuft im wesentlichen in drei Schritten ab. Im ersten Schritt werden die Protonenspins im zu untersuchenden Körper durch das von dem Elektromagneten erzeugte homogene Magnetfeld von 1 bis 7 Tesla ausgerichtet. Anschließend werden im zweiten Schritt der Bilderzeugung die Spins der Protonen durch kurze, gezielte, hochfrequente Pulse aus ihrer Gleichgewichtsposition ausgelenkt. Nach Beendigung des Anregungspulses beginnen die Spins zu Relaxieren und kehren in ihre Gleichgewichtsposition zurück. Die ortsauflösende Detektion der hierbei ausgesandten Radiowellen stellt den dritten Schritt der Bilderzeugung da.

Der hier beschriebene Ablauf der Bilderzeugung bei der Magnetresonanztomographie stellt natürlich nur eine grobe Vereinfachung der Vorgänge dar, die zur Bilderzeugung von statten gehen. In der Praxis kommen komplizierte Pulssequenzen zur Anwendung, deren Beschreibung für die vorliegende Arbeit zu weit reichen würde. Zum Abschluss sei nur noch erwähnt, dass bei der Bilderzeugung verschiedene abgestufte Magnetfelder (Gradientenfelder) in allen drei Raumrichtungen zur Anwendung kommen, mit deren Hilfe die Signale einzelnen Volumenelementen, den Voxeln, zugeordnet werden können.

1.3 MRT - Kontrastmittel

Kontrasterhöhende Substanzen, die sogenannten Kontrastmittel, sind ein unverzichtbarer Bestandteil der Magnetresonanztomographie. Im Folgenden werden die verschiedenen MRT-Kontrastmittel genauer vorgestellt.

1.3.1 Unterscheidung der MRT-Kontrastmittel

Die Kontrastmittel werden nach ihren magnetischen Eigenschaften, ihrer Bioverteilung und der Art ihrer Bildbeeinflussung unterschieden (siehe Abbildung 6).

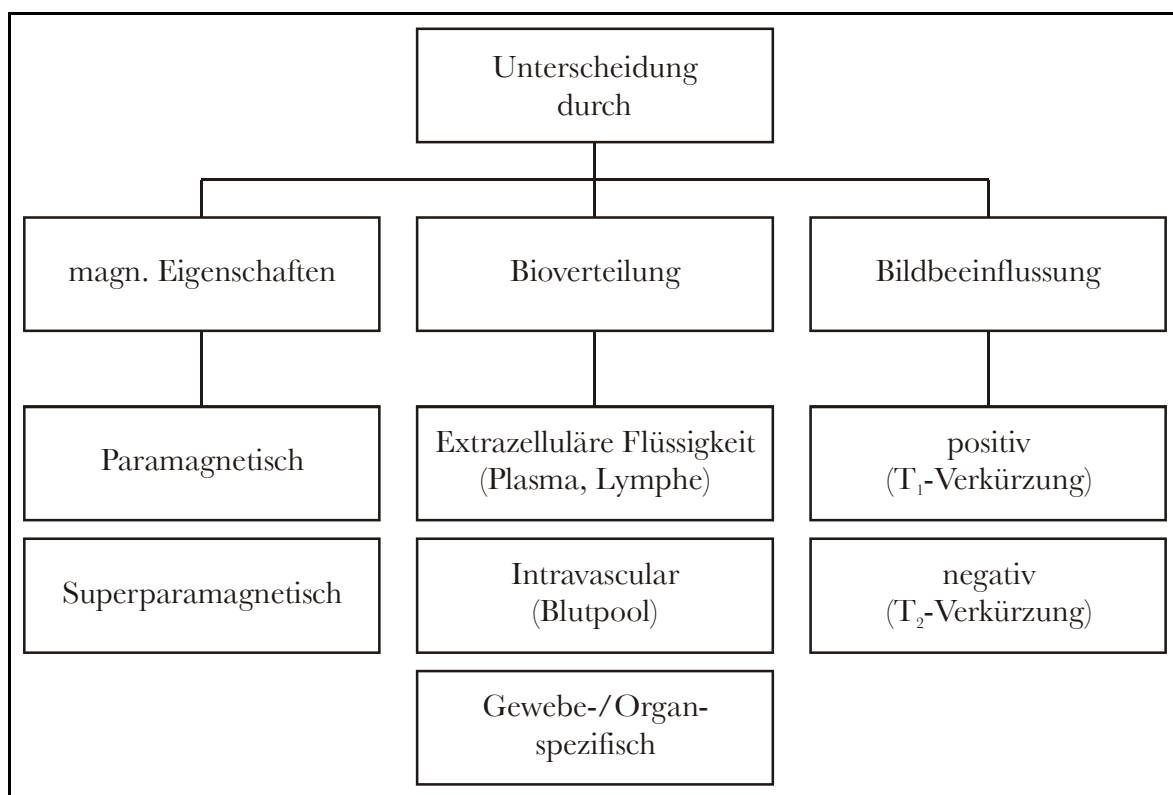


Abbildung 6: Unterscheidung der MRT-Kontrastmittel

Alle in der Magnetresonanztomographie verwendeten Kontrastmittel wirken durch die Verkürzung der T₁ und/oder T₂ Relaxationszeiten des Zielgewebes und werden deshalb entweder als T₁- oder T₂-Kontrastmittel bezeichnet. Diese Einteilung ist abhängig davon, ob die Verkürzung der Relaxationszeit, die vom Kontrastmittel verursacht wird, größer für die longitudinale (T₁) oder die transversale Relaxationszeit (T₂) ist. Die Fähigkeit des Kontrastmittels die T₁ oder T₂ Relaxationszeit zu verkürzen wird durch die Relaxivitäten r₁ und r₂ beschrieben. Auf die Relaxivitäten wird später noch detaillierter eingegangen.

1.3.2 Magnetische Eigenschaften der MRT - Kontrastmittel

1.3.2.1 Paramagnetische Kontrastmittel

Metallionen mit ungepaarten Elektronen sind paramagnetisch und haben folglich ein magnetisches Moment. Auch organische Radikale sind aufgrund ihres ungepaarten Valenzelektrons paramagnetisch. In wässrigen Lösungen kommt es zu Wechselwirkungen zwischen den magnetischen Momenten der paramagnetischen Metallionen und den wesentlich kleineren magnetischen Momenten der benachbarten Protonen des Wassers. Veränderungen bei diesen Wechselwirkungen durch die Bewegung der Moleküle führt zur Reduzierung der T_1 und T_2 Relaxationszeiten der Wasserprotonen. Dreiwertige Gadoliniumionen (Gd^{3+}) und zweiwertige Manganionen (Mn^{2+}) sind aufgrund der Fülle ihrer ungepaarten Elektronen (Elektronenkonfiguration siehe Abbildung 7) vielgenutzte Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie.

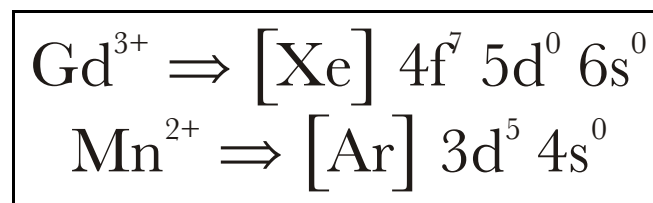


Abbildung 7: Elektronenkonfiguration

Wegen ihrer relativ hohen Toxizität und ihrer unerwünschten Bioverteilung können freie paramagnetische Metallionen nicht als MRT-Kontrastmittel verwendet werden. Bindet man die Metallionen jedoch an einen organischen Liganden, wie zum Beispiel Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA), lässt sich eine bessere Bioverteilung und geringere Toxizität erreichen. Gadolinium- und Mangan-Chelate sind weit verbreitete MRT-Kontrastmittel.

1.3.2.2 Superparamagnetische Kontrastmittel

5 bis 200 nm große Eisenoxidpartikel mit tausenden von magnetischen Eisenionen haben superparamagnetische Eigenschaften. Sie lassen sich wie ein Ferromagnet stark magnetisieren, weisen aber nach abschalten des Magnetfeldes keine Restmagnetisierung mehr auf. Es werden zwei Klassen von superparamagnetischen Kontrastmitteln der Kristallgröße nach unterschieden: Superparamagnetic Ironoxide (SPIO) mit Durchmessern über 50 nm und Ultra Small Superparamagnetic Ironoxide (USPIO) mit Durchmessern kleiner als 50 nm. Die

Moleküle eines superparamagnetischen Kontrastmittels besitzen im statischen Magnetfeld ein permanentes magnetisches Moment, das viel größer ist als das eines einzelnen Gd-Chelat Moleküls.

1.3.3 Bioverteilung der MRT-Kontrastmittel

MRT-Kontrastmittel werden anhand ihrer Verteilungsräume im Körper in unterschiedliche Klassen eingeteilt. Diese Kontrastmittelklassen werden in den folgenden Abschnitten etwas genauer vorgestellt.

1.3.3.1 Extrazelluläre Flüssigkeitskontrastmittel

Kontrastmittel die sich in der extrazellulären Flüssigkeit (engl.: extracellular fluid, ECF) verteilen werden oft als Extrazelluläre Flüssigkeitskontrastmittel bezeichnet. Solche Kontrastmittel gehen sehr schnell vom Blut ins Interstitium, die Halbwertszeit beträgt etwa $t_{\frac{1}{2}} = 5 \text{ min}$. Sie werden mit einer Halbwertszeit von $t_{\frac{1}{2}} = 80 \text{ min}$ über die Niere ausgeschieden. ECF-Kontrastmittel finden beispielsweise bei der Detektion von Hirnschäden Anwendung, denn nur beim Vorhandensein dieser kann die Blut-Hirn-Schranke von diesen Kontrastmitteln passiert werden. Bei der Angiographie können diese Kontrastmittel auch zur Anwendung kommen, wenn die Messung sehr schnell nach der Injektion des Kontrastmittels erfolgt. ECF-Kontrastmittel sind hauptsächlich Gadolinium-Chelate z.B. Gd-DTPA (Magnevist[®]) und Gd-DOTA (Dotarem[®]).

1.3.3.2 Blut-Pool-Kontrastmittel

Eine relativ neue Klasse von Kontrastmitteln sind die in erster Linie für die Angiographie entwickelten Blut-Pool-Kontrastmittel. Diese Kontrastmittelart ist viel größer als die zuvor erwähnten Kontrastmittel für die extrazelluläre Flüssigkeit. Die Größe der Blut-Pool-Kontrastmittel verhindert den Übertritt des Kontrastmittels vom Blut ins Interstitium. Die hieraus resultierende, im Vergleich zu den zuvor betrachteten ECF-Kontrastmitteln, längere Verweilzeit des Kontrastmittels im Blut öffnet ein größeres Bildfenster für die Angiographie. Als Blut-Pool-Kontrastmittel finden sowohl USPIO-Partikel als auch Gadolinium-Chelate, die auf wasserlöslichen Makromolekülen, wie zum Beispiel Proteinen oder Polymeren, basieren, Verwendung.

1.3.3.3 Organ-/Gewebespezifische Kontrastmittel

Organ-/Gewebespezifische Kontrastmittel sind definiert als Kontrastmittel, die selektiv von einer Zellenart aufgenommen werden oder an diese Binden. Diese Kontrastmittel reichern sich also in Organen an, die diese Zellen oder Zielstrukturen enthalten. Von diesen speziellen Kontrastmitteln abgesehen sind alle MRT-Kontrastmittel selektiv für das Organ über das sie Ausgeschieden werden. So reichern sich Mn-DPDP (Mn-N,N'-dipyridoxyl-ethylenediamine-N,N'-diacetate-5,5'-bis(phosphate) oder Gd-EOB-DTPA (Gd-Etoxybenzyl-diethylene-triamine-pentaacetic acid, Eovist®) beispielsweise in der Leber an. Eine Kontrasterhöhung im Darm kann durch spezielle Darmkontrastmittel, erreicht werden, die oral verabreicht werden.

Rezeptorspezifische Kontrastmittel, wie sie seit Langem in der nuklearmedizinischen Diagnostik zur Anwendung kommen sind bei der Magnetresonanztomographie noch nicht bekannt oder kommen erst in präklinischen Studien zur Anwendung.

1.3.4 Grundprinzipien der MRT-Kontrastmittel

MRT-Kontrastmittel beeinflussen die Relaxation der Protonenspins auf verschiedene Weisen. Die unterschiedlichen Relaxationsprozesse werden im folgenden näher vorgestellt.

1.3.4.1 Inner- und Outer-Sphere Relaxation

Wie bereits erwähnt wird die Relaxation der Protonen des Wassers vom Kontrastmittel durch zeitabhängige Wechselwirkungen zwischen den magnetischen Momenten der paramagnetischen Ionen und den magnetischen Momenten der Wasser-Protonen verursacht. Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie kann man sich also als eine Art Katalysator vorstellen, der die Relaxationsraten $R_1 (= \frac{1}{T_1})$ und $R_2 (= \frac{1}{T_2})$ der Gewebe-Protonen steigert. Die Effizienz der Verkürzung der Relaxationszeiten ist definiert durch die Relaxivitäten r_1 und r_2 des Kontrastmittels:

$$\text{für } r_1, R_1 = r_1[\text{KM}] + R_{1_Gewebe}$$

$$\text{für } r_2, R_2 = r_2[\text{KM}] + R_{2_Gewebe}$$

Wobei [KM] die Konzentration des Kontrastmittels in mmol/L ist. Folglich haben r_1 und r_2 die Dimension $\text{m} \cdot \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ($\text{M} = \frac{\text{mol}}{\text{L}}$). Die Größen r_1 , r_2 , R_{1_Gewebe} und R_{2_Gewebe} hängen sowohl von der Temperatur als auch von der Stärke des Magnetfeldes ab. Für Gd-ECF-Kontrastmittel werden für r_1 und r_2 bei 0,5 T und 37°C die folgenden Werte $r_1 = 4,0 \text{ m} \cdot \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, $r_2 = 4,7 \text{ m} \cdot \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ beobachtet, wenn in Wasser gemessen wird.

Die Beeinflussung der Relaxation der Protonen durch ein Kontrastmittel erfordert, dass die Protonen in direktem Kontakt mit dem Kontrastmittel stehen. Für paramagnetische Kontrastmittel mit kleinen Molekulargewichten beruht die Bildbeeinflussung zur Hälfte auf dem sogenannten inner sphere effect, bei dem ein Wasser-Molekül in der inneren Koordinationssphäre des paramagnetischen Ions bindet und ständig durch andere Wasser-Moleküle des umgebenden Wassers ersetzt wird. Zur anderen Hälfte wird die Bildbeeinflussung durch Wasser-Moleküle verursacht, die in der äußeren Koordinationssphäre des paramagnetischen Ions diffundieren (outer sphere relaxation). Der outer sphere Relaxations-Mechanismus ist entscheidend verantwortlich für die Relaxivität von superparamagnetischen Partikeln. Ein wichtiges Ergebnis der outer sphere Theorie ist, dass das Verhältnis von r_2/r_1 sich mit steigender Partikelgröße erhöht, und dass kleinere Partikel viel bessere T_1 -verkürzende Kontrastmittel sind als große.

1.3.4.2 Suszeptibilitäts induzierte Relaxation

Bei jeder Kontrastmittelart können Langstreckenwechselwirkungen eine Ursache für T_2 oder T_2^* Relaxation sein. Dieser Mechanismus der Relaxation hängt mit der Magnetisierung des Kontrastmittels zusammen und wird gewöhnlich als Suszeptibilitäts induzierte Relaxation bezeichnet. Im Magnetfeld richten sich die magnetischen Momente des paramagnetischen Metallions entlang des selben aus. Ist das Kontrastmittel in einem abgeschlossenen Raum, wie zum Beispiel den Kupffer-Zellen oder einem Gefäß, so fungiert dieser abgeschlossene Bereich als sekundäres Kontrastmittel. Für Wasser-Protonen außerhalb dieses abgeschlossenen Bereichs stellt das sekundäre Kontrastmittel eine große magnetische Masse dar. Die benachbarten Wasserprotonen relaxieren nach dem Outer-Sphere-Mechanismus.

Die Größenordnung der Langstrecken T_2/T_2^* -Relaxation hängt von den folgenden Faktoren ab:

- magnetisches Moment und lokale Konzentration des Kontrastmittels

-
- Größe und Geometrie des abgeschlossenen Kontrastmittelbereichs
 - Diffusionskonstante des Wassers
 - Art der Bilderzeugungssequenz

Superparamagnetische Kontrastmittel werden aufgrund ihres im Vergleich zu paramagnetischen Kontrastmitteln großen magnetischen Moments viel stärker magnetisiert (Faktor 1000). Demzufolge erzeugen superparamagnetische Kontrastmittel einen größeren Langstrecken- T_2/T_2^* -Effekt als paramagnetische Kontrastmittel.

Ob ein Kontrastmittel als T_1 - oder T_2 -Kontrastmittel fungiert ist eine Funktion der Bildgebungssequenz, der Feldstärke, der Korrelationszeit, der Größe der Kontrastmittel und der Art und Weise, wie das Kontrastmittel im Körper verteilt wird.

1.4 Motivation der Arbeit

Im vorhergehenden Kapitel über die Magnetresonanztomographie wurde erwähnt, dass die Magnetresonanztomographie in der Lage ist, sowohl morphologische als auch funktionelle Informationen in hervorragender Bildqualität zu liefern. Ein großer Nachteil der Magnetresonanztomographie im Vergleich zu andern medizinischen Bildgebungsverfahren ist das Fehlen von rezeptorspezifischen Kontrastmitteln. In der nuklearmedizinischen Bildgebung bei der Einzelphotonen-Emission-Tomographie (engl. single-photon-emission-computed-tomography, SPECT) und bei der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) sind organ-/gewebespezifische Radiopharmaka seit langem ein unverzichtbarer Bestandteil [4, Anderson] [5, Behr].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Synthese eines rezeptorspezifischen MRT-Kontrastmittels auf Basis eines bekannten SPECT-Radiopharmakons. Im Anschluss an die Synthese wird die Rezeptorspezifität des MRT-Kontrastmittels im Zellversuch evaluiert.

1.4.1 Warum rezeptorspezifische MRT-Kontrastmittel?

Ein rezeptorspezifisches MRT-Kontrastmittel eröffnet eine große Zahl von Vorteilen gegenüber den heute genutzten medizinischen Bildgebungsverfahren für die spezifische Bildgebung. Wie bereits erwähnt ist die nuklearmedizinische Bildgebung in der Lage, durch Radiopharmaka Organe oder Gewebe spezifisch abzubilden. Hierbei werden aber im Vergleich zur MRT keine morphologischen Daten erzeugt, die die räumliche Zuordnung der Befunde erleichtern würden. Zur Umgehung dieses Mangels ist die Kombination verschiedener Bildgebungsverfahren nötig, zum Beispiel PET und CT (Computertomographie). Die Kombination zweier Bildgebungsverfahren bedingt entweder zwei zeitaufwendige Untersuchungen oder die Entwicklung von Geräten, die in der Lage sind, beide Untersuchungen parallel durchzuführen. Hat man nun ein rezeptorspezifisches MRT-Kontrastmittel erfolgt die Akquisition dieser Bilddaten innerhalb einer Untersuchung.

Ein weiterer Vorteil der Magnetresonanztomographie gegenüber den anderen radiologischen Bildgebungsverfahren ist die Abwesenheit von ionisierender Strahlung. Der Patient wird also während der Untersuchung keiner zusätzlichen Belastung durch Röntgen- oder Gammastrahlung ausgesetzt.

Die höhere Auflösung der erzeugten Bilder im Vergleich zu den nuklearmedizinischen Bildgebungsverfahren, bei dann gleichem oder besserem Informationsgehalt der Bilder, stellt einen weiteren Vorteil der magnetresonanztomographischen Bildgebung mit rezeptorspezifischen Kontrastmitteln dar. Bei den nuklearmedizinischen Bildgebungsverfahren SPECT und PET beträgt die Auflösung momentan 0,5 bis 1,2 cm. Eine Verbesserung der Auflösung ist bei der PET aufgrund der physikalischen Eigenschaften des Positrons nicht möglich. Mit speziell für Kleintiere entwickelten SPECT-Kameras werden heute Auflösungen von 0,8 bis 1,2 mm erreicht, dies ist aber durch eine signifikante Erhöhung der Messzeit erkauft. Für die routinemäßige Anwendung kommen diese Systeme auch aufgrund ihres enormen Preises nicht in Frage. Mit der Magnetresonanztomographie lassen sich bereits heute Auflösungen von unter einem Millimeter erreichen.

1.4.2 Anforderungen an das rezeptorspezifische MRT-Kontrastmittel

Das MRT-Kontrastmittel soll spezifisch an dem von vielen Tumoren, wie zum Beispiel dem kleinzelligen Lungenkrebs oder dem medulären Schilddrüsenkrebs, überexprimierten Gastrinrezeptor (Somatostatin Rezeptor) binden. In der nuklearmedizinischen Diagnostik wird zu diesem Zweck beispielsweise das mit Indium-111 markierte Minigastrin-DTPA verwendet (siehe Abbildung 8).

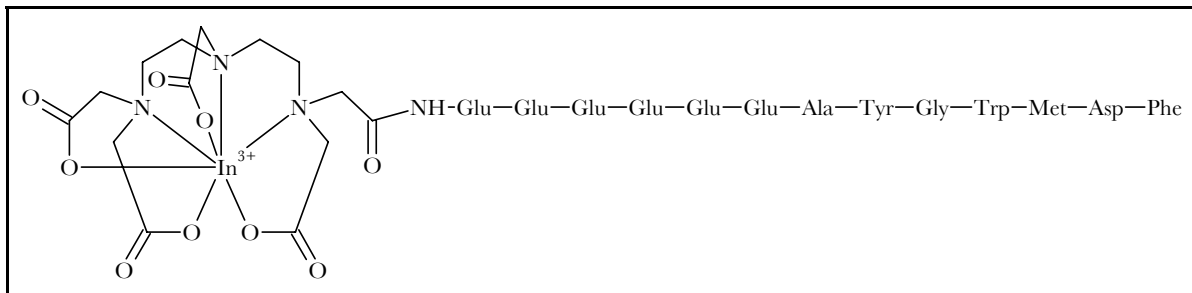


Abbildung 8: In-111-Minigastrin-DTPA

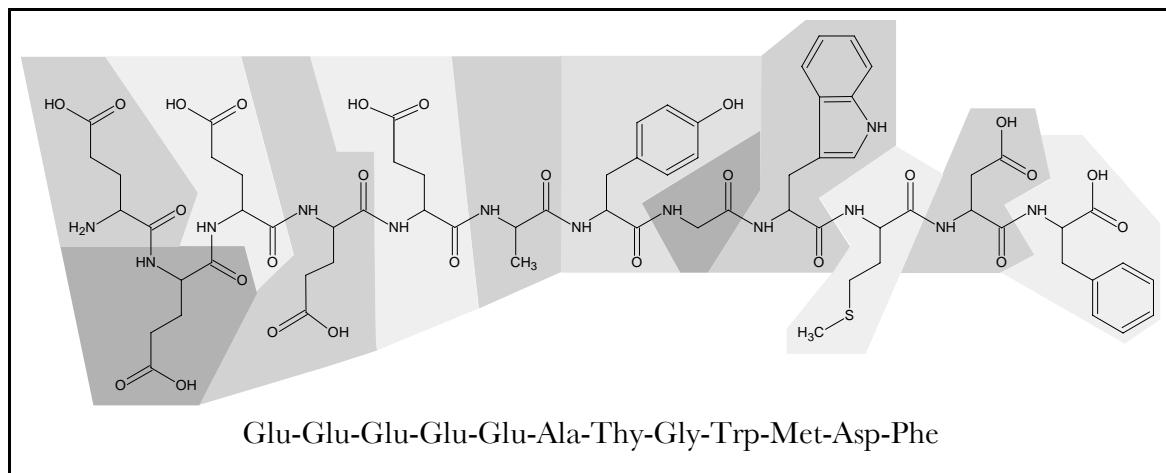


Abbildung 9 : Minigastrin

Die Nutzbarmachung dieses Pharmakons für die Magnetresonanztomographie erfordert einige Änderungen an der chemischen Struktur. Ein bloßer Wechsel des dreiwertigen Metallions von In^{3+} auf Gd^{3+} ist nicht ausreichend, da für ausreichende Signalstärke bei der MRT wesentlich mehr „Metall“ nötig ist als bei der SPECT. Die übliche Dosis für das weitverbreitete OctreoScan[®] (Mallinckrodt Inc., siehe Abbildung 10) wird mit 185 MBq In-111 für SPECT angegeben, das entspricht einer Menge von $1,54 \cdot 10^{-12}$ mol/kg (Standardmensch 70 kg), während für das MRT-Kontrastmittel Omniscan[™] (Amesham Health Inc., siehe Abbildung 11) eine Dosis von $0,1 \cdot 10^{-3}$ mol/kg empfohlen wird. Der Quotient der Metallkonzentration bei diesen beiden Pharmaka beträgt zirka $65 \cdot 10^6$ (65 Millionen). Eine Modifikation des Minigastrin-DTPA mit dem Ziel der Erhöhung des Metallanteils pro Molekül ist erforderlich.

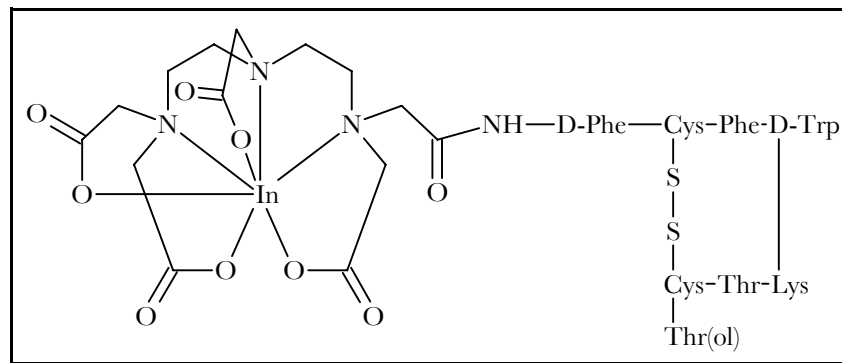


Abbildung 10: OctreoScan®

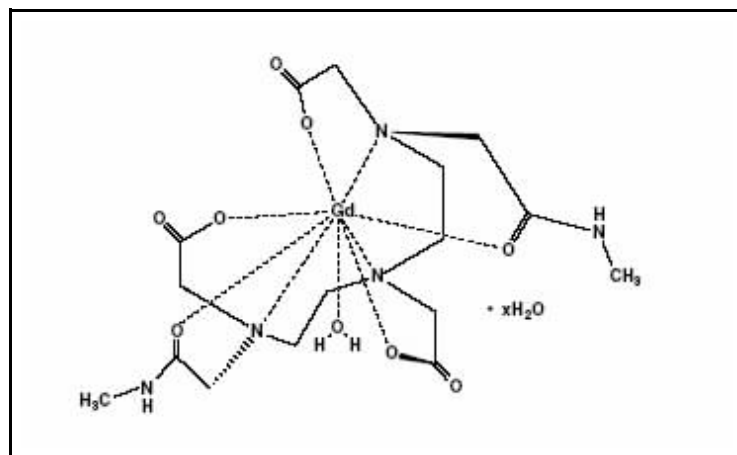


Abbildung 11: Omniscan™

1.4.3 Syntheseplanung

Die Steigerung der an die rezeptorspezifische Einheit, dem Minigastrin, gebundenen Metallmenge soll in dieser Arbeit über die Erhöhung der Anzahl der Chelatorgruppen, dem DTPA, pro Minigastrin realisiert werden. Im Minigastrin-DTPA ist das DTPA über eine seiner fünf Carbonsäuregruppen mit einer peptidischen Amidbindung an das N-terminale Ende des Minigastrins (siehe Abbildung 9) gebunden. Da im Minigastrin keine weiteren NH_2 -Gruppen vorhanden sind und an der Grundstruktur des Minigastrins keine Veränderungen vorgenommen werden können, ohne dass die Rezeptorspezifität des Minigastrins gestört wird, muss ein anderer Weg zur Anknüpfung weiterer DTPA-Gruppen eingeschlagen werden. Um weitere NH_2 -Gruppen, über die die Bindung zum DTPA erfolgen kann, an das Minigastrin zu bekommen, wird die Aminosäure Lysin (siehe Abbildung 12) als Linker an das N-terminale Ende des Minigastrins angeknüpft.

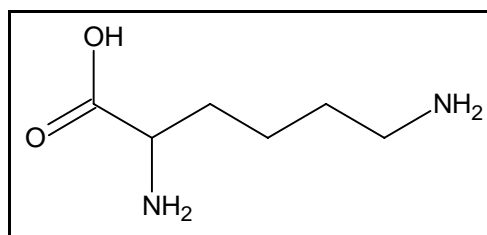


Abbildung 12: Lysin

Die zwei Aminogruppen des Lysin-Linkers bieten nun die Möglichkeit, zwei DTPA-Gruppen kovalent an das Minigastrin zu binden. Belässt man es nicht bei einem Lysin-Linker, sondern fügt zwei weitere Lysin-Moleküle an, so kann man bereits vier DTPA-Chelatoren an ein Minigastrin binden. Im Verlauf dieser Arbeit ist die Synthese von vier dieser Minigastrin-DTPA-Derivate mit dendrimerartig verzweigtem Lysinlinker beabsichtigt. Es werden Minigastrin-DTPA-Derivate mit zwei, vier, acht und sechzehn Chelatorgruppen synthetisiert, die im folgenden als Ast-1, Ast-2, Ast-3 und Ast-4 bezeichnet werden (siehe Tabelle 1). Die Bezeichnung als Ast wurde aufgrund der dendrimerartigen Verzweigungen des Lysinlinkers gewählt.

Bezeichnung des Minigastrin-DTPA-Derivats	Zahl der Lysin-Linker	Zahl der DTPA-Gruppen
Ast-1	1	2
Ast-2	3	4
Ast-3	7	8
Ast-4	15	16

Tabelle 1: Bezeichnung der Minigastrin-DTPA-Derivate

Das Minigastrin-DTPA-Derivat Ast-4 weist im Vergleich zur Ausgangssubstanz eine um den Faktor 16 erhöhte Chelatormenge auf und ist somit in der Lage, die sechsfache Metallmenge pro Molekül aufzunehmen. Dieses entspricht zwar lange noch nicht dem oben genannten Unterschied in der Metallmenge von SPECT-Radiopharmakon und MRT-Kontrastmittel, ist aber durchaus schon eine beträchtliche Steigerung, wenn man bedenkt, dass sich durch die Zeitbegrenzung, aufgrund des radioaktiven Zerfalls des Metalls, keine hundertprozentige Markierung aller Chelatorgruppen des Radiopharmakons erreichen lässt. Deshalb wird das Radiopharmakon bewusst in großem Überschuss verwendet um sicherzustellen, dass alles radioaktive Metall komplexiert wird. Somit sind bei weitem nicht alle Minigastrin-DTPA-Moleküle, die dem Patienten injiziert werden, radioaktiv markiert und viele Rezeptoren werden von diesen unmarkierten Molekülen blockiert (siehe Tabelle 2).

	Empfohlene Mengen	Stoffmenge N
In-111	185 MBq	$6,48 \cdot 10^{13}$
DTPA-Octreotide	10 μ g	$4,26 \cdot 10^{15}$

Tabelle 2: Stoffmengenvergleich In-111 DTPA-Octreotide

Bei der Komplexbildung des MRT-Kontrastmittels spielt die Zeit keine entscheidende Rolle und es können alle Chelator-Gruppen nahezu vollständig mit Metallionen versehen werden. Die Ausnutzung aller Chelatorgruppen bringt bei dem in Tabelle 2 gezeigten Beispiel eine Metallmengenerhöhung um den Faktor 65. Auch eine anschließende Abtrennung von unkomplexierten Metallionen ist problemlos möglich, da das Metall nicht radioaktiv ist und somit nicht zerfällt. Beim MRT-Kontrastmittel können also alle Rezeptoren für die Bildgebung genutzt werden und die Kontrastmitteldichte ist im Vergleich zum SPECT-Radiopharmakon erheblich größer. Die höhere Kontrastmitteldichte sollte theoretisch eine ausreichende Steigerung der Signalintensität bewirken und die eigentlich zu geringe Metallmenge ausgleichen.

Die Synthese des spezifisch an den Gastrinrezeptor bindenden MRT-Kontrastmittels soll in dieser Arbeit auf dem Wege der Festphasenpeptidsynthese (engl. solid phase peptide synthesis, SPPS) ausgehend von einem an ein Harz gebundenes Minigastrin erreicht werden. Die Vorteile und das allgemeine Vorgehen bei der Festphasenpeptidsynthese werden in einem gesonderten Kapitel dieser Arbeit genauer betrachtet (siehe Kapitel: Festphasenpeptidsynthese, SPPS).

Im Anschluss an die Synthese und die chromatographische Reinigung, mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography, HPLC), der vier verschiedenen Minigastrin-DTPA-Derivate wird ihre Bindung an den Gastrinrezeptor im Zellversuch evaluiert. Es werden gastrinrezeptorexprimierende Zellen verwendet und die Minigastrin-DTPA-Derivate werden hierzu radioaktiv mit In-111 markiert.

1.5 Festphasenpeptidsynthese, SPPS

Die Festphasenpeptidsynthese ist ein einfaches Verfahren zur Synthese von Peptiden basierend auf der wechselnden Zugabe von α -amino oder seitenkettengeschützten Aminosäuren zu unlöslichen, polymeren Supportern, dem Harz (engl. resin) (siehe Abbildung 13) [6, White].

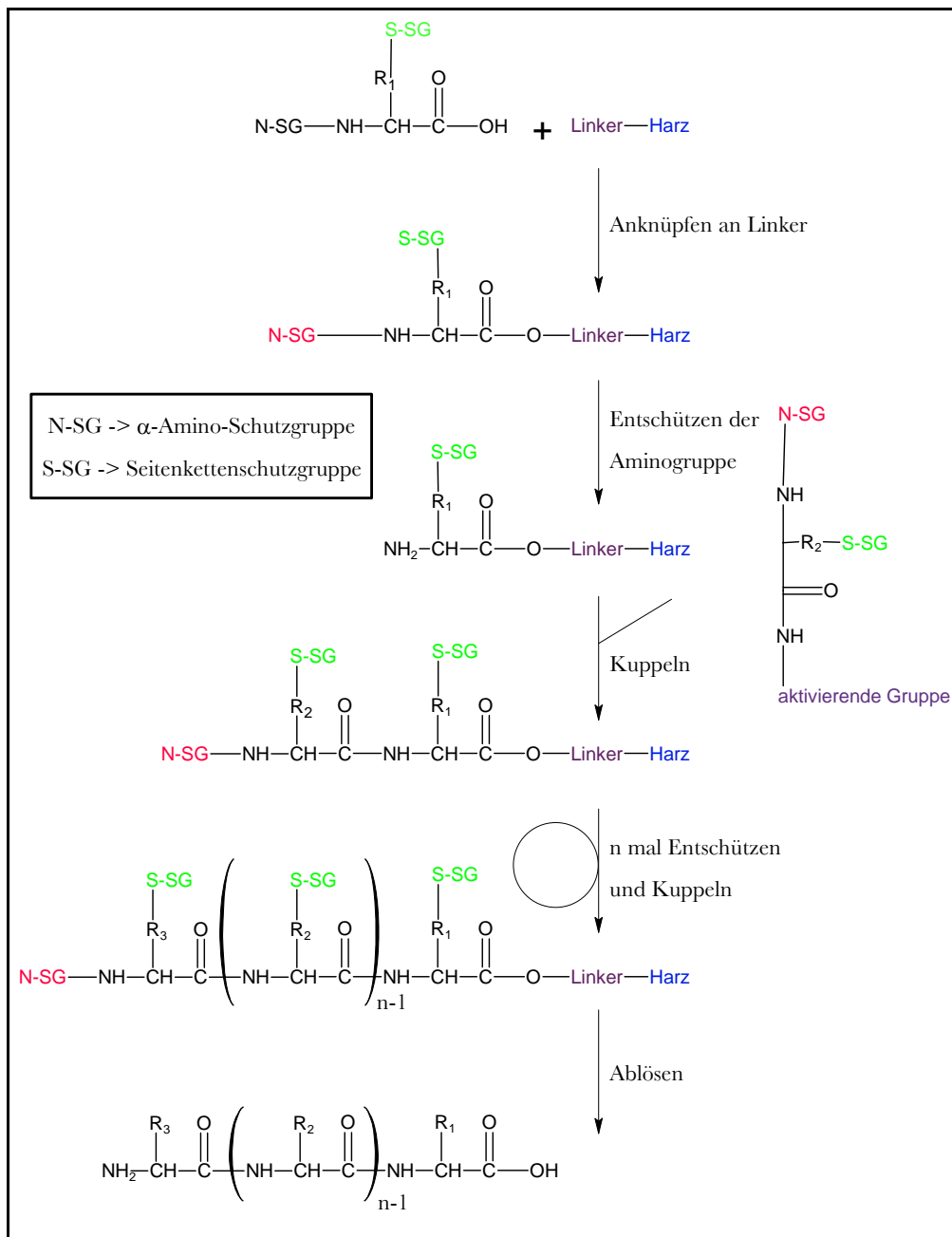


Abbildung 13: Allgemeines SPPS Schema

Bei der SPPS wird die Boc-Schutzgruppe (saure Abspaltung) oder die Fmoc-Schutzgruppe (basische Abspaltung) zum Schutz der α -Aminogruppe genutzt. Nach dem Entschützen wird die nächste geschützte Aminosäure addiert, entweder mit Hilfe eines Kupplungsreagenzes oder als aktiviertes, geschütztes Aminosäurederivat. Das resultierende Peptid ist an seinem C-terminalen Ende über einen Linker an das Harz gebunden und kann abhängig von dem Linker entweder als Amid oder als Säure vom Harz gelöst werden. Die Seitenkettenschutzgruppen werden oftmals so gewählt, dass sie im gleichen Arbeitsschritt, in dem die Ablösung des Peptids vom Harz erfolgt, entschützt werden.

Das Entschützen der Boc-Schutzgruppe (Tertiär-Butyloxycarbonyl, siehe Abbildung 14) wird durch die Zugabe von Trifluoressigsäure (TFA) erreicht, das der Fmoc-Schutzgruppe (9-Fluorenylmethoxycarbonyl) durch Piperidin.

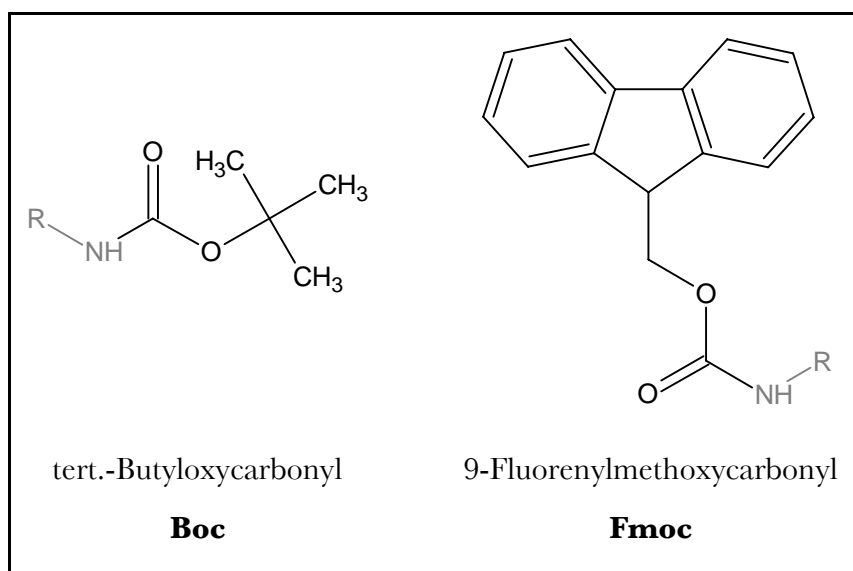


Abbildung 14: Schutzgruppen

Dichlormethan (DCM) und Dimethylformamid (DMF) sind bei der Festphasenpeptidsynthese die üblichen Lösungsmittel zum Entschützen, Waschen und Kuppeln. Die Peptidsynthese kann bei der SPPS auf zwei unterschiedlichen Wegen von statten gehen, im Batch-Mode oder im Continuous-Flow. Beim Batch-Mode befindet sich das Peptid-Harz in einem Filterreaktionsgefäß und die Reagenzien werden manuell hinzugegeben und entfernt. Bei der zweiten Methode befindet sich das Harz in einer Säule und sowohl die Lösungsmittel als auch die Reagenzien werden kontinuierlich durch diese Säule gepumpt.

Das endgültige Lösen vom Harz und die gleichzeitige Entfernung der Seitengruppenschutzgruppen erfordert bei der Boc-Variante starke Säuren, wie zum Beispiel Fluorwasserstoffsäure (HF) oder Trifluormethansulfonsäure (TFMSA), und Trifluoressigsäure (TFA) bei der Fmoc-Variante.

Die Fmoc-Strategie der SPPS wurde entwickelt um die Nachteile der Boc-Variante zu umgehen. So ist zum Entfernen der Boc-Schutzgruppe TFA von Nöten, das bei sensiblen Peptidbindungen zu Veränderungen führen kann. Desweiteren besteht bei der Verwendung von TFA die Möglichkeit von säurekatalysierten Nebenreaktionen, während bei der Fmoc-Variante nur mildes, basisches Piperidin zum Entschützen erforderlich ist und TFA nur bei der finalen Ablösung des Peptids vom Harz gebraucht wird. Ein weiterer Nachteil der Boc-Variante besteht in der Verwendung von Fluorwasserstoffsäure zum Ablösen des Peptids, die zum einen sehr gefährlich ist und zum anderen spezielles Laborequipment erfordert.

1.5.1 Allgemeine Standardvorgehensweise SPPS

Der folgende Abschnitt der Arbeit gibt einen kurzen Einblick in die Arbeitsabläufe bei der Festphasenpeptidsynthese. Die Kupplung der Aminosäuren, die verwendeten Lösungsmittel und die Reaktionskontrolle werden genauer vorgestellt.

1.5.1.1 Kupplung

Die effiziente Bildung einer Peptidbindung zwischen einer N- α -geschützten Aminosäure und einer an der Carboxylgruppe geschützten Aminosäure erfordert die chemische Aktivierung der Carboxylgruppe der N- α -geschützten Aminosäure, da es sonst nicht zur Knüpfung einer peptidischen Amidbindung zwischen diesen beiden Aminosäuren kommt. Vielmehr bilden sie in einer raschen Säure/Base-Reaktion ein Ammoniumcarboxylat. Die aktivierende Gruppe oder die Aktivierungsreaktion sollte sorgfältig gewählt werden, um zum einen hohe chemische Ausbeuten zu erreichen und zum anderen unbeabsichtigte Nebenreaktionen, wie zum Beispiel Stereoisomerisierung, zu vermeiden.

Bei der SPPS gibt es verschiedene Aktivierungstechniken, die zur stufenweisen Einführung von N- α -geschützten Aminosäuren verwendet werden:

- Carbodiimide
- Symmetrische Anhydride
- Aktivester
- Andere Kupplungsreagenzien zur in situ Aktivierung

Carbodiimide sind in der SPPS die gebräuchlichsten Reagenzien zur in situ Aktivierung. Im Verlauf dieser Arbeit wurde Dicyclohexylcarbodiimid (DCC, siehe Abbildung 15), das populärste Carbodiimid, verwendet. Die zusätzliche Gabe von N-Hydroxybenzotriazol (HOBt, siehe Abbildung 15) zur Aktivierungslösung vermeidet ungewollte Dehydrierung und wirkt zusätzlich als Katalysator (siehe Abbildung 16) [8, Brückner].

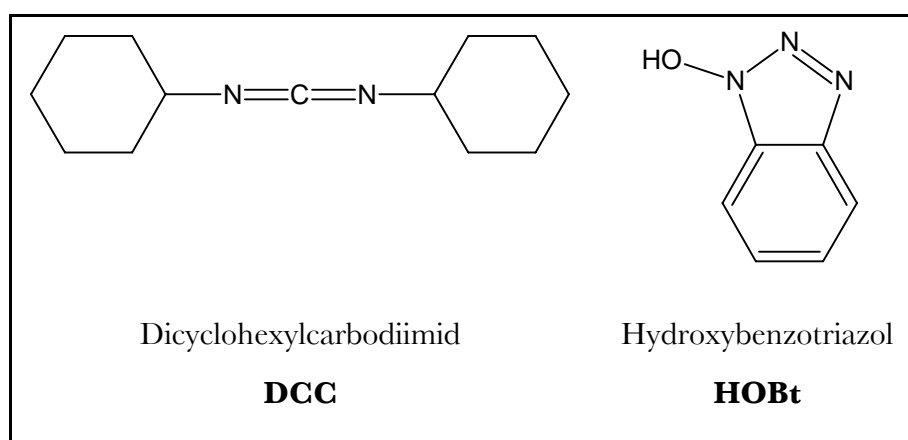


Abbildung 15: Kupplungsreagenzien

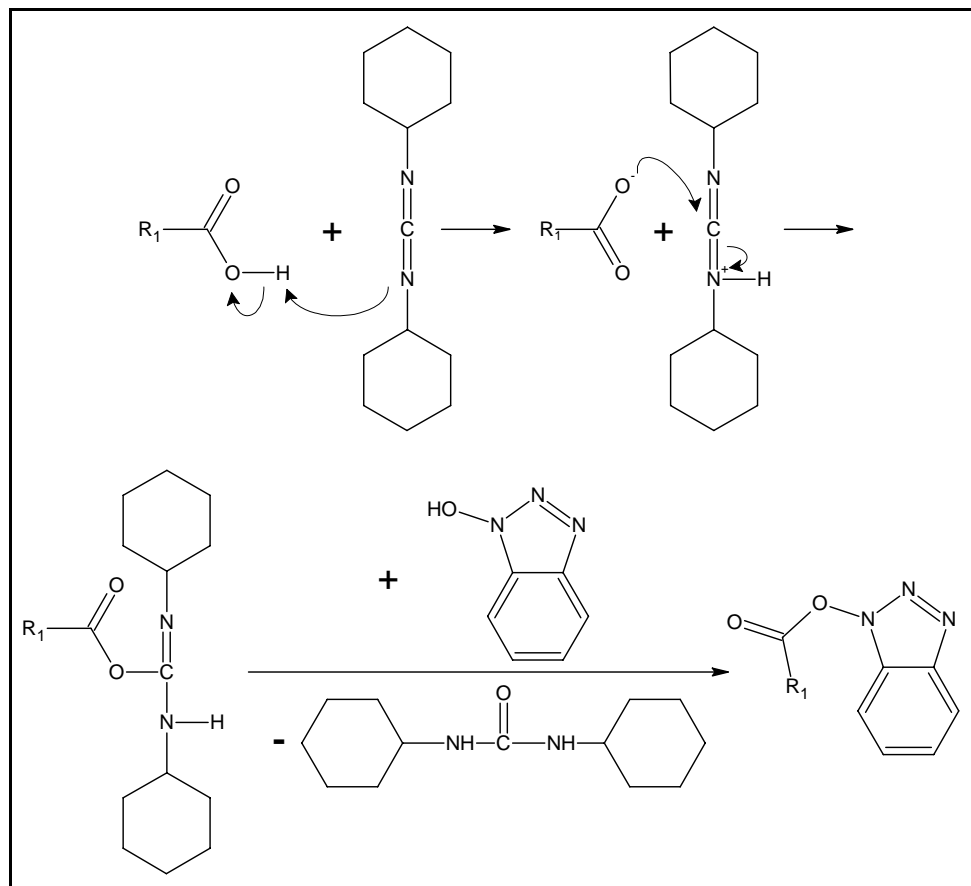


Abbildung 16: Aktivierung einer Carbonsäure mit DCC

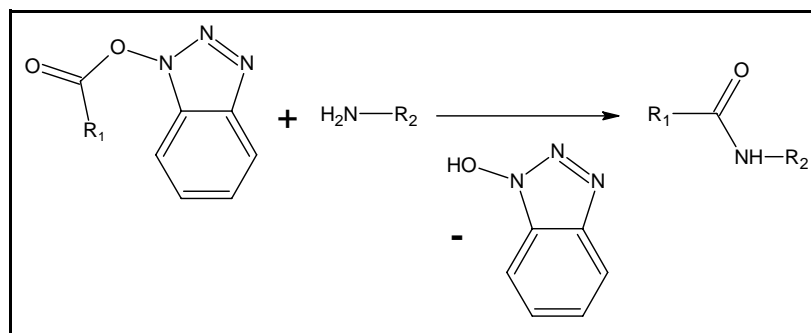


Abbildung 17: Knüpfung einer Peptidbindung

1.5.2 Lösungsmittel

Das in dieser Arbeit zur Festphasenpeptidsynthese verwendete Lösungsmittel ist ein Gemisch aus gleichen Teilen Dimethylformamid (DMF) und Dichlormethan. Bei der Verwendung von DMF zur SPPS ist darauf zu achten, dass es frei von Aminen ist, die die Fmoc-Schutzgruppe der zugefügten N- α -geschützten Aminosäure entfernen können. In diesem Fall kann es so zu

ungewollten Nebenreaktionen kommen, da die zugefügte Aminosäure nun auch eine freie Aminogruppe hat. Die Aminfreiheit des DMFs kann durch fraktionierte Destillation im Hochvakuum sichergestellt werden.

1.5.3 Reaktionskontrolle

Bei der Festphasenpeptidsynthese bedient man sich zur Reaktionskontrolle einfacher Farbreaktionen. Der gebräuchlichste Test zur Ermittlung der Vollständigkeit der Aminosäurekupplung nach jedem Reaktionsschritt der Festphasenpeptidsynthese wurde von E. Kaiser entwickelt [7,Kaiser].

Um die Bildung von unvollständigen Peptidketten bei der Festphasenpeptidsynthese zu vermeiden, müssen die terminalen Aminogruppen vollständig mit dem N- α -amino-geschützten Aminosäurederivat gekuppelt sein. Bleiben freie Aminogruppen zurück, muss die Kupplungsreaktion wiederholt werden. Deshalb ist die Entdeckung von unreaktierten, terminalen Aminogruppen bei der kontrollierten Synthese von Peptiden mit der Festphasenmethode von entscheidender Bedeutung.

Der Kaisertest ist ein schneller und sensitiver Farbttest mit der Fähigkeit zu bestimmen, ob mehr als 99% der terminalen Aminogruppen reagiert haben. Der Test basiert auf der Reaktion von Ninhydrin mit kleinen Proben des Peptidharzes und zeigt beim Vorhandensein von freien Aminogruppen einer typische dunkelblaue Färbung (siehe Abbildung 18).

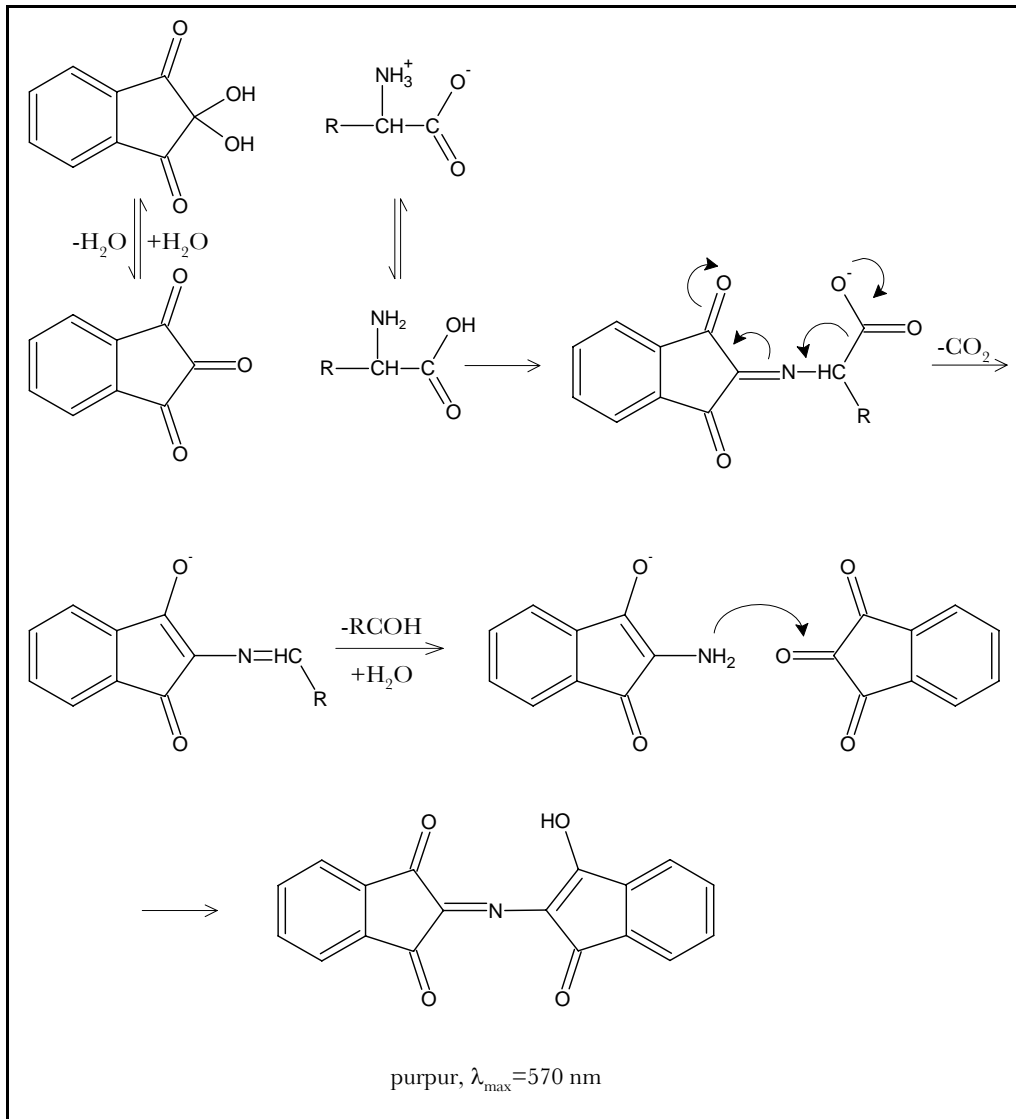


Abbildung 18: Kaiser-Test

2 Experimenteller Teil

2.1 Synthese der Gastrin-DTPA-Derivate

Folgende Gastrin-DTPA-Derivate (siehe Tabelle 3) wurden mittels Festphasenpeptidsynthese synthetisiert.

Name	„Struktur“
Ast-1	Gastrin-Lys-DTPA ₂
Ast-2	Gastrin-Lys ₃ -DTPA ₄
Ast-3	Gastrin-Lys ₇ -DTPA ₈
Ast-4	Gastrin-Lys ₁₅ -DTPA ₁₆

Tabelle 3: Synthetisierte

Die Synthese für das Minigastrin-DTPA-Derivat Ast-1 lief nach dem folgenden Schema ab.

1. Harz-Gastrin und Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH Kopplung
2. Kaisertest
3. Entschützen
4. Harz-Gastrin-Lys-(NH₂)₂ mit DTPA-Koppeln
5. Gastrin-DTPA-Derivat vom Harz lösen

Um die anderen drei Gastrin-DTPA-Derivate (Ast-2 bis Ast-4) zu synthetisieren, wurden die Schritte 1 bis 3 entsprechend oft wiederholt.

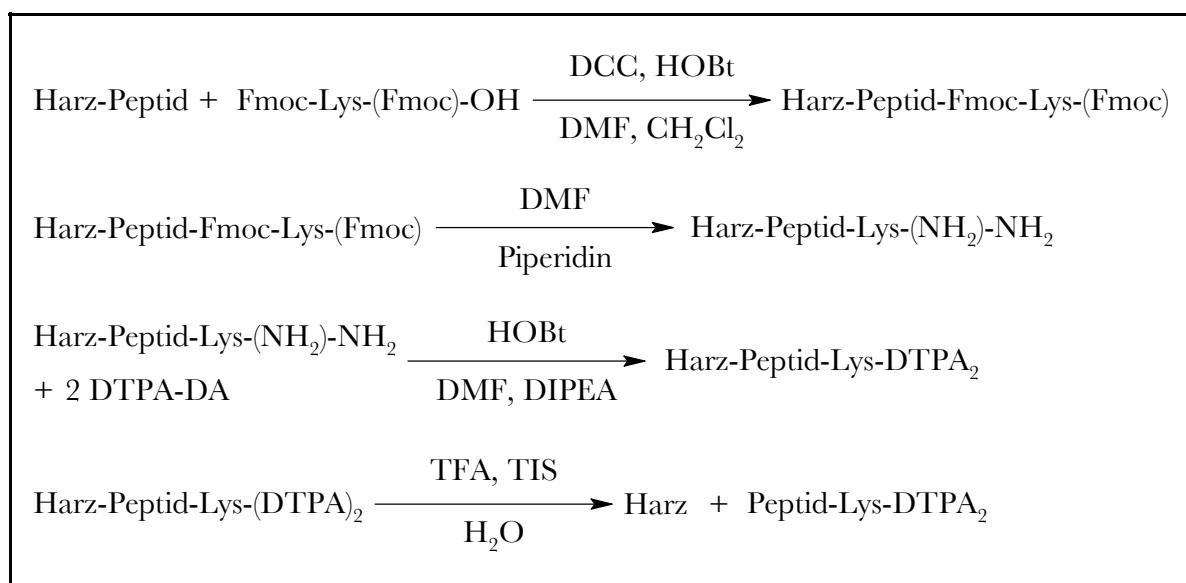
2.1.1 Synthese Ast-1 (Gastrin-Lys-DTPA₂)

Abbildung 17: Schematischer Syntheseweg Ast-1

Bei dieser Synthese wurde von $10 \cdot 10^{-3}$ g Harz ausgegangen, was einer Gastrinmenge von $5 \cdot 10^{-6}$ mol entspricht.

Zunächst wurden 5 Äquivalente (eq, $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol, 14,77 mg) Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH und 5 eq (3,38 mg) HOBt in 1,0 mL DMF/CH₂Cl₂ (1:1) gelöst. Zur Lösung wurden 5 eq DCC (5,16 mg) gegeben und anschließend wurde 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Lösung wurde dann zum Harz gegeben und das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Da der nach zweimaligem Waschen mit 500 µL EtOH durchgeführte Kaisertest noch freie Aminogruppen zeigte, wurde die Reaktion mit weiteren 5 eq Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH, HOBt und DCC wiederholt. Der im Anschluss an diese Wiederholung durchgeführte Kaisertest zeigte keine freien Aminogruppen mehr.

Zum Entschützen der Fmoc-geschützten Aminogruppen wurden 400 µL DMF und 100 µL Piperidin zum Harz gegeben und 3 min geschüttelt. Der zur Kontrolle durchgeführte Kaisertest zeigte keine Aminogruppen, so dass das Entschützen zweimal in gleicher Weise und einmal über Nacht wiederholt wurde. Der anschließende Kaisertest zeigte freie Aminogruppen.

Zum Harz in 500 µL DMF und 200 µL DIPEA wurden nun 2 x 5 eq DTPA-DA (17,87 mg) gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Nachdem mit 500 µL DMF und 200 µL DIPEA gewaschen wurde, zeigte ein Kaisertest freie Aminogruppen. Die Reaktion

wurde daraufhin zwei mal wiederholt. Da der Kaisertest immer noch freie Aminogruppen nachwies, wurde die Reaktion mit 31,6 mg DTPA-DA und etwas (Spatelspitze) HOBT mit verlängerter Reaktionszeit (über Nacht) wiederholt. Der folgende Kaisertest zeigte keine freien Aminogruppen mehr.

Mit 1000 μL TFA, 50 μl H_2O und 20 μl TIS wurde anschließend über Nacht geschüttelt, um das synthetisierte Minigastrin-DTPA-Derivat vom Harz zu lösen. Die Reaktionslösung wurde dann über eine Fritte in eiskalten Diethylether filtriert und der Filtrückstand wurde mit etwas TFA gewaschen. In dem Diethylether zeigte sich das Minigastrin-DTPA-Derivat als weißer, schleimiger Niederschlag. Das Reaktionsprodukt wurde fünf mal mit Diethylether gewaschen, um TFA-Reste zu entfernen. Nachdem das Minigastrin-DTPA-Derivat (Ast-1) bei Raumtemperatur getrocknet worden war, wurde es im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

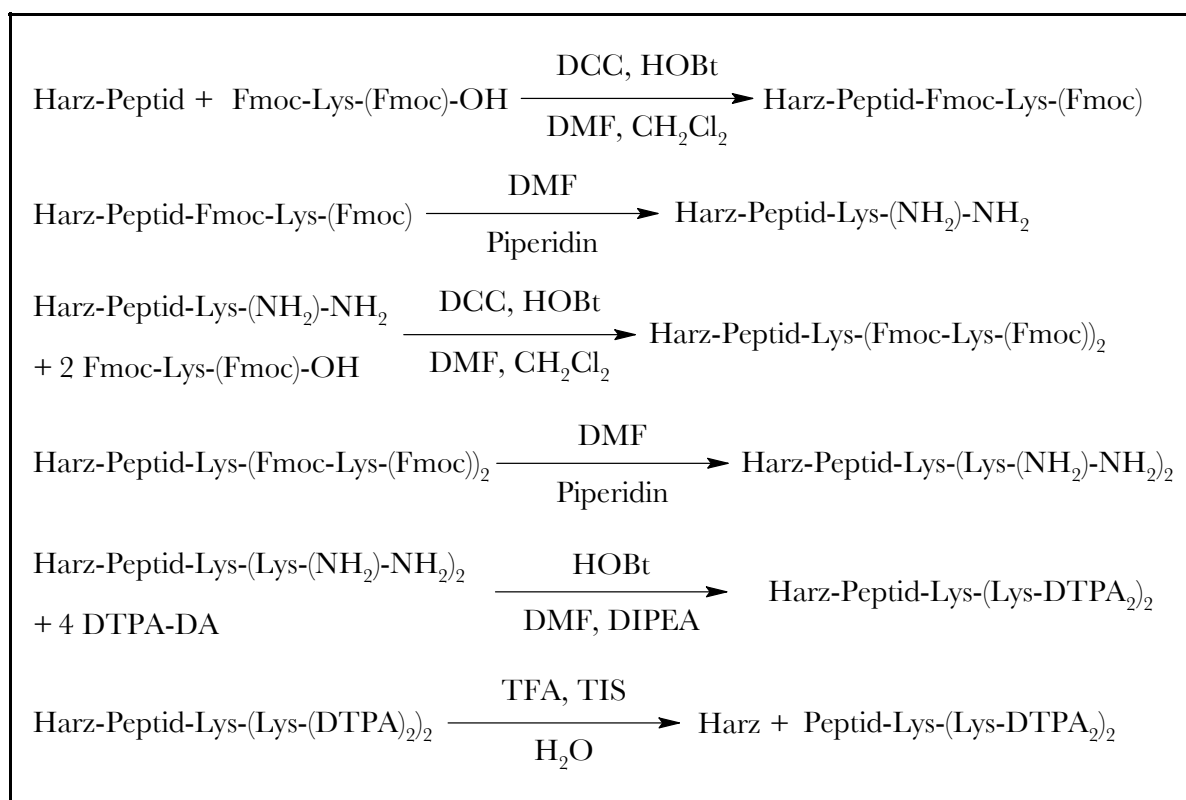
2.1.1.2 Synthese Ast-2 (Gastrin-Lys-(Lys-DTPA₂)₂)

Abbildung 18: Schematischer Syntheseweg Ast-2

Bei dieser Synthese zum Aufbau von Ast-2 wurde von $5 \cdot 10^{-6}$ mol Gastrin (9,9 mg Harz) ausgegangen.

Zunächst wurden 5 eq (15,2 mg) Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH und 5 eq (4,2 mg) HOBt in 1,0 mL DMF/CH₂Cl₂ (1:1) gelöst. Zur Lösung wurden 5 eq DCC (5,7 mg) gegeben und anschließend 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Lösung wurde dann zum Harz gegeben und das Reaktionsgemisch 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Da der durchgeführte Kaisertest noch freie Aminogruppen zeigte, wurde die Reaktion mit weiteren 5 eq Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH, HOBt und DCC wiederholt. Der im Anschluss durchgeführte Kaisertest zeigte freie Aminogruppen. Nach einer weiteren Wiederholung waren keine Aminogruppen mehr nachweisbar.

Zum Entschützen der Fmoc-geschützten Aminogruppen wurden 400 μ L DMF und 100 μ L Piperidin zum Harz gegeben und 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Entschützen wurde zweimal in gleicher Weise wiederholt. Der anschließende Kaisertest zeigte Aminogruppen, so dass mit dem Aufbau des zweiten Astes begonnen wurde.

Hierzu wurden 10 eq (29,7 mg) Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH, 10 eq (6,7 mg) HOBt und 10 eq (12,3 mg) DCC 3 h bei Raumtemperatur in 1,0 mL DMF/CH₂Cl₂ (1:1) geschüttelt. Der anschließende Kaisertest zeigte keine freien Aminogruppen.

Zum Entschützen der Fmoc-geschützten Aminogruppen wurde 1 h mit 400 µL DMF und 100 µL Piperidin bei Raumtemperatur geschüttelt und danach mit 1,0 mL DMF gewaschen. Der nach dreimaliger Wiederholung des Entschützens durchgeführte Kaisertest zeigte freie Aminogruppen.

Zum Harz in 750 µL DMF und 300 µL DIPEA wurden eine Spatelspitze HOBt und 20 eq DTPA-DA (41,2 mg) gegeben und 48 h bei Raumtemperatur geschüttelt, um das DTPA an das Grundgerüst von Ast-2 zu koppeln. Nachdem mit 750 µL DMF und 300 µL DIPEA gewaschen, mit der gleichen Menge 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend mit 750 µL EtOH gewaschen wurde, zeigte ein Kaisertest keine freien Aminogruppen mehr.

Mit 1800 µL TFA, 200 µL H₂O und 50 µL TIS wurde anschließend 12 h bei Raumtemperatur geschüttelt, um das synthetisierte Minigastrin-DTPA-Derivat vom Harz zu lösen. Nach Zugabe weiterer 200 µL TIS wurde weitere 1,5 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Reaktionslösung wurde dann über eine Fritte in eiskalten Diethylether filtriert und der Filtrückstand wurde mit etwas TFA gewaschen. In dem Diethylether zeigte sich das Minigastrin-DTPA-Derivat als weißer, schleimiger Niederschlag. Das Reaktionsprodukt wurde fünf mal mit Diethylether gewaschen, um TFA-Reste zu entfernen. Nachdem das Minigastrin-DTPA-Derivat (Ast-2) bei RT getrocknet worden war, wurde es im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

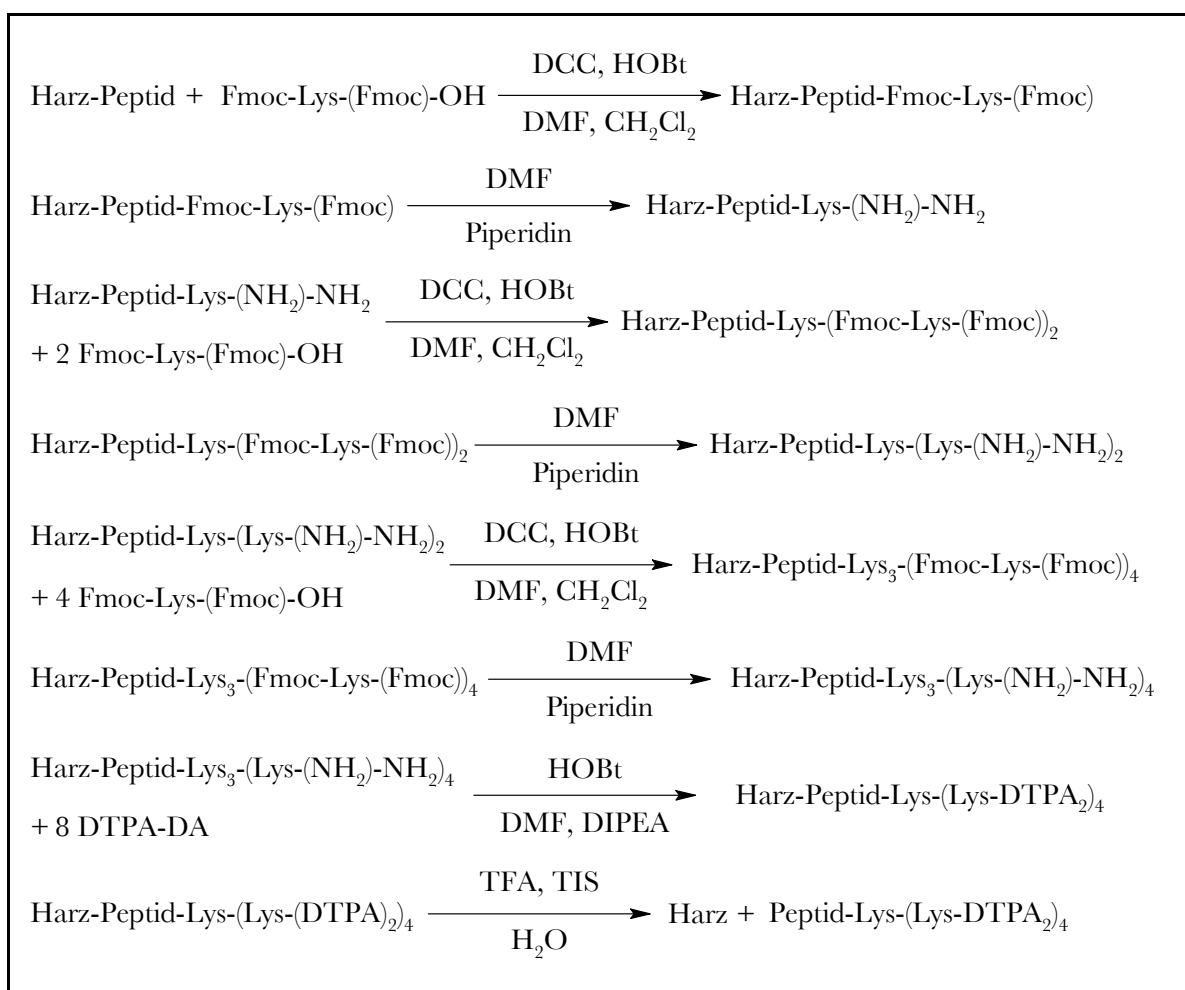
2.1.3 Synthese Ast-3 (Gastrin-Lys₇-DTPA₈)

Abbildung 19: Schematischer Syntheseweg Ast-3

Bei dieser Synthese zum Aufbau von Ast-3 wurde von $1,24 \cdot 10^{-5}$ mol Gastrin (24,86 mg Harz) ausgegangen. Zunächst wurden 5 eq (36,7 mg) Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH und 5 eq (8,4 mg) HOBt in 2,0 mL DMF/CH₂Cl₂ (1:1) gelöst. Zur Lösung wurden 5 eq DCC (12,8 mg) gegeben und anschließend wurde 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Lösung wurde dann zum Harz gegeben und das Reaktionsgemisch 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Harz wurde im Anschluss mit EtOH gewaschen und die Reaktion zwei weitere Male mit je 10 eq Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH, HOBt und DCC wiederholt. Da der dann durchgeführte Kaisertest noch freie Aminogruppen zeigte, wurde die Reaktion mit weiteren 5 eq Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH, HOBt und DCC wiederholt. Der nun durchgeführte Kaisertest zeigte keine freien Aminogruppen.

Zum Entschützen der Fmoc-geschützten Aminogruppen wurden drei mal 800 µL DMF und 200 µL Piperidin zum Harz gegeben und jeweils 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt und

dann mit EtOH gewaschen. Das Entschützen wurde einmal für 1 h und einmal über Nacht wiederholt.

Zum Aufbau des nächsten Astes wurden zwei Mal je 10 eq Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH, HOBt und DCC gelöst in 2,0 mL DMF/CH₂Cl₂ (1:1) für 2 h bzw. 13 h bei Raumtemperatur zum Harz gegeben und geschüttelt. Nachdem das Harz mit EtOH gewaschen worden ist, wurde die Reaktion einmal für 2 h mit je 5 eq Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH, HOBt und DCC wiederholt. Der anschließende Kaisertest zeigte keine Aminogruppen, so dass mit dem Entschützen der Aminogruppen fortgeföhren werden konnte.

Zum Aufbau des dritten Astes wurde das Harz 3 x 10 min und einmal über Nacht mit je 800 µL DMF und 200 µL Piperidin behandelt. Im Anschluss wurde wieder mit EtOH gewaschen und dann mit dem Aufbau des dritten Astes begonnen.

Hierzu wurde das Harz zweimal mit je 10 eq Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH, HOBt und DCC 24 h bei Raumtemperatur in 2,0 mL DMF/CH₂Cl₂ (1:1) geschüttelt und anschließend mit EtOH gewaschen. Die Reaktion wurde einmal für 2 h wiederholt. Der folgende Kaisertest zeigte keine freien Aminogruppen.

Zum Entschützen der Fmoc-geschützen Aminogruppen wurde 2 x 10 min, 1 x 30 min, 1 x 2 h und 1 x 18 h mit je 800 µL DMF und 200 µL Piperidin bei Raumtemperatur geschüttelt und danach mit EtOH gewaschen.

Um nun das DTPA an die freien Aminogruppen des Grundgerüstes von Ast-3 zu koppeln, wurden 1000 µL DMF, 400 µL DIPEA, eine Spatelspitze HOBt und 10 eq DTPA-DA zum Harz gegeben und 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Der nach erfolgtem Waschen mit EtOH durchgeführte Kaisertest zeigte freie Aminogruppen, so dass die Reaktion zwei weitere Male durchgeführt wurde. Danach waren keine freien Aminogruppen nachweisbar.

Mit 1000 µL TFA, 50 µL H₂O und 50 µL TIS wurde anschließend 15 h bei Raumtemperatur geschüttelt, um das synthetisierte Minigastrin-DTPA-Derivat vom Harz zu lösen. Nach Zugabe weiterer 300 µL TIS bis zur nahezu vollständigen Entfärbung der Lösung wurde die Reaktionslösung über eine Fritte in eiskalten Diethylether filtriert und der Filtrerrückstand mit etwas TFA gewaschen. In dem Diethylether zeigte sich das Minigastrin-DTPA-Derivat als weißer, schleimiger Niederschlag. Das Reaktionsprodukt wurde fünf mal mit Diethylether

gewaschen um TFA-Reste zu entfernen. Nachdem das Minigastrin-DTPA-Derivat (Ast-3) bei Raumtemperatur getrocknet worden war, wurde es im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

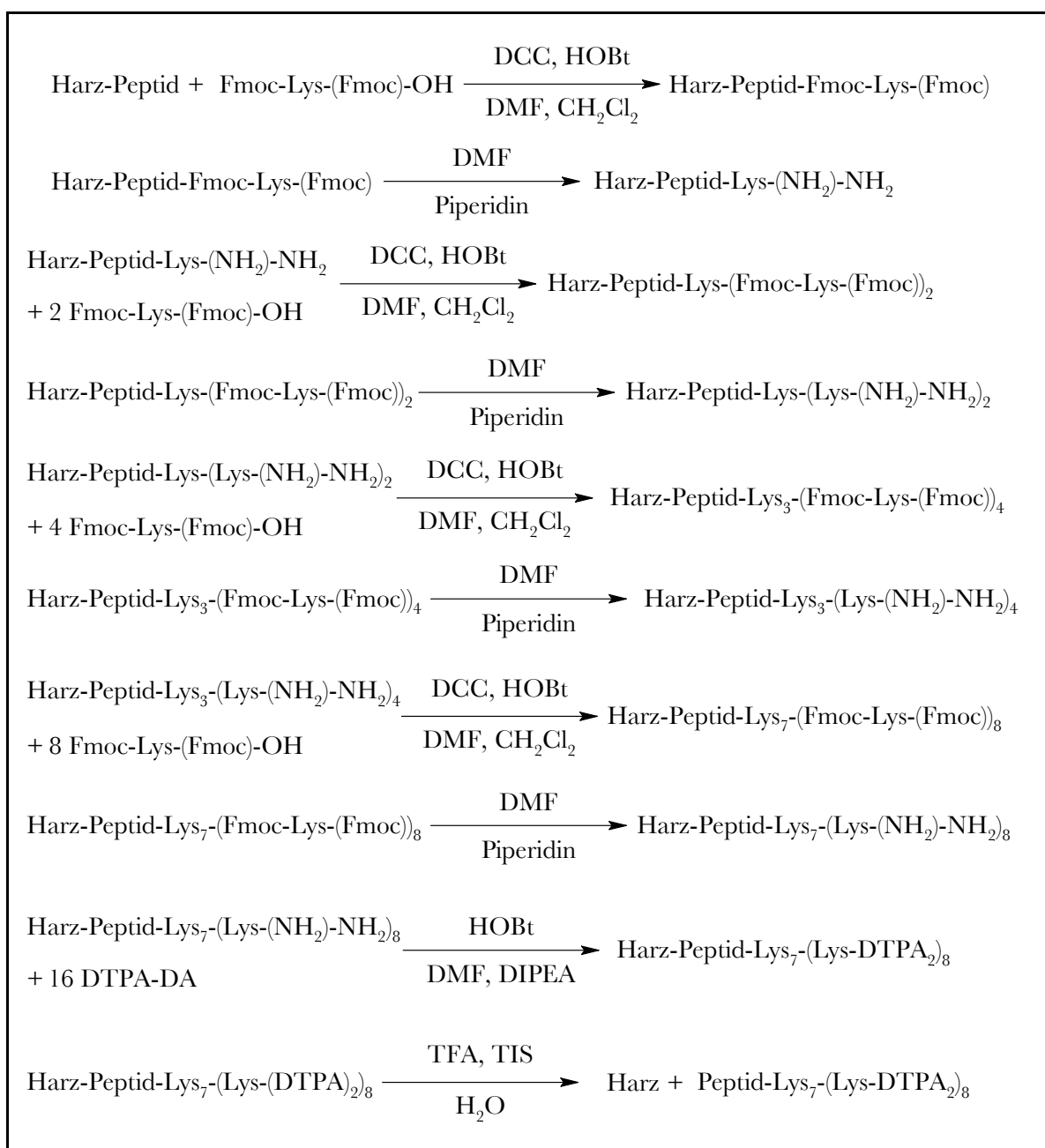
2.1.4 Synthese Ast-4 (Gastrin-Lys₁₅-DTPA₁₆)

Abbildung 20: Schematischer Syntheseweg Ast-4

Beim Aufbau des Gastrin-DTPA-Derivats Ast-4 wurde von $1,24 \cdot 10^{-5}$ mol Gastrin (24,86 mg Harz) ausgegangen. Zunächst wurden 5 eq (36,7 mg) Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH und 5 eq (8,4 mg) HOBt in 2,0 mL DMF/CH₂Cl₂ (1:1) gelöst. Zur Lösung wurden 5 eq DCC (12,8 mg) gegeben und anschließend wurde 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Lösung wurde dann zum Harz gegeben und das Reaktionsgemisch wurde 3,5 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Harz wurde im Anschluss 10 min mit EtOH gewaschen, mit DMF/CH₂Cl₂ (1:1) gespült und dann wurde die Reaktion vier Mal mit je 5 eq

Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH, HOBt und DCC wiederholt (Reaktionszeiten: 19 h, 3 h, 2 h und 14 h). Nach jeder Wiederholung wurde mit EtOH gewaschen und per Kaisertest auf freie Aminogruppen getestet. Nachdem keine freien Aminogruppen mehr nachgewiesen werden konnten, wurden die Fmoc-geschützten Aminogruppen 4 mal mit je 800 μL DMF und 200 μL Piperidin entschützt. Hierzu wurde zwei mal über 1 h, ein mal über 2 h und ein mal über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend mit EtOH gewaschen.

Zum Aufbau des zweiten Astes wurden vier Mal je 10 eq Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH, HOBt und DCC gelöst in 2,0 mL DMF/ CH_2Cl_2 (1:1) für 2 h, 3 h, 17 h bzw. 2 h bei Raumtemperatur zum Harz gegeben und geschüttelt. Nachdem das Harz mit EtOH gewaschen worden ist und ein Kaisertest noch freie Aminogruppen zeigte, wurde die Reaktion einmal für 2 h mit je 5 eq Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH, HOBt und DCC wiederholt. Der anschließende Kaisertest zeigte keine Aminogruppen, so dass mit dem Entschützen der Aminogruppen fortgefahren werden konnte.

Hierzu wurde das Harz 3 x 1 h und einmal über Nacht mit je 800 μL DMF und 200 μL Piperidin behandelt. Im Anschluss wurde wieder mit EtOH gewaschen und dann mit dem Aufbau des dritten Astes begonnen.

Das Harz wurde vier mal mit je 10 eq Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH, HOBt und DCC 2 h bei Raumtemperatur in 2,0 mL DMF/ CH_2Cl_2 (1:1) geschüttelt und anschließend mit EtOH gewaschen und DMF/ CH_2Cl_2 (1:1) gespült. Der folgende Kaisertest zeigte freie Aminogruppen, so dass die Reaktion vier weitere Male mit 10 eq Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH, HOBt und DCC bei Raumtemperatur in 2,0 mL DMF/ CH_2Cl_2 (1:1) wiederholt wurde. Nachdem mit dem im Anschluss durchgeführten Kaisertest keine freien Aminogruppen nachgewiesen werden konnten, wurden die Fmoc-geschützten Aminogruppen 3 x 1 h und 1 x über Nacht mit je 800 μL DMF und 200 μL Piperidin bei Raumtemperatur entschützt und danach mit EtOH gewaschen.

Der Aufbau des vierten Astes des Grundgerüsts erfolgte durch viermalige Reaktion bei Raumtemperatur von je 10 eq Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH, HOBt und DCC mit dem Harz in 2,0 mL DMF/ CH_2Cl_2 (1:1). Nachdem mit EtOH gewaschen wurde, zeigte ein Kaisertest keine freien Aminogruppen.

Die Fmoc-geschützten Aminogruppen wurden nun zum Entschützen vier mal mit je 800 μL DMF und 200 μL Piperidin bei Raumtemperatur behandelt und anschließend wurde mit EtOH gewaschen.

Um nun das DTPA an die freien Aminogruppen zu koppeln, wurden 1000 μL DMF, 200 μL DIPEA, eine Spatelspitze HOBt und 5 eq DTPA-DA je fünf mal zum Harz gegeben und bei Raumtemperatur geschüttelt. Der nach erfolgtem Waschen mit EtOH durchgeführte Kaisertest zeigte freie Aminogruppen, so dass die Reaktion ein weiteres Mal durchgeführt wurde. Danach waren keine freien Aminogruppen nachweisbar.

Mit 1000 μL TFA, 50 μl H_2O und 200 μl TIS wurde anschließend bei Raumtemperatur geschüttelt, um das synthetisierte Minigastrin-DTPA-Derivat vom Harz zu lösen. Die Reaktionslösung wurde über eine Fritte in eiskalten Diethylether filtriert und der Filtrerrückstand mit etwas TFA gewaschen. In dem Diethylether zeigte sich das Minigastrin-DTPA-Derivat als weißer, schleimiger Niederschlag. Das Reaktionsprodukt wurde fünf mal mit Diethylether gewaschen, um TFA-Reste zu entfernen. Nachdem das Minigastrin-DTPA-Derivat (Ast-4) bei Raumtemperatur getrocknet worden war, wurde es im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

2.1.5 Synthese Ast-1 (Gastrin-Lys-DTPA₂, 50 mg Harz)

Zur Synthese einer größeren Menge Ast-1 wurde von 50 mg Harz ausgegangen, was einer Gastrinmenge von $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol entspricht.

Zunächst wurden 5 eq ($12,5 \cdot 10^{-5}$ mol, 73,83 mg) Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH und 5 eq (16,21 mg) HOBt in je 1,0 mL DMF/CH₂Cl₂ (1:1) gelöst. Zur Lösung wurden 5 eq DCC (24,76 mg) gegeben und anschließend wurde 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Lösung wurde zum Harz gegeben und das Reaktionsgemisch 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde mit 5 mL EtOH gewaschen und mit 3,0 mL DMF gespült. Danach wurde die Reaktion drei mal mit je 5 eq Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH, HOBt und DCC wiederholt. Der im Anschluss an diese Wiederholung, nach Waschen mit 2 x 3,5 mL EtOH, durchgeführte Kaisertest zeigte keine freien Aminogruppen mehr.

Zum Entschützen der Fmoc-geschützten Aminogruppen wurden dreimal für 10 min und einmal über Nacht je 800 µL DMF und 200 µL Piperidin zum Harz gegeben und geschüttelt. Nachdem mit EtOH gewaschen und mit DMF gespült wurde, konnte mit der DTPA-Kupplung begonnen werden.

Zum Harz in 1,0 mL DMF und 400 µL DIPEA wurden nun 2 x 5 eq DTPA-DA (86,76 mg) gegeben und 48 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nachdem mit EtOH gewaschen und mit DMF gespült worden war, wurde die Reaktion mit einer Reaktionszeit von 2,5 h wiederholt. Der folgende Kaisertest zeigte keine freien Aminogruppen mehr.

Mit 1000 µL TFA, 50 µL H₂O und 200 µL TIS wurde anschließend über Nacht geschüttelt, um das synthetisierte Minigastrin-DTPA-Derivat vom Harz zu lösen. Die Reaktionslösung wurde dann über eine Fritte in eiskalten Diethylether filtriert und der Filtrerrückstand wurde mit etwas TFA gewaschen. In dem Diethylether zeigte sich das Minigastrin-DTPA-Derivat als weißer, schleimiger Niederschlag. Das Reaktionsprodukt wurde fünf mal mit Diethylether gewaschen um TFA-Reste zu entfernen. Nachdem das Minigastrin-DTPA-Derivat (Ast-1) bei RT getrocknet worden war, wurde es im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

2.1.6 Synthese Ast-2 (Gastrin-Lys₃-DTPA₄, 50 mg Harz)

Um auch von Ast-2 eine größere Menge zu synthetisieren, wurden 50 mg Harz, die einer Gastrinmenge von $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol entsprechen, verwendet.

Zunächst wurden 5 eq ($12,5 \cdot 10^{-5}$ mol, 73,83 mg) Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH und 5 eq (16,21 mg) HOBt in je 1,0 mL DMF/CH₂Cl₂ (1:1) gelöst. Zur Lösung wurden 5 eq DCC (24,76 mg) gegeben und anschließend 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Lösung wurde dann zum Harz gegeben und das Reaktionsgemisch 4 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde mit EtOH gewaschen und mit DMF gespült. Danach wurde die Reaktion drei mal mit je 5 eq Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH, HOBt und DCC wiederholt. Der im Anschluss an diese Wiederholungen und nach Waschen mit EtOH, durchgeführte Kaisertest zeigte keine freien Aminogruppen mehr.

Zum entschützen der Fmoc-geschützten Aminogruppen wurden zweimal für 30 min und einmal über Nacht mit je 800 µL DMF und 200 µL Piperidin geschüttelt. Nachdem mit EtOH gewaschen und mit DMF gespült worden war, konnte mit dem Aufbau des nächsten Astes des Grundgerüsts begonnen werden.

Hierzu wurden je 10 eq Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH, HOBt in 4,0 mL DMF/CH₂Cl₂ (1:1) zweimal über 2 Tage bei Raumtemperatur geschüttelt. Der anschließende Kaisertest zeigte keine freien Aminogruppen, so dass die Fmoc-geschützten Aminogruppen mit je 800 µL DMF und 200 µL Piperidin 3 x 30 min und einmal über Nacht entschützt wurden. Nachdem mit EtOH gewaschen und mit DMF gespült worden war, konnte mit der DTPA-Kupplung begonnen werden.

Zum Harz in 1,0 mL DMF und 400 µL DIPEA wurden 10 eq DTPA-DA gegeben und 3,5 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nachdem mit EtOH gewaschen und mit DMF gespült worden war, wurde die Reaktion mit einer Reaktionszeit von 12 h wiederholt. Der folgende Kaisertest zeigte keine freien Aminogruppen mehr.

Mit 1000 µL TFA, 50 µL H₂O und 200 µL TIS wurde anschließend über Nacht geschüttelt, um das synthetisierte Minigastrin-DTPA-Derivat vom Harz zu lösen. Die Reaktionslösung wurde dann über eine Fritte in eiskalten Diethylether filtriert und der Filtrückstand wurde mit etwas TFA gewaschen. In dem Diethylether zeigte sich das Minigastrin-DTPA-Derivat

als weißer, schleimiger Niederschlag. Das Reaktionsprodukt wurde fünf mal mit Diethylether gewaschen um TFA-Reste zu entfernen. Nachdem das Minigastrin-DTPA-Derivat (Ast-2) bei Raumtemperatur getrocknet worden war, wurde es im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

2.2 HPLC-Analyse der Rohprodukte

Von den synthetisierten Gastrin-DTPA-Derivaten Ast-1, Ast-2 und Minigastrin (Ast-0) wurden vor Beginn der Aufreinigung mittels HPLC analytische HPLC-Chromatogramme (siehe Abbildung 21) angefertigt um zu entscheiden, ob die gewünschten Produkte in ausreichender Menge im Rohprodukt enthalten sind.

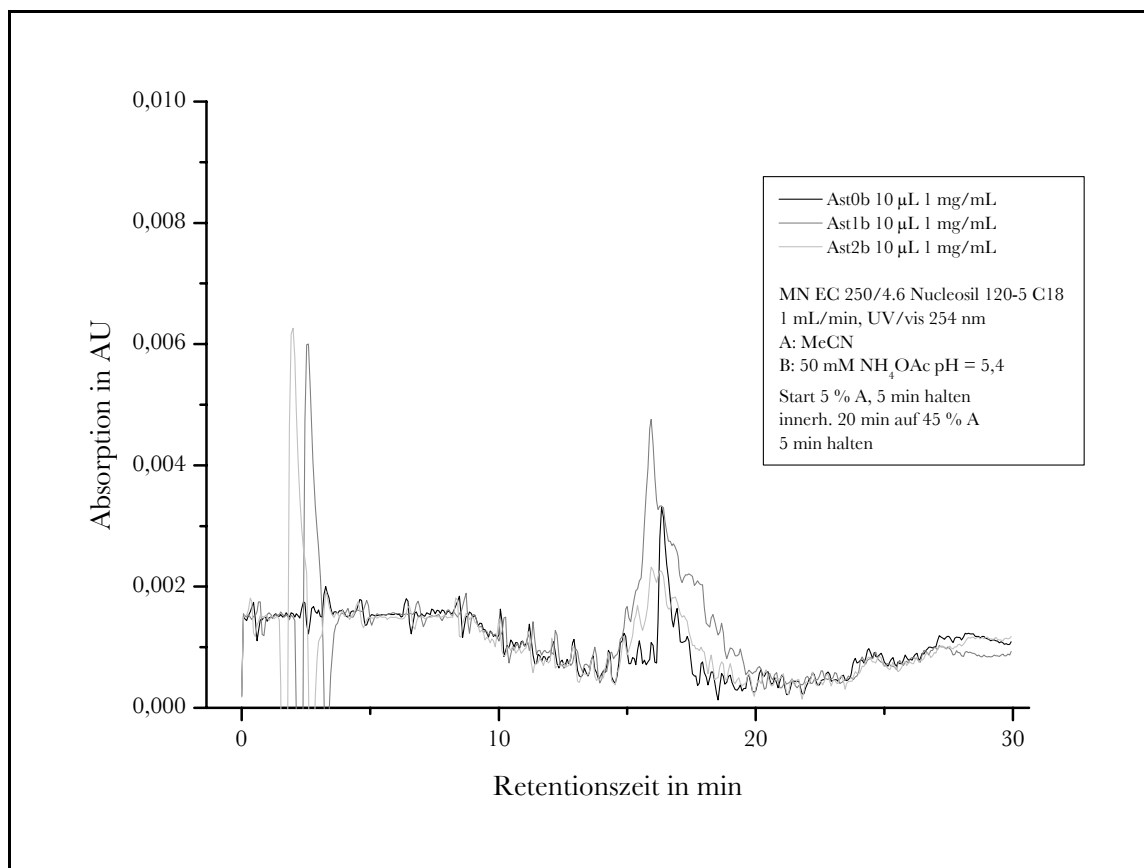


Abbildung 21: HPLC-Chromatogramme der Rohprodukte

Die HPLC-Chromatogramme zeigen durch die Peaks zwischen 15 und 20 min, dass sowohl Ast-1 als auch Ast-2 im Rohprodukt enthalten sind. Auf eine HPLC-Analyse der weiteren Rohprodukte wurde aus Zeitgründen verzichtet.

2.3 HPLC-Reinigung

Die HPLC-Reinigung der synthetisierten Gastrin-DTPA-Derivate wurde mit einem HPLC-System der Firma Waters (Pumpe: 2 x Modell 510, Automated Gradient Controller, Fraktionssammler: LKB-Bromma 2211 Superrac) durchgeführt. Die verwendete Säule war eine Machery-Nagel CC 250/4,6 Nucleosil 120-3 C18. Bei allen Reinigungsläufen wurde ein

Laufmittel-Gradient aus Acetonitril und NH_4OAc (0,05 M, $\text{pH}=5,4$) mit einer Flussrate von 1,0 mL pro min genutzt (siehe Abbildung 22).

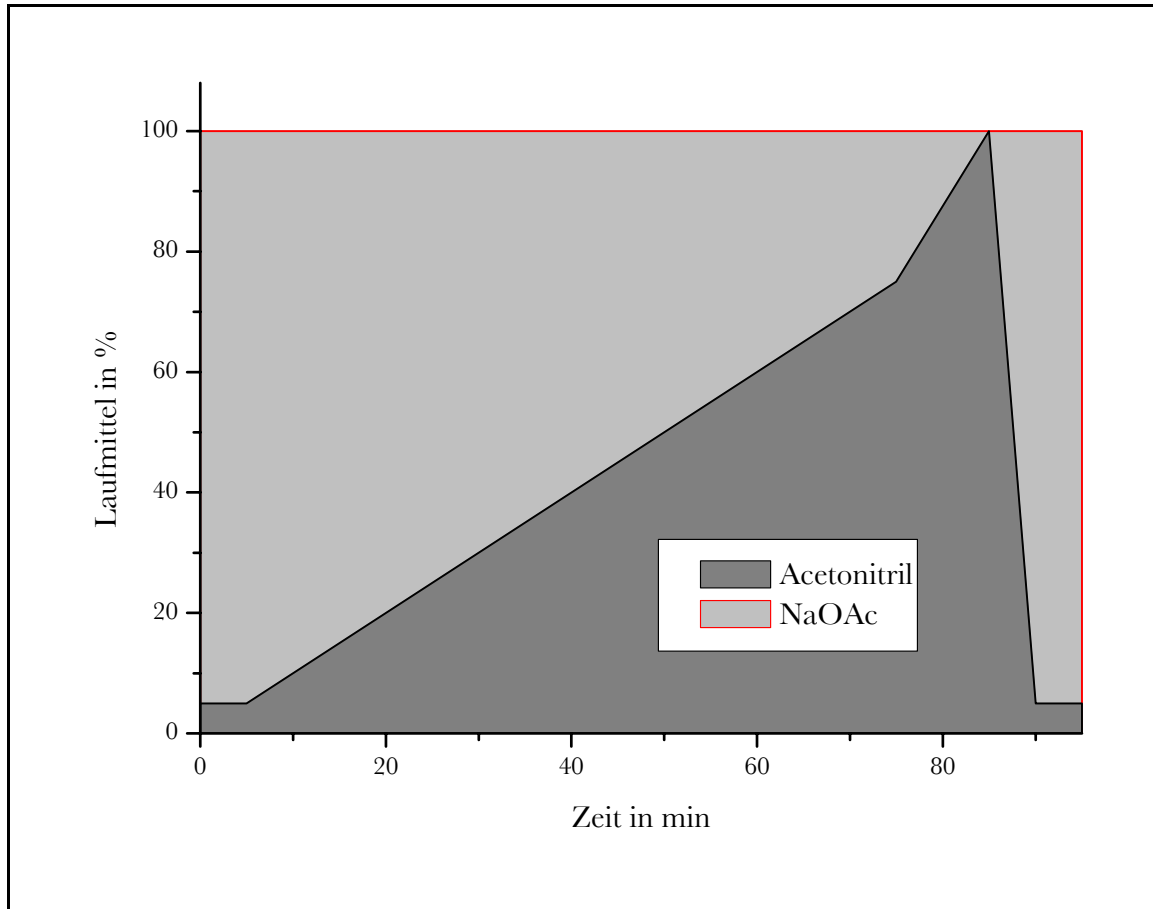


Abbildung 22: Laufmittel-Gradient der HPLC-Reinigung

Pro Reinigungslauf wurden 50 μl (ca. 1,0 mg) des jeweiligen Gastrin-DTPA-Derivats gelöst in H_2O und 450 μL NH_4OAc (0,05 M, $\text{pH}=5,4$) injiziert und es wurden 100 Fraktionen a 1,0 min gesammelt.

Die gesammelten Fraktionen wurden im Anschluss sowohl bei 280 nm, als auch bei 220 nm mit einem UV/Vis-Spektrometer (Amersham Pharmacia Biotech Ultrospec® 1000) auf ihren Gastrin-DTPA-Derivatgehalt untersucht. Als Beispiel sei hier eine UV/Vis-Untersuchung von Ast-1 bei 280 nm gezeigt (siehe Abbildung 23).

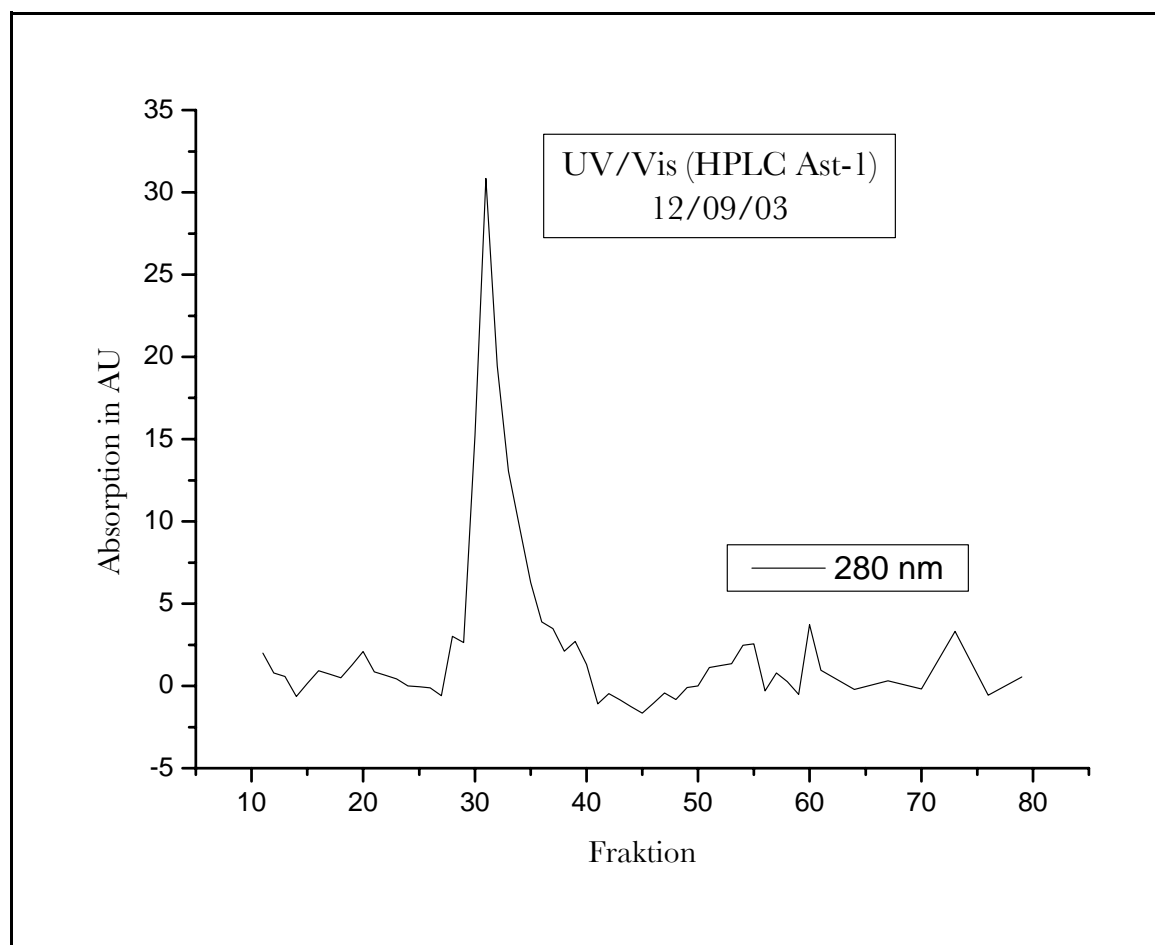


Abbildung 23: UV/Vis-Untersuchung eines HPLC-Reinigungslaufes von Ast-1

Nachdem die interessanten Fraktionen eines HPLC-Reinigungslaufes anhand der UV/Vis-Untersuchung ausgewählt worden sind, wurden sie zunächst in der SpeedVac® (Savant SPD101B) zur Trockne eingengt, in je 100 μL H_2O gelöst, vereinigt und anschließend lyophilisiert (Christ Alpha 1-2). Die lyophilisierten Proben wurden in jeweils 200 μL H_2O aufgenommen.

2.3.1 HPLC-Analysen der Aufreinigung

Von allen Proben der HPLC-Reinigungsläufe wurden mit dem HPLC-System der Firma BioTek (BioTek-Instruments: Pumpe 525, HPLC-Detector 535; Packard: Flow Scintillation Analyzer) analytische HPLC-Läufe durchgeführt, um den Erfolg der HPLC-Reinigung zu überprüfen. Hierzu wurden der Probe jeweils 30 μL entnommen, mit 70 μL TFA (0,1 %) verdünnt und mit einem Gradienten aus Acetonitril und TFA (0,1 %) (siehe Abbildung 24) analysiert.

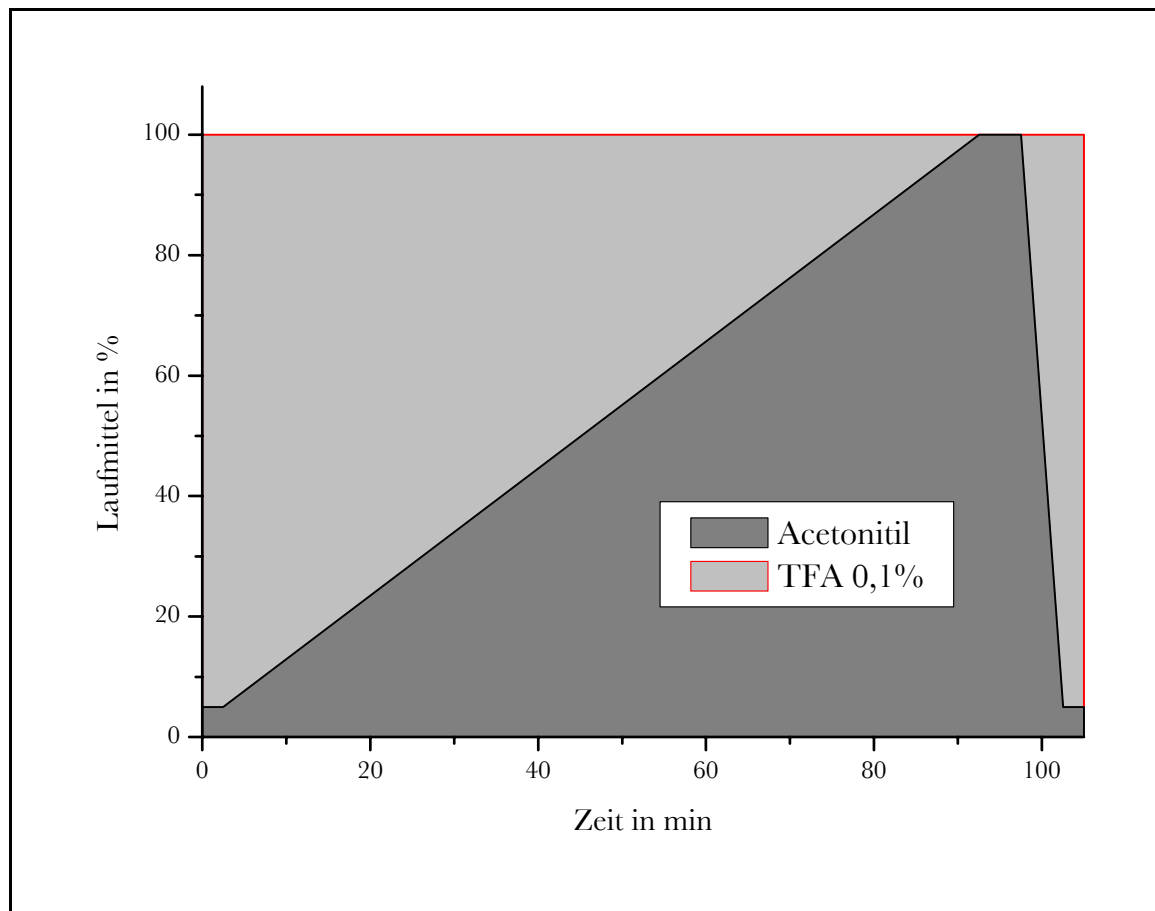


Abbildung 24: Laufmittel-Gradient der analytischen HPLC-Läufe

Nachdem die Produkte aller HPLC-Reinigungsläufe in dieser Art und Weise analysiert worden sind und die Einheitlichkeit der Proben festgestellt worden ist, wurden die Proben der einzelnen Gastrin-DTPA-Derivate vereinigt und lyophilisiert.

2.3.2 Konzentrationsbestimmung

Die lyophilisierten Gastrin-DTPA-Derivate (Ast-3 und Ast-4) wurden in je 200 μL H_2O , die der 50 mg Ansätze (Ast-1 und Ast-2) wurden in 500 μL H_2O gelöst. Von den kleinen Ansätzen (Ast-1 und Ast-2) wurden keine Konzentrationen bestimmt, da diese Substanzen in der Zwischenzeit für Vorversuche aufgebraucht worden waren.

Für die Konzentrationsbestimmung der einzelnen Gastrin-DTPA-Derivate wurden von den gereinigten, vereinigten Substanzen und von einer Minigastrin-Probe bekannter Konzentration analytische HPLC-Läufe angefertigt und anschließend wurde durch den Vergleich der Peakflächen die Konzentration errechnet. Die Chromatogramme der

Konzentrationsbestimmung sind im folgenden Diagramm gegenübergestellt (siehe Abbildung 25).

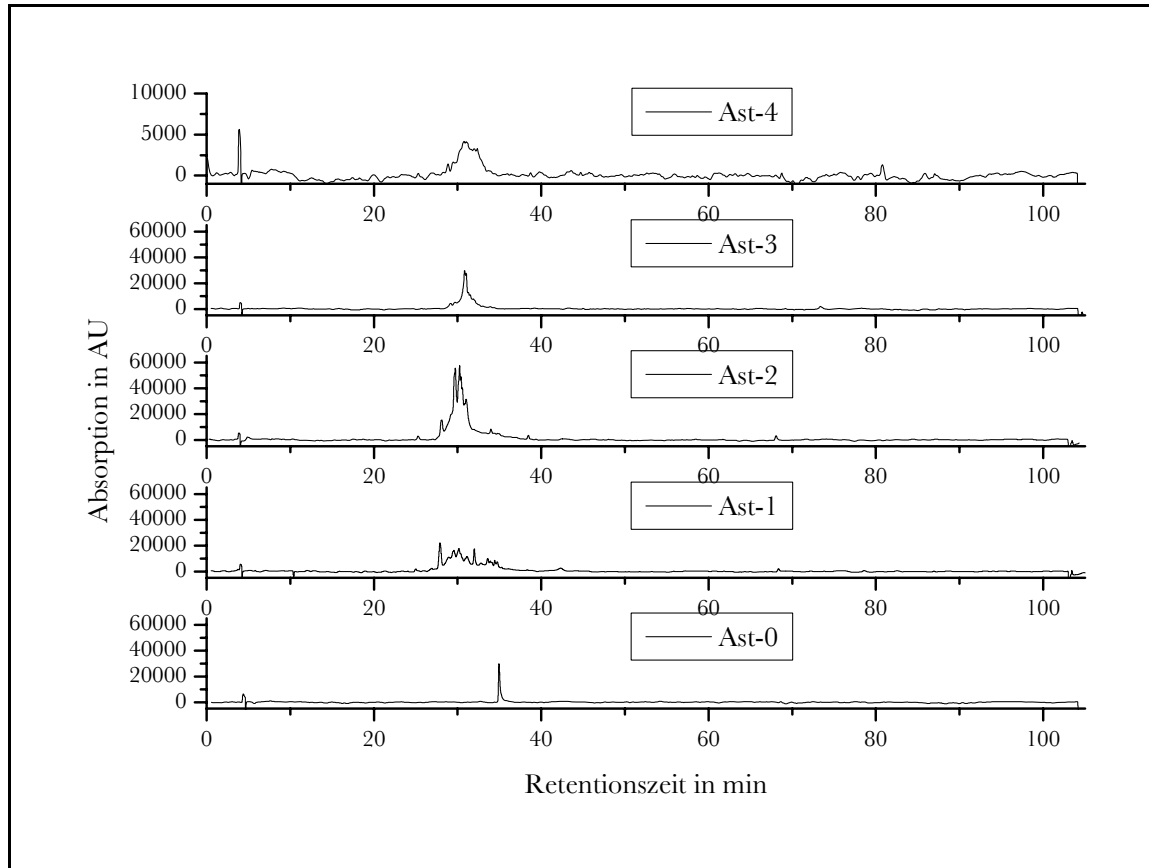


Abbildung 25: HPLC-Chromatogramme der Konzentrationsbestimmung

Die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung sind in Tabelle 4 gezeigt.

Peptid	Ast-0	Ast-1	Ast-2	Ast-3	Ast-4
Volumen in L	5,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	2,00E-05	2,00E-05
Peakfläche 280 nm	8.225,00	73.608,94	120.755,18	36.563,31	12.376,40
Stoffmenge in mol	5,06E-09	4,53E-08	7,43E-08	2,25E-08	7,61E-09
Konzentration in mol/L	1,01E-03	4,53E-03	7,43E-03	1,12E-03	3,81E-04
Peakfläche 220 nm	54.799,11	398.851,02	757.671,06	230.715,11	77.272,39
Stoffmenge in mol	5,06E-09	3,68E-08	7,00E-08	2,13E-08	7,14E-09
Konzentration in mol/L	1,01E-03	3,68E-03	7,00E-03	1,07E-03	3,57E-04

Tabelle 4: Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung
(Peakflächen in arbitrary units)

Bei allen weiteren Berechnungen, bei denen die Konzentration der Gastrin-DTPA-Derivate benötigt wurde, wurde die geringeren errechneten Konzentrationen aus der Detektion bei 220 nm verwendet.

2.3.3 HPLC-Analyse der radioaktiv markierten Gastrin-DTPA-Derivate

Es wurden jeweils 2,0 µL Minigastrin-DTPA-Derivat, 50 µL NaOAc (0,5 M, pH=5,4) und $3,7 \cdot 10^6$ Bq In-111 30 min bei 37°C inkubiert, um das Minigastrin-DTPA-Derivat radioaktiv zu markieren. 10 µl der jeweiligen Markierungslösung wurden mit TFA (0,1%) auf 100 µL aufgefüllt und dann mit Gradient-3 (Laufmittel-A: TFA 0,1 %, Laufmittel-B: MeCN, Gradient 0-5 min 95% A, 20-25 min 0% A, 30-35 min 95 % A, Flussrate 1 mL/min) am BioTek-HPLC-System gemessen. Die Chromatogramme der radioaktiven Detektion (siehe Abbildung 26) zeigen, dass alle Gastrin-DTPA-Derivate sehr gut zu markieren sind.

In den Chromatogrammen sind bei den Minigastrin-DTPA-Derivaten nur zwischen 15 und 16 min Peaks zu sehen, die vom Komplexierten In-111 herrühren. Freies, unkomplexiertes In-111 konnte nicht festgestellt werden.

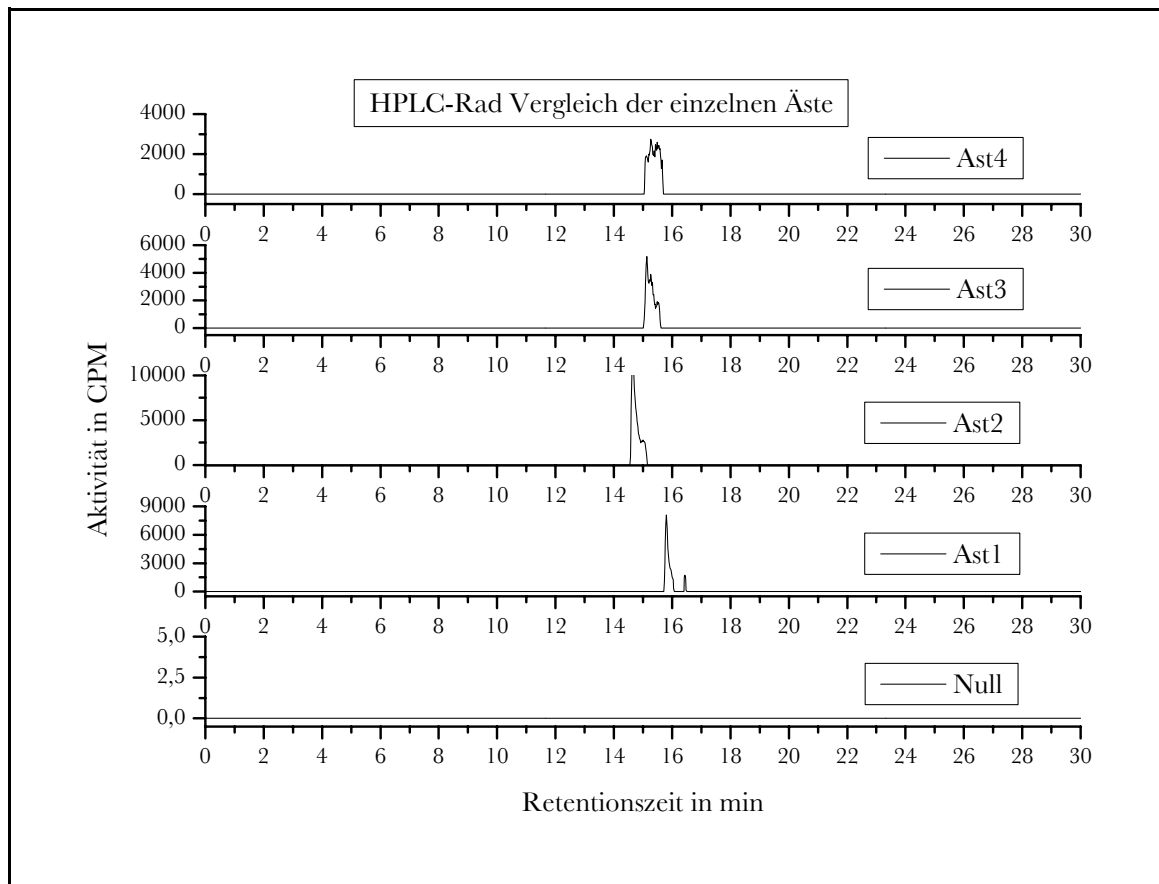


Abbildung 26: HPLC-Chromatogramme der radioaktiv markierten Gastrin-DTPA-Derivate

2.4 Bindungsstudien

Die synthetisierten Gastrin-DTPA-Derivate wurden hinsichtlich ihrer spezifischen Bindung an den Gastrinrezeptor im Zellversuch untersucht. Für diese Rezeptor-Bindungsstudien wurden Zelllinien verwendet, die den Gastrinrezeptor überexprimieren. Im folgenden Kapitel werden die Bindungsstudien und ihre Ergebnisse genauer vorgestellt.

2.4.1 Bindungsstudie mit AR42J-Zellen

Die Rezeptorspezifität der synthetisierten Gastrin-DTPA-Derivate wurde zunächst im Zellversuch mit der sogenannten AR42J-Zelllinie untersucht. Die Zellen stammen aus der Bauchspeicheldrüse von Ratten und sind Zellen eines exocrinen Pankreastumors.

2.4.1.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift AR42J-Zellen

1. Materialien und Reagenzien:

- AR42J-Zellen ausgesät in 6-Well-Platten
- Reaktionslösung: 0,01 BSA pro 1,0 mL DMEM
- Blocksubstanz: Minigastrin I H-3105 ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$)
- PBS (Stammlösung):
 - 80,0 g NaCl
 - 2,0 g KCl
 - 14,25 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$
 - 2,0 g KH_2PO_4
 - 1,0 L H_2O
- PBS (Gebrauchslösung): Stammlösung 1:10 verdünnen und auf pH = 7,2 einstellen
- NaOH (1 M)

2. Peptid-Markierung:

- 2,0 μL Peptid (nicht mehr als 10^{-11} M)
- 50 μL NaOAc (0,5 M, pH = 5,4)
- $3,7 \cdot 10^6 \text{ Bq } ^{111}\text{In}$

3. Qualitätskontrolle:

- Sep-Pac® C-18 Cartridge (Waters)
- 2 x 2,0 mL NaOAc (0,5 M, pH = 5,4)
- 2 x 2,0 mL Methanol
- 4 x 2,0 mL Einwegspritzen

4. Durchführung:

Für die Bindungsstudie mit AR42J-Zellen wurde zunächst das zu testende Minigastrin-DTPA-Derivat mit ^{111}In radioaktiv markiert. Hierzu wurden 2,0 μL des Gastrin-DTPA-Derivats mit 50 μL NaOAc und $3,7 \cdot 10^6$ Bq ^{111}In bei 37°C für 30 min inkubiert.

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde die Qualität der radioaktiven Markierung überprüft. Für die Qualitätskontrolle wurde eine Sep-Pac® C-18 Cartridge zunächst mit 2,0 mL Methanol und anschließend mit 2,0 mL NaOAc konditioniert. Nachdem 2,0 μL der Markierungslösung auf die vorkonditionierte Sep-Pac® C-18 Cartridge gegeben worden waren, wurde zuerst mit 2,0 mL NaOAc freies, ungebundenes In-111 eluiert. Im Anschluss wurde mit 2,0 mL Methanol das radioaktiv markierte Minigastrin-DTPA-Derivat eluiert. Die Zählrate der Eluate und der Sep-Pac® C-18 Cartridge wurden mit einem NaI(Tl)-Bohrloch-Szintillationsdetektor (Berthold LB 2040 und LB 6628-1U) ermittelt. Anhand der prozentualen Verteilung der Zählraten von ungebundenem In-111 (NaOAc-Fraktion) und gebundenem In-111 (Methanol-Fraktion und Sep-Pac® C-18 Cartridge) wurde die Güte der radioaktiven Markierung bestimmt. Werte von über 95% gebundenem In-111 wurden als hinreichend gute Markierungsqualität für eine Bindungsstudie betrachtet.

Im Anschluss an die Qualitätskontrolle wurde bei einigen Bindungsstudien „kaltes“ In^{3+} zur Markierungslösung gegeben, um alle DTPA-Gruppen mit In^{3+} (2,0 μL , $3,777 \cdot 10^{-8}$ mol/L) abzusättigen. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C wurde wiederum die Qualität der radioaktiven Markierung überprüft (siehe Oben).

Die in 6-Well-Platten ausgesäten AR42J-Zellen wurden zunächst durch Absaugen von ihrem Medium befreit und anschließend mit 1,0 mL Reaktionslösung pro Well versehen. Zu drei der sechs Wells wurden je 3 μL Blocksubstanz gegeben. Anschließend wurden jeweils 1.000.000 cpm radioaktiv markiertes Minigastrin-DTPA-Derivat (mit dem

Gammacounter [Packard: Cobra II Autogamma] bestimmt) in alle Wells gegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Lösung abgesaugt und je 1,0 mL PBS in alle Wells gegeben. Das Waschen mit PBS wurde zwei weitere Male wiederholt, anschließend wurde abgesaugt. Zum Ablösen der Zellen wurde nun je 1,0 mL NaOH zu den Zellen gegeben, um sie von der Oberfläche der Wells zu lösen. Die NaOH mit den abgelösten Zellen wurde in Röhrchen überführt und die Zählraten wurden mit dem Gammacounter bestimmt.

Der Vergleich der Zählraten zwischen mit Blocksubstanz versehenen (geblockten) Wells und nur mit radioaktiv markierten Minigastrin-DTPA-Derivat versehenen (ungeblockten) Wells ist dann das Maß für die Bindung des Gastrin-DTPA-Derivats an den Gastrinrezeptor der AR42J-Zellen. Je größer die Differenz der Zählraten, desto besser ist die Rezeptorbindung, wobei die Zählrate der ungeblockten Wells (spezifisch an den Rezeptor gebundenes Minigastrin-DTPA-Derivat) größer sein sollte als die Zählrate der geblockten Wells (unspezifisch an die Zellen gebundenes Minigastrin-DTPA-Derivat).

2.4.2 Ergebnisse der Bindungsstudie mit AR42J-Zellen

Mit dem zuerst synthetisierten Minigastrin-DTPA-Derivat Ast-1 wurden auch die ersten Bindungsstudien durchgeführt. Mit AR42J-Zellen wurde überprüft, ob die synthetisierte Substanz an den Gastrin-Rezeptor bindet. Hierzu wurden mehrere Versuche durchgeführt (Durchführung siehe oben).

Als erstes wurde das Minigastrin-DTPA-Derivat Ast-1 mit In-111 radioaktiv markiert und beobachtet, dass die Substanz spezifisch an den Gastrin-Rezeptor bindet. In Tabelle 5 ist der prozentuale Anteil der unspezifischen Bindung an den Gastrin Rezeptor gezeigt (Zählrate spezifische Bindung = 100%).

	Zählrate in cpm		unspezifische Bindung in %
	spezifische Bindung	unspezifische Bindung	
Versuch 1	4.266,0	3.041,7	71,3
Versuch 2	4.122,3	3.535,6	85,8

Tabelle 5: Bindungsstudie Ast-1 AR42J-Zellen (A)

Im Anschluss an diese Zellversuche wurde die Bindungsstudie in der gleichen Art und Weise fortgesetzt, mit dem Unterschied, dass nach der radioaktiven Markierung des

Gastrin-DTPA-Derivats mit In-111 ein zweites Mal mit inaktiven In³⁺ markiert wurde, um das DTPA vollständig mit Metallionen zu sättigen. Die Ergebnisse dieser Versuche werden in Tabelle 6 gezeigt.

	Zählrate in cpm		unspezifische Bindung in %
	spezifische Bindung	unspezifische Bindung	
Versuch 1	4.981,0	4.082,0	82,0
Versuch 2	7.189,0	4.108,7	57,2
Versuch 3	7.247,0	5.582,4	77,0
Versuch 4	5.741,4	5.522,7	96,2
Versuch 5	5.316,0	4.157,0	78,2

Tabelle 6: Bindungsstudie Ast-1 AR42J-Zellen (B)

Wie man in beiden Tabellen und in Abbildung 27 sehen kann, gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Arten der Bindungsstudie. In beiden Fällen schwankt die Höhe der unspezifischen Bindung sehr stark.

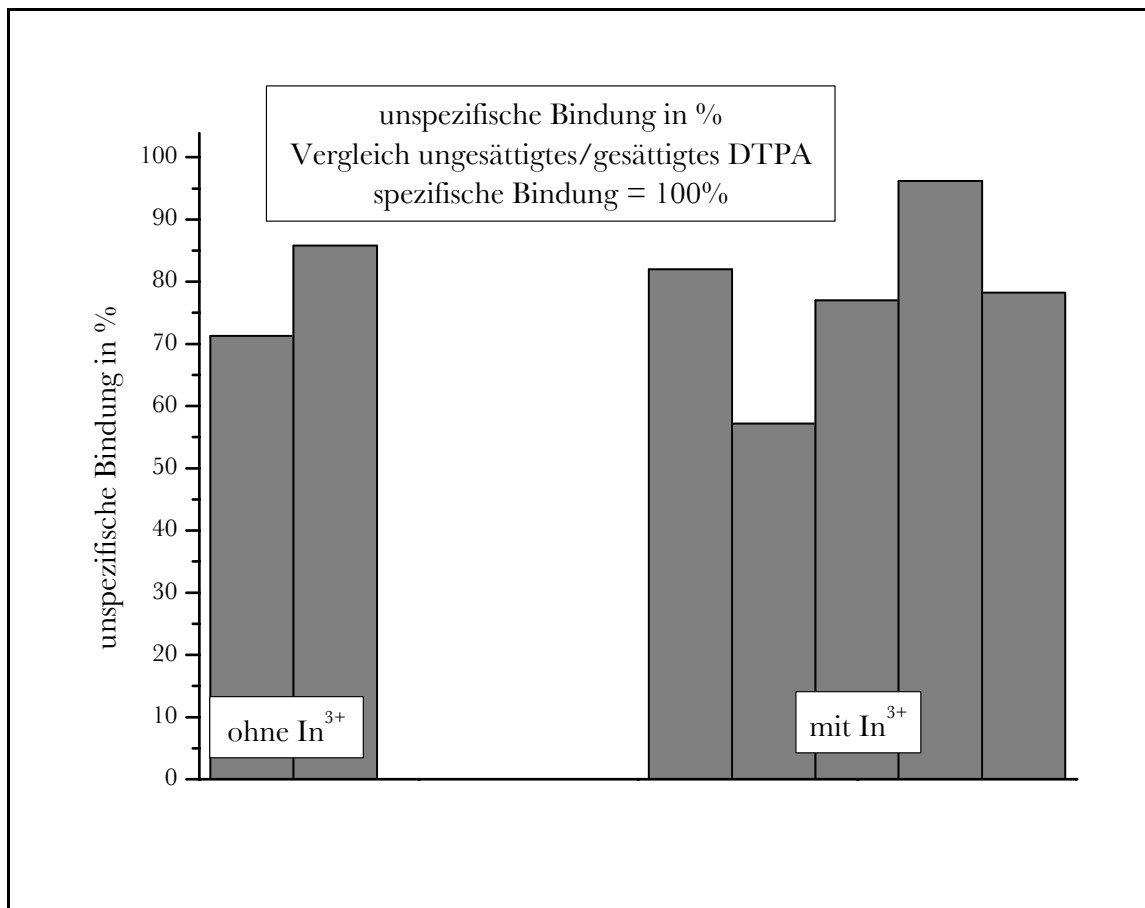


Abbildung 27: Übersicht Bindungsstudie Ast-1 AR42J-Zellen

Im Anschluss wurde die Rezeptorbindung des Gastrin-DTPA-Derivats Ast-2 getestet. Die Bindungsstudie wurde sowohl mit einfach markiertem Minigastrin-DTPA-Derivat (nur mit In-111 markiert), als auch mit doppelt markiertem (mit kaltem Indium abgesättigt) durchgeführt. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse dieser Zellversuche gezeigt.

	Zählrate in cpm		unspezifische Bindung in %
	spezifische Bindung	unspezifische Bindung	
Versuch 1	2.327,0	1.672,0	71,9
Versuch 2	2.657,0	1.785,0	67,2
Versuch 3	2.295,4	1.214,4	52,0
Versuch 4 (mit In ³⁺)	3.942,7	3.292,4	83,5

Tabelle 7: Bindungsstudie Ast-2 AR42J-Zellen

In der graphischen Auftragung der unspezifischen Bindung (siehe Abbildung 28) sieht man, dass die Ergebnisse genau wie beim Minigastrin-DTPA-Derivat Ast-1 stark schwanken, also nicht reproduzierbar sind. Die Zellversuche zeigen aber dennoch, dass Minigastrin-DTPA-Derivat Ast-2 an den Gastrin-Rezeptor der AR42J-Zellen bindet. Die Rezeptorbindung ist aber keinesfalls als gut zu bezeichnen.

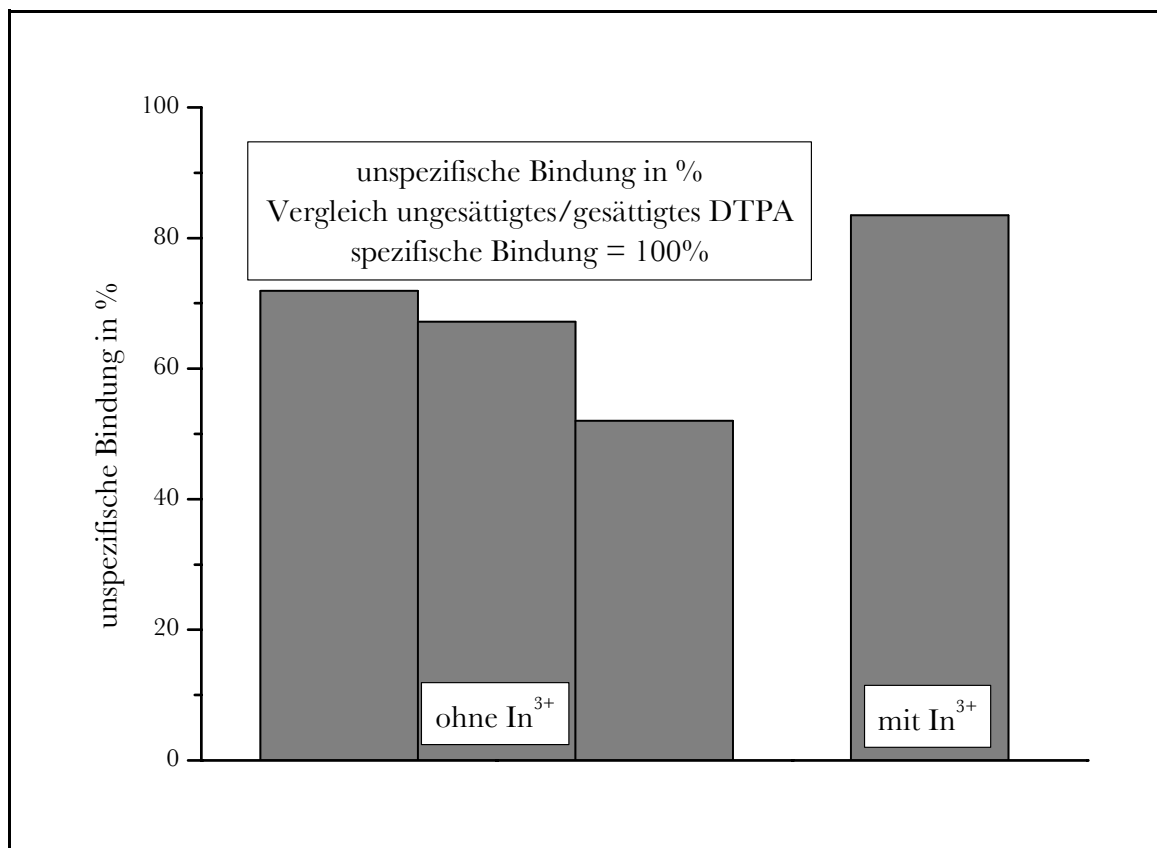


Abbildung 28: Übersicht Bindungsstudie Ast-2

Das Minigastrin-DTPA-Derivat Ast-3 wurde auch auf seine Bindung an den Gastrin-Rezeptor der AR42J-Zellen getestet hierbei ergaben sich die folgenden Ergebnisse (siehe Tabelle 8).

	Zählrate in cpm		unspezifische Bindung in %
	spezifische Bindung	unspezifische Bindung	
Versuch 1	2.298,0	1.706,7	74,3
Versuch 2	3.395,4	2.452,4	72,2
Versuch 3	2.309,4	1.855,7	80,4
Versuch 4 (In^{3+})	2.105,7	1.563,7	74,3
Versuch 5 (In^{3+})	3.368,4	2.160,7	64,1
Versuch 6 (In^{3+})	3.585,7	2.935,7	81,9

Tabelle 8: Bindungsstudie Ast-3 AR42J-Zellen

Auch dieses Minigastrin-DTPA-Derivat bindet zwar an den Gastrin-Rezeptor, macht dieses aber nicht sehr spezifisch. Zur besseren Übersicht wurde die unspezifische Bindung graphisch dargestellt (siehe Abbildung 29).

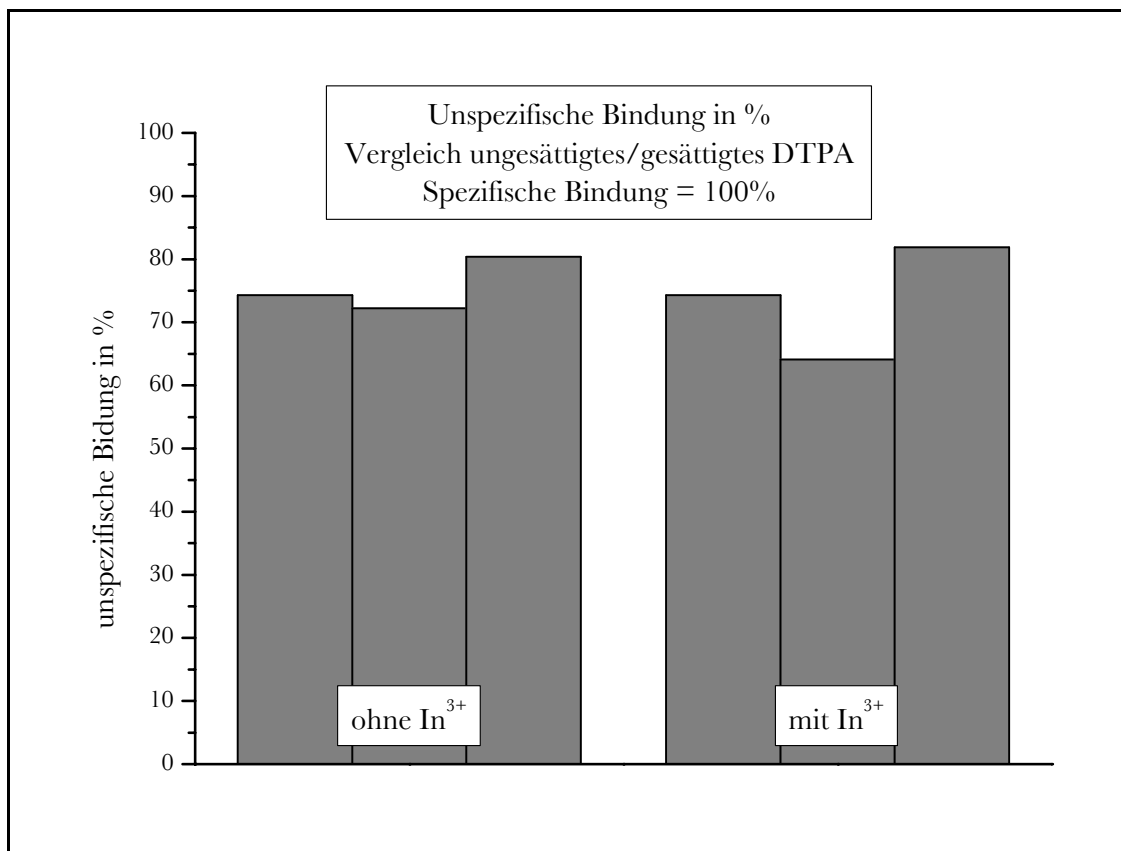


Abbildung 29: Übersicht Bindungsstudie Ast-3

Da die bisher getesteten Gastrin-DTPA-Derivate keine zufriedenstellende Bindung an den Gastrin-Rezeptor zeigten und die Handhabung der AR42J-Zellen (Aussaat und Wachstum) zunehmend problematischer wurde, ist auf eine Überprüfung der Gastrin-Rezeptor-Bindung von Minigastrin-DTPA-Derivat Ast-4 mit diesen Zellen verzichtet worden. Statt dessen wurden detailliertere Bindungsstudien mit sogenannten CCK/2-Zellen in Angriff genommen.

2.4.3 Bindungsstudie CCK/2-Zellen

CCK/2-Zellen (oder CCK/B-Zellen) sind Zellen, die den Cholecystkinin/2-Rezeptor (oder Cholecystkinin/B-Rezeptor) überexpressieren, an den Gastrinartige Peptide, wie das Minigastrin, selektiv binden.

2.4.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift CCK/2-Zellen

1. Materialien und Reagenzien:

- CCK/2-Zellen ausgesät in 6-Well-Platten
- Reaktionslösung: 0,01 BSA pro 1,0 mL DMEM
- Blocksubstanz: Minigastrin I H-3105 ($c = 1 \cdot 10^{-6}$ M)
- PBS (Stammlösung):
 - 80,0 g NaCl
 - 2,0 g KCl
 - 14,25 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
 - 2,0 g KH_2PO_4
 - 1,0 L H_2O
- PBS (Gebrauchslösung): Stammlösung 1:10 verdünnen und auf $\text{pH} = 7,2$ einstellen
- MOPS-Triton:
 - 50 mL H_2O
 - 0,2 g MOPS
 - $\text{pH} = 7,5$ einstellen
 - 50 μL Triton (0,1%)

2. Peptid-Markierung:

-
- 2,0 μL Peptid (nicht mehr als 10^{-11} M)
 - 50 μL NaOAc (0,5 M, pH = 5,4)
 - $3,7 \cdot 10^6$ Bq In-111
 - InCl_3 (1,586 mol/L) in NaOAc (0,5 M, pH = 5,4)

3. Qualitätskontrolle:

- Sep-Pac[®] C-18 Cartridge (Waters)
- 2 x 2,0 mL NaOAc (0,5 M, pH = 5,4)
- 2 x 2,0 mL Methanol
- 4 x 2,0 mL Einwegspritzen

4. Protein-Bestimmung:

- NaCl-Lösung (isotonisch)
- BioRad[®]-Färbelösung
- Küvetten
- Proteinstandard

5. Durchführung:

Für die Bindungsstudie mit CCK/2-Zellen wurde zunächst das zu testende Gastrin-DTPA-Derivat mit In-111 radioaktiv markiert. Hierzu wurden 1 μL bzw. 2 μL des Gastrin-DTPA-Derivats mit 50 μL NaOAc und $3,7 \cdot 10^6$ Bq ^{111}In bei 37°C für 30 min inkubiert.

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde die Qualität der radioaktiven Markierung überprüft. Für die Qualitätskontrolle wurde eine Sep-Pac[®] C-18 Cartridge zunächst mit 2,0 mL Methanol und anschließend mit 2,0 mL NaOAc konditioniert. Nachdem 2,0 μL der Markierungslösung auf die vorkonditionierte Sep-Pac[®] C-18 Cartridge gegeben worden waren, wurde zuerst mit 2,0 mL NaOAc freies, ungebundenes In-111 eluiert. Im Anschluss wurde mit 2,0 mL Methanol das radioaktiv markierte Minigastrin-DTPA-Derivat eluiert. Die Zählrate der Eluate und der Sep-Pac[®] C-18 Cartridge wurden mit einem NaI(Tl)-Bohrlochszintillationsdetektor ermittelt. Anhand der prozentualen Verteilung der Zählraten von ungebundenem In-111 (NaOAc-Fraktion) und gebundenem In-111 (Methanol-Fraktion und Sep-Pac[®] C-18 Cartridge) wurde die

Güte der radioaktiven Markierung bestimmt. Werte von über 95% gebundenem In-111 wurden als hinreichend gute Markierungsqualität für eine Bindungsstudie betrachtet.

Im Anschluss an die Qualitätskontrolle wurde „kaltes“, inaktives In^{3+} zur Markierungslösung gegeben, um alle DTPA-Gruppen mit In^{3+} (4,7 μL Ast-1 bzw. 9,4 μL Ast-2, 1,586 mol/L) abzusättigen. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C wurde wiederum die Qualität der radioaktiven Markierung überprüft (siehe oben).

Die in 6-Well-Platten ausgesäten CCK/2-Zellen wurden zunächst durch Absaugen von ihrem Medium befreit und anschließend mit 1,0 mL Reaktionslösung pro Well versehen. Zu drei der sechs Wells wurden je 3 μL Blocksubstanz gegeben. Anschließend wurde radioaktiv markiertes Minigastrin-DTPA-Derivat (entsprechende Menge in cpm mit dem Gammacounter bestimmt) in alle Wells gegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Lösung abgesaugt und je 1,0 mL PBS wurde in alle Wells gegeben. Dieser Vorgang wurde zwei weitere Male wiederholt, anschließend wurde abgesaugt. Zum Ablösen der Zellen wurde nun je 1,0 mL MOPS-Triton zu den Zellen gegeben und 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die abgelösten Zellen wurden in Röhren überführt und die Zählraten wurden mit dem Gammacounter bestimmt.

Der Vergleich der Zählraten zwischen mit Blocksubstanz versehenen (geblockten) Wells und nur mit radioaktiv markiertem Minigastrin-DTPA-Derivat versehenen (ungeblockten) Wells ist dann das Maß für die Bindung des Gastrin-DTPA-Derivats an den Gastrinrezeptor der CCK/2-Zellen. Je größer die Differenz der Zählraten, desto besser ist die Rezeptorbindung, wobei die Zählrate der ungeblockten Wells (spezifisch an den Rezeptor gebundenes Minigastrin-DTPA-Derivat) größer sein sollte als die Zählrate der geblockten Wells (unspezifisch an den Rezeptor gebundenes Minigastrin-DTPA-Derivat).

Nach der Bestimmung der Zählraten wurde der Proteingehalt für jedes einzelne Röhren bestimmt. Hierzu wurden je eine Teilmenge der Zellsuspension (>50 μL) mit 50 μL BioRad®-Färbelösung versetzt und mit isotonischer NaCl-Lösung auf 1,0 mL aufgefüllt. Die Absorption bei 595 nm wurde bestimmt und durch Vergleich mit den Ergebnissen der Proteinstandardreihe konnte der Proteingehalt der einzelnen Röhren bestimmt werden [9, Bio-Rad].

2.4.4 Ergebnisse der Bindungsstudie mit CCK/2-Zellen

Die Bindungsstudie mit dem Minigastrin-DTPA-Derivat Ast-1 wurde wie oben beschrieben durchgeführt. In Tabelle 9 sind die Ergebnisse der Bindungsstudie sowohl für die spezifische als auch für die unspezifische Rezeptorbindung (normiert auf den Proteingehalt) den eingesetzten Gastrin-DTPA-Derivat-Mengen (in cpm) gegenübergestellt.

Peptid in cpm	spezifische Bindung in cpm/Proteingehalt	unspezifische Bindung in cpm/Proteingehalt
50.000	0,163	0,191
100.000	0,630	0,195
250.000	1,272	0,316
500.000	2,190	1,725
625.000	5,198	1,986
750.000	2,046	0,724
1.000.000	4,139	2,150
1.250.000	1,998	1,475
1.500.000	4,451	2,233
1.750.000	7,990	6,985

Tabelle 9: Bindungsstudie Ast-1 CCK/2-Zellen

Zur besseren Veranschaulichung wurden die Werte auch graphisch aufgetragen (siehe Abbildung 30).

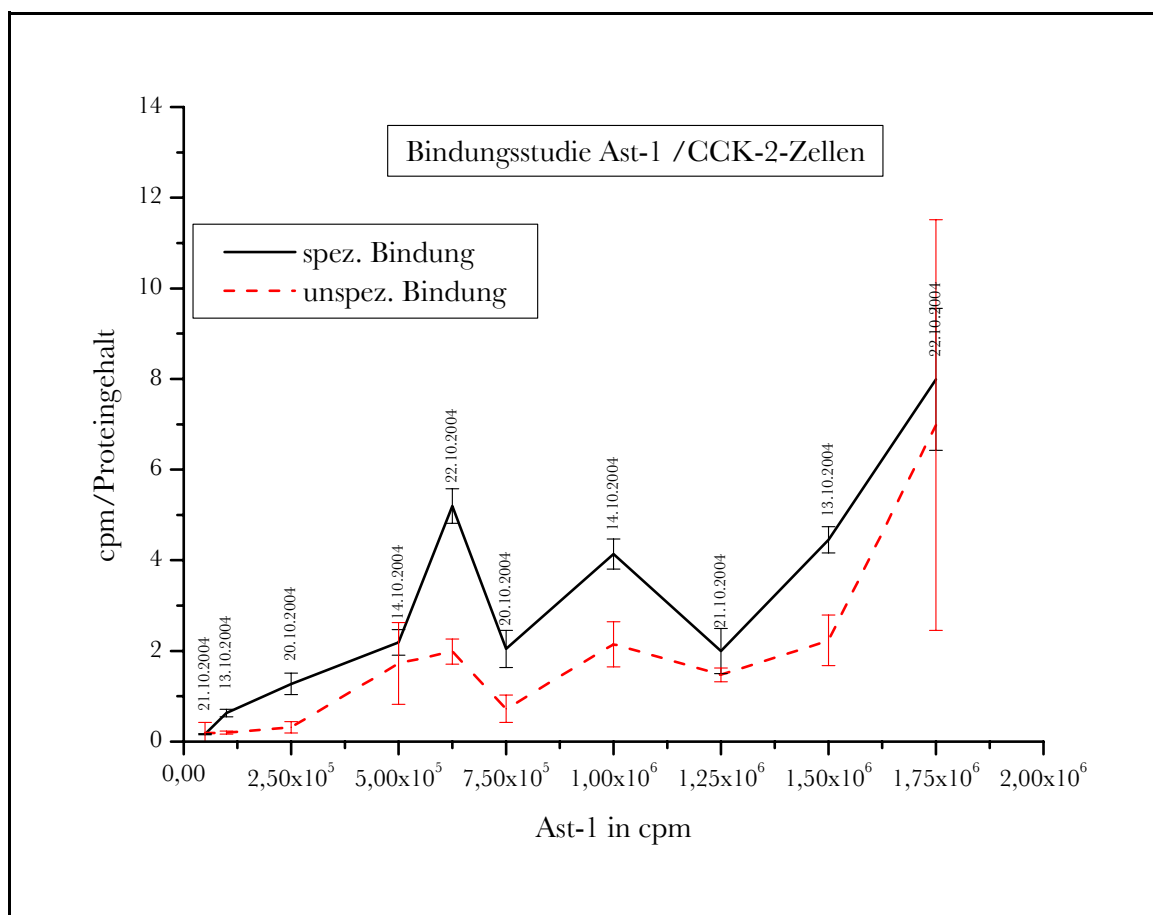


Abbildung 30: Übersicht Bindungsstudie Ast-1 CCK/2-Zellen

Im Anschluss an Ast-1 wurde auch die Rezeptorbindung von Minigastrin-DTPA-Derivat Ast-2 getestet. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 10.

Peptid in cpm	spezifische Bindung in cpm/Proteingehalt	unspezifische Bindung in cpm/Proteingehalt
250.000	0,406	0,380
500.000	2,319	1,226
625.000	0,862	0,552
750.000	3,513	2,101
825.000	0,368	0,250
1.000.000	3,951	1,752
1.250.000	0,655	0,337
1.500.000	1,917	1,399

Tabelle 10: Bindungsstudie Ast-2

Die Auftragung der Ergebnisse (siehe Abbildung 31) zeigt wie schon bei Ast-1, dass die Resultate der Zellversuche sehr uneinheitlich sind und stark schwanken.

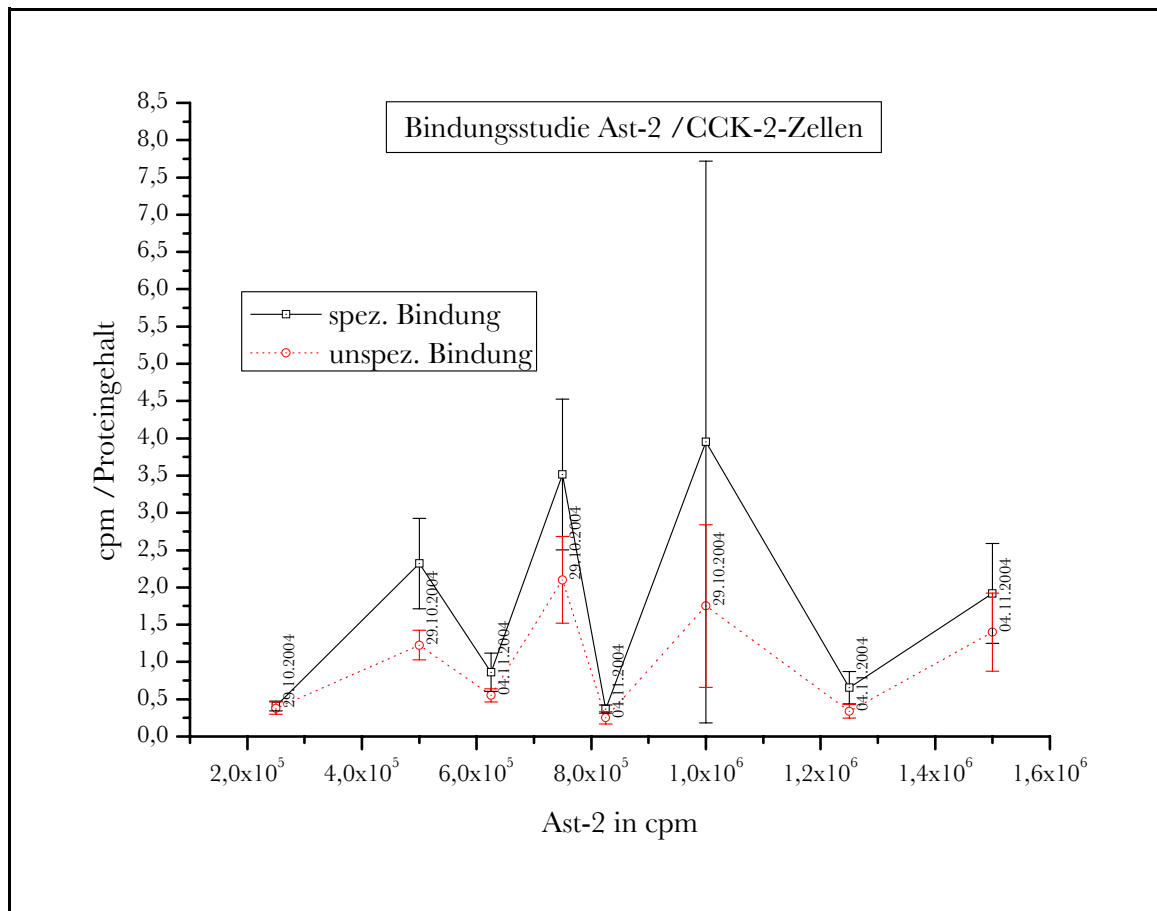


Abbildung 31: Übersicht Bindungsstudie Ast-2 CCK/2-Zellen

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass es experimentelle Fehler bei der Durchführung der Studie gegeben hat, oder dass sich die Zelllinie nicht den Erwartungen entsprechend verhielt bzw. die Gastrin-DTPA-Derivate nicht an den Gastrin-Rezeptor der CCK/2-Zellen binden, wurde eine vergleichende Bindungsstudie zwischen einem sicher an Gastrin-Rezeptoren bindenden Minigastrin-DTPA und dem Minigastrin-DTPA-Derivat Ast-2 durchgeführt. Bei der Durchführung dieser vergleichenden Bindungsstudie wurde darauf geachtet, dass pro Tag parallel beide Substanzen an zum gleichen Zeitpunkt ausgesäten CCK/2-Zellen getestet wurden. Die Ergebnisse werden in Tabelle 11 gezeigt und zur besseren Veranschaulichung aufgetragen (siehe Abbildung 32).

Peptid in cpm	Minigastrin-DTPA		Ast-2	
	spezifische Bindung in cpm/ Proteingehalt	unspezifische Bindung in cpm/ Proteingehalt	spezifische Bindung in cpm/ Proteingehalt	unspezifische Bindung in cpm/ Proteingehalt
250.000	6,50	0,29	1,48	1,56
500.000	8,58	0,49	1,70	1,43
750.000	11,84	0,69	2,25	1,84
1.000.000	4,35	0,51	1,70	0,96

Tabelle 11: Vergleichende Bindungsstudie CCK/2-Zellen

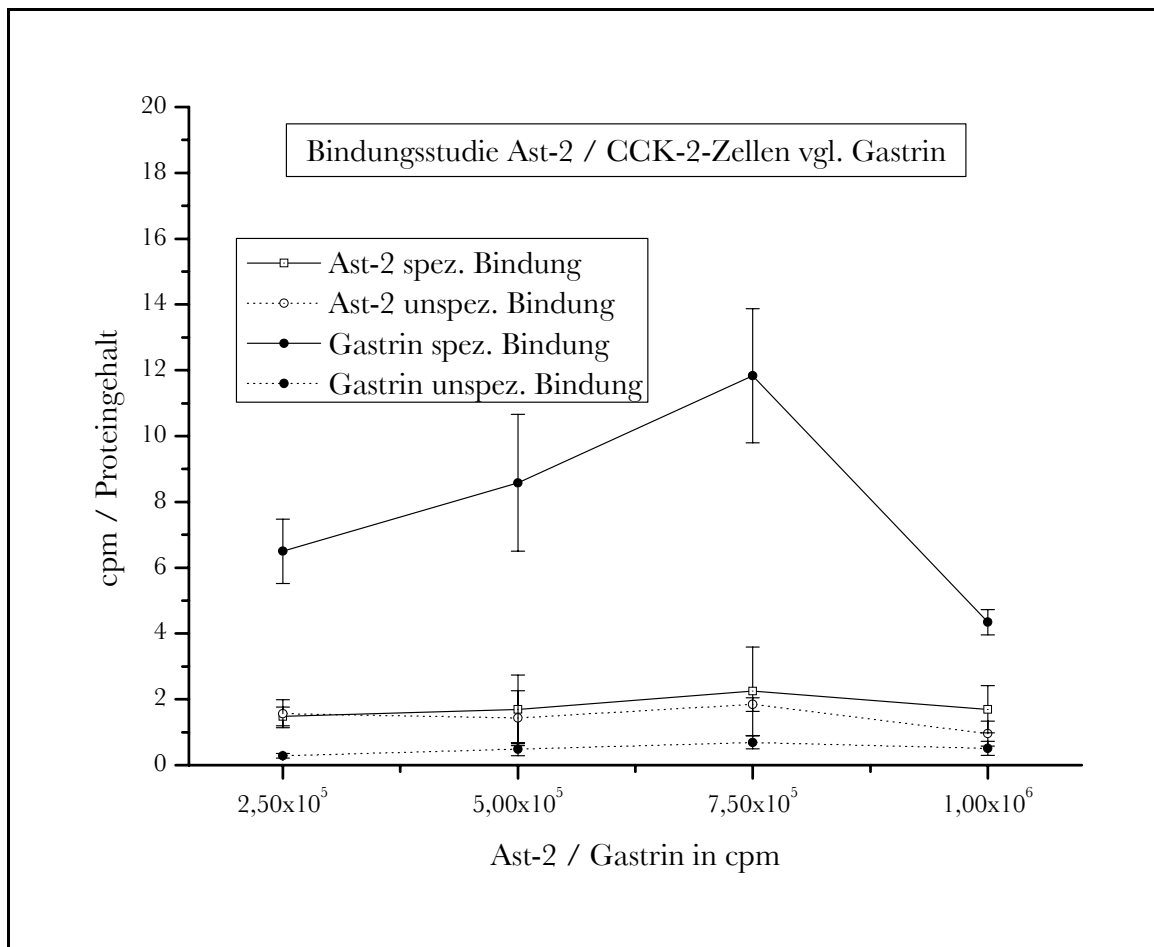


Abbildung 32: Übersicht vergleichende Bindungsstudie CCK/2-Zellen

Die Ergebnisse dieses Vergleichs zeigen, sowohl dass es keine schwerwiegenden experimentellen Fehler während der Studie gab, als auch dass die CCK/2-Zellen erwartungsgemäß reagieren. Dieser Vergleich zeigt außerdem, dass das Gastrin-DTPA-Derivat Ast-2 nicht mit ausreichender Spezifität an den Gastrin-Rezeptor bindet.

Da die Ergebnisse von dem Minigastrin-DTPA-Derivat Ast-1 denen von Ast-2 ähnlich sehen, ist davon auszugehen, dass auch dieses Minigastrin-DTPA-Derivat nicht mit ausreichender Spezifität an den Gastrin-Rezeptor bindet.

3 Ergebnisse und Zusammenfassung

Das vorrangige Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese eines, auf dem bekannten SPECT-Radiopharmakon Minigastrin-DTPA basierenden, rezeptorspezifischen Kontrastmittels für die Magnetresonanztomographie.

Die Synthese auf dem Weg der Festphasenpeptidsynthese erfolgte ohne nennenswerte Probleme. Das Minigastrin wurde an seinem N-terminalen Ende dendrimerartig mit verschiedenen großen Lysinlinkern, versehen an welche schlussendlich die Diethylentriamin-pentaessigsäure-Chelatoren gebunden wurden. Auf diesem Weg wurden vier verschiedene Minigastrin-DTPA-Derivate mit zwei, vier, acht und sechzehn DTPA-Gruppen synthetisiert. Die synthetisierten Minigastrin-DTPA-Derivate ließen sich ohne Probleme mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie reinigen und bis zur weiteren Verwendung im Gefrierschrank lagern.

Die vier Minigastrin-DTPA-Derivate zeigten bei der radioaktiven Markierung mit Indium-111 Markierungsausbeuten von 100%, bestätigt durch HPLC mit radioaktiver Detektion. Eine Markierung der Minigastrin-DTPA-Derivate mit dreiwertigem Gadolinium für die Magnetresonanztomographie sollte also ohne Weiteres möglich sein.

Die Rezeptorspezifität der radioaktiv mit $^{111}\text{In}^{3+}$ markierten Minigastrin-DTPA-Derivate wurde zunächst im Zellversuch mit AR42J-Zellen untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass alle vier synthetisierten Minigastrin-DTPA-Derivate spezifisch an den Rezeptor der AR42J-Zellen binden. Die Güte der rezeptorspezifischen Bindung wurde daraufhin mit einer Bindungsstudie an CCK/2-Zellen getestet. Im Verlauf dieser Bindungsstudie stellte sich heraus, dass die Minigastrin-DTPA-Derivate mit zwei und vier DTPA-Gruppen zwar an den Rezeptor der CCK/2-Zellen binden, diese Bindung aber nicht mit der notwendigen Spezifität erfolgt. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde auf die Fortführung der Bindungsstudie mit den zwei größeren Minigastrin-DTPA-Derivaten verzichtet.

Die vorliegende Arbeit hat trotz des negativen Ausgangs der Bindungsstudie gezeigt, dass die Synthese von rezeptorspezifischen Kontrastmitteln für die Magnetresonanztomographie auf dem beschriebenen Weg mittels Festphasenpeptidsynthese prinzipiell möglich ist. Zur Verbesserung der Rezeptorbindung ist unter Umständen nur eine kleine Änderung in der Struktur des Minigastrin-DTPA-Derivats nötig. Das Lysin-Geäst mit den DTPA-Gruppen

sollte vielleicht nicht direkt am N-terminalen Ende des Minigastrins beginnen sondern zwischen beiden sollte ein etwas längerer Linker eingefügt werden. Durch das Einfügen dieses Linkers kommt es dann unter Umständen nicht mehr zu einer Beeinflussung der Minigastrinstruktur, durch das Lysin-Geäst mit den DTPA-Gruppen und somit könnte eine bessere Rezeptorbindung resultieren.

Synthese eines peptidbasierten, rezeptorspezifischen
Kontrastmittels für die Magnetresonanztomographie
mit superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln

Teil Ib

4 Einleitung

Der Begriff Superparamagnetismus wurde erstmals 1952 erwähnt und beschreibt das Phänomen, dass sich sehr kleine Eisenoxidpartikel in Pulvern oder in Suspensionen ähnlich wie Ferromagneten durch ein äußeres Magnetfeld stark magnetisieren lassen, jedoch im Gegensatz zu Ferromagneten nach dem Abschalten des äußeren Magnetfeldes keine Restmagnetisierung aufweisen [10, Xiang] [11, Taupitz].

Die Möglichkeit, funktionelle Gruppen, z.B. Antikörper oder Antigene, chemisch an das Hüllmaterial solcher Partikel zu binden, wird im biomedizinischen Bereich zur Trennung von biologischen Materialien im Magnetfeld verwendet (z.B. Immunoassays). Aus dieser Anwendung entwickelte sich der Gedanke, so markierte superparamagnetische Eisenoxidpartikel als immunospezifische Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie zu nutzen (1986). 1987 führte die Eigenschaft des mononukleären phagozytierenden Systems (MPS), unspezifisch Partikel aus der Blutbahn aufzunehmen, zur Entdeckung der superparamagnetischen Eisenoxidpartikel als intravenös applizierbares Kontrastmittel für die magnetresonanztomographische Diagnostik von Tumoren der Leber und der Milz.

Die Verwendung der superparamagnetischen Eisenoxidpartikel in der medizinischen Diagnostik hat sich seit dieser Zeit ständig weiterentwickelt. Sie werden neben der Tumordiagnostik von Leber und Milz, der Lymphknotendiagnostik, zu morphologischen und funktionellen Untersuchungen des Knochenmarks eingesetzt. Außerdem finden die superparamagnetischen Eisenoxidpartikel bei der Gefäßdiagnostik (Angiographie) Verwendung. In der jüngeren Vergangenheit liegen auch zahlreiche Publikationen zum Einsatz von superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln als Kontrastmittel bei der sogenannten „Molekularen Bildgebung“ vor. Der Einsatz der Eisenoxidpartikel beschränkt sich nicht auf diagnostische Anwendungen. Eine therapeutische Anwendung der superparamagnetischen Eisenoxidpartikel besteht in ihrer Verwendung als Vermittler bei der Hyperthermie.

4.1 Partikelarten und -eigenschaften

4.1.1 Terminologie

SPIO ist der Oberbegriff für alle in der Magnetresonanztomographie als Kontrastmittel klinisch oder experimentell eingesetzten superparamagnetischen Eisenoxidpartikel (engl. superparamagnetic iron oxide, SPIO).

SPIOs werden der Größe nach in verschiedene Klassen unterteilt. Die Partikel mit den größten Durchmessern (50 - 150 nm oder größer) werden historisch bedingt als SPIO bezeichnet, die Bezeichnung als Standard SPIO (SSPIO) ist weniger gebräuchlich. Während Partikel mit einem Durchmesser von circa 20 nm als USPIO (ultra small SPIO) bezeichnet werden, ist für die noch kleineren Partikel (7 - 10 nm) die Bezeichnung VSIOP (very small SPIO) gebräuchlich.

Die Unterteilung der superparamagnetischen Eisenoxidpartikel kann auch anhand des Partikelaufbaus erfolgen, zum Beispiel monokristalline Eisenoxidpartikel (engl. monocryalline iron oxide nanoparticles, MION), die sich jedoch nur unwesentlich von den als USPIO bezeichneten Partikeln unterscheiden. Eine andere Bezeichnung erfolgt anhand der Beschaffenheit des Hüllmaterials. Ist dieses gezielt quervernetzt, spricht man von CLIO (cross linked iron oxide).

4.1.2 Partikelaufbau und -eigenschaften

Superparamagnetische Eisenoxidkristalle haben einen Durchmesser von wenigen Nanometern und besitzen die allgemeine chemische Formel $\text{Fe}_2^{3+}\text{O}_3\text{Fe}^{2+}\text{O}$, der sogenannten inversen Spinell-Struktur (siehe Abbildung 33 A).

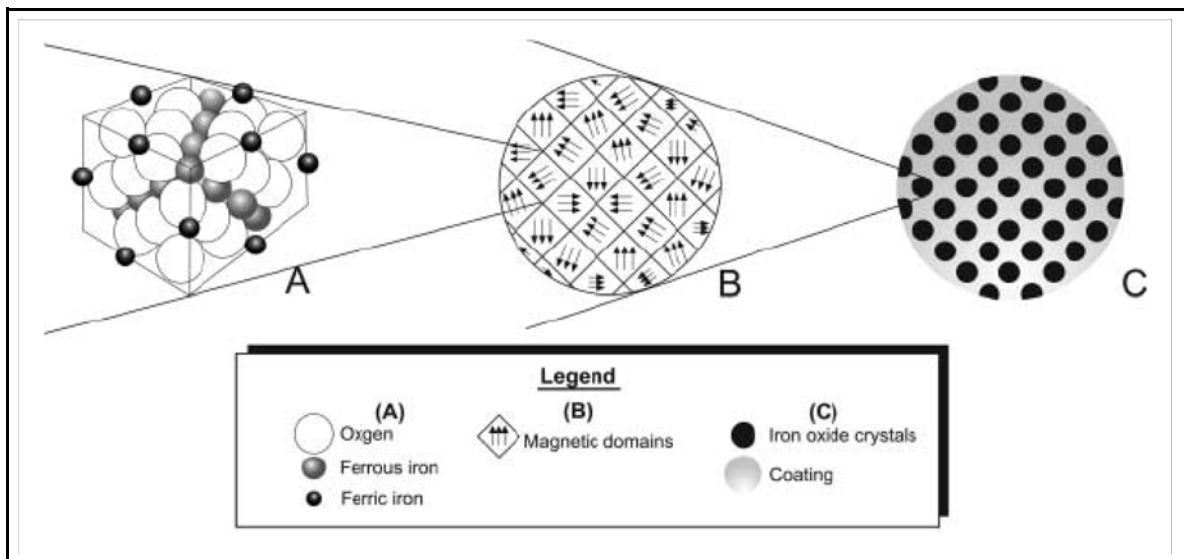


Abbildung 33: Schematischer SPIO-Aufbau **A** Spinellkristallstruktur, **B** SPIO-Kristall mit mehreren magnetischen Domänen und **C** Vollständiges SPIO-Kontrastmittel mit mehreren SPIO-Kristallen und Umhüllung

Um die Eisenoxidpartikel intravenös injizieren zu können, sind sie mit einer Umhüllung versehen. Bei größeren Partikeln bilden mehrere Eisenoxidkristalle mit dem Hüllmaterial Konglomerate mit Durchmessern bis zu 100 nm. Bei den kleineren MION sind einzelne Kristalle von einer Hülle umgeben (siehe Abbildung 33 C). Als Hüllmaterialien finden verschiedene Polymere, wie zum Beispiel Dextran (z.B. Endorem[®], Guerbet), Carboxydextran (Resovist[®], Schering AG), Albumin, Stärke und Polyethylenglycol (z.B. Clariscan[™], Amersham) Verwendung. Außerdem gibt es auch liposomale Hüllmaterialien und als monomeres Hüllmaterial wurde Citrat (z.B. VSOP-C184, Ferrofarm) erfolgreich in vivo eingesetzt.

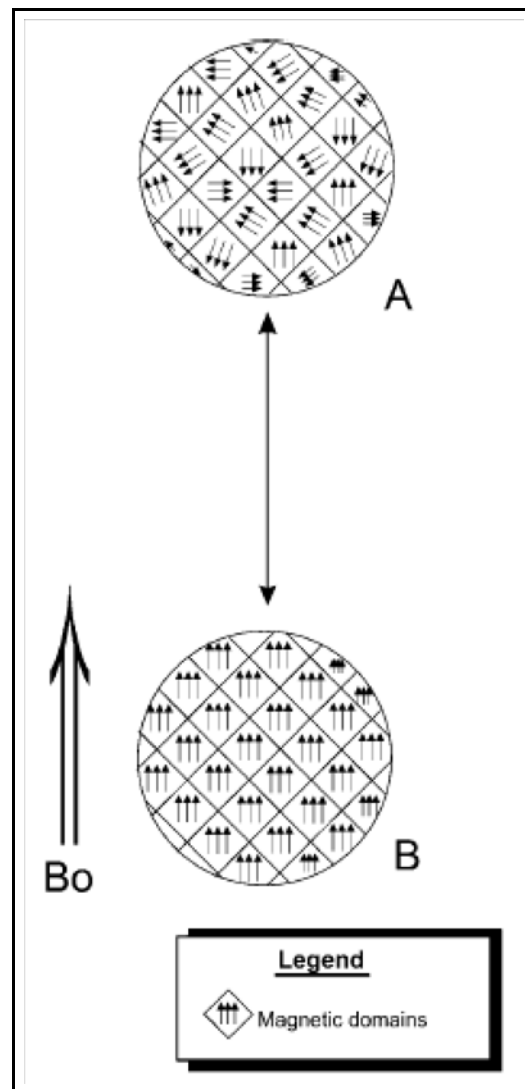


Abbildung 34: **A** SPIO ohne äußeres Magnetfeld; die magnetischen Domänen sind zufällig verteilt. **B** Durch ein externes magnetisches Feld (B_0) werden die magnetischen Domänen des SPIO-Kristalls entlang des Magnetfeldes ausgerichtet.

Superparamagnetismus tritt auf, wenn die Kristallregionen mit ungepaarten Spins so groß sind, dass sie als thermodynamisch unabhängig angesehen werden können. Diese thermodynamisch unabhängigen Bereiche werden als Domäne bezeichnet (siehe Abbildung 33 B) und besitzen einen magnetischen Dipol, der größer ist als die Summe der ungepaarten Elektronen. Ohne Magnetfeld rotieren die magnetischen Dipole der einzelnen Domänen aufgrund der thermischen Bewegung frei und das Gesamtmagnetfeld ist, analog zu paramagnetischen Materialien, zufällig verteilt (siehe Abbildung 34 A). Durch ein äußeres Magnetfeld richten sich die magnetischen Dipole der einzelnen Domänen entlang dieses Feldes aus (Abbildung 34 B). Das magnetische Moment der Domänen gibt die Wechselwirkung der ungepaarten Elektronen wieder und ist erheblich größer als das einer

paramagnetischen Substanz. Die spezielle magnetische Suszeptibilität superparamagnetischer Eisenoxidpartikel kann deutlich größer sein als die vergleichbarer löslicher paramagnetischer Substanzen. Nach dem Abschalten des äußeren Magnetfeldes verteilen sich die magnetischen Dipole der Domänen zufällig, so dass das magnetische Moment wieder Null wird. Superparamagnetische Eisenoxidpartikel können sich also nicht magnetisch aggregieren.

4.1.3 Dosis und Bioabbau

Die im Vergleich zum Körpereisenpool geringe Menge Eisen von 10 - 50 $\mu\text{mol Fe/kg}$, die bei diagnostischen Untersuchungen injiziert wird, entspricht ca. 5 - 10% der Gesamteisenmenge des Körpers. Nach der intravenösen Injektion beginnt der Abbau der Eisenoxidpartikel und das Eisen wird in den Körpereisenpool überführt.

4.2 Bildbeeinflussung, relaxationsverstärkende Eigenschaften

Alle in der Magnetresonanztomographie verwendeten Kontrastmittel, sowohl gadoliniumhaltige als auch Eisenoxidbasierte, verkürzen die T_1 - und die T_2 -Relaxationszeiten des umgebenden Gewebes. Das Maß für die Relaxationszeit ist die Relaxivität (T_1 -Relaxivität bzw. T_2 -Relaxivität) mit der Einheit $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Die superparamagnetischen Eisenoxidpartikel wurden zu Beginn ihrer Verwendung in der Magnetresonanztomographie als „negative“ Kontrastmittel verwendet, da sie wesentlich stärkere T_2 - und T_2^* -verkürzende Wirkung (hohe T_2 -Relaxivität) hervorrufen, als gadoliniumhaltige Kontrastmittel mit entsprechend stark signalminderndem Effekt, nicht nur in T_2 - bzw. T_2^* -gewichteten Sequenzen, sondern auch in T_1 -gewichteten Techniken. Abhängig von der Partikelgröße weisen die superparamagnetischen Eisenoxidpartikel deutlich unterschiedliche T_1 - und T_2 -Relaxivitäten auf. Ob ein superparamagnetischer Eisenoxidpartikel bei einer bestimmten Pulssequenz eher als positives oder negatives Kontrastmittel wirkt, wird vom Verhältnis von T_1 - zu T_2 -Relaxivität (R_1/R_2) bestimmt. Große Partikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von ca. 50 nm und mehr haben ein niedriges Verhältnis der Relaxivitäten und wirken demnach als negatives Kontrastmittel. Kleine Partikel mit Durchmessern von 20 nm und weniger weisen ein hohes Verhältnis der Relaxivitäten auf und können sowohl als positives als auch als negatives Kontrastmittel wirken.

Die intrazelluläre Aufnahme von applizierten SPIO-Kontrastmitteln beeinflusst ihre signalverändernde Wirkung. Zirkulieren die Partikel frei in der Blutbahn oder der extrazellulären Flüssigkeit, entsprechen ihre Eigenschaften den in vitro bestimmten. Werden die SPIO-Partikel aber von Zellen aufgenommen (z.B. den Kupffer-Zellen in der Leber), wird eine Steigerung des signalvermindernden Effekts beobachtet.

4.3 Motivation der Arbeit

Im vorhergehenden Teil dieser Arbeit wurden Rezeptorspezifische-Kontrastmittel auf Gadoliniumbasis für die Magnetresonanztomographie synthetisiert und im Zellversuch getestet. In diesem Teil der Arbeit sollte geklärt werden, ob die Möglichkeit besteht, gängige superparamagnetische Kontrastmittel so zu modifizieren, dass sie rezeptorspezifisch werden.

Hierzu sollten das Peptid Minigastrin und der SPIO-Partikel AMI-25 (Endorem[®], Guerbet) miteinander verknüpft werden, so dass der Partikel anschließend spezifisch an den Gastrinrezeptor bindet. Die Rezeptorspezifität sollte anschließend in Zellversuchen getestet werden.

4.3.1 AMI-25

Das als superparamagnetisches Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie von Leber und Milz zugelassene AMI-25 hat den Handelsnamen Endorem[®] und wird von der Firma Guebert vertrieben. Der 4,8 bis 5,6 nm große Eisenoxidkristall ist mit Dextran beschichtet und hat einen hydrodynamischen Durchmesser von 80 bis 150 nm. Die T_2 -Relaxivität des SPIO-Partikels AMI-25 beträgt $98,3 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ und die T_1 -Relaxivität beträgt $23,9 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Nach der Injektion reichert sich AMI-25 innerhalb weniger Minuten zu 80% in der Leber und zu 5 bis 10% in der Milz an. Die Halbwertszeit des Partikels im Blut beträgt 6 Minuten. Nach 2 Stunden ist die höchste Eisenkonzentration in der Leber erreicht. In der Milz ist die Eisenkonzentration nach vier Stunden am größten. Das Eisen wird von den beiden Organen mit einer Halbwertszeit von 3 Tagen (Leber) bzw. 4 Tagen (Milz) ausgeschieden. Das Kontrastmittel wird üblicherweise mit einer Dosis von $15 \mu\text{mol}/\text{Kg}$ in 100 mL Glucose (5%ig) verabreicht und bietet dann für T_2/T_2^* gewichtete Aufnahmen ein Bildgebungsfenster von 0,5 bis 6 Stunden.

4.3.2 Syntheseplanung

Der superparamagnetische Eisenoxidpartikel AMI-25 besteht aus dem Eisenoxidkristall und der Dextranhülle. Dextran (siehe Abbildung 35) ist ein schleimartiges, hochmolekulares ($M = 1,5 \cdot 10^4$ bis $5 \cdot 10^7 \text{ g/mol}$), neutrales Biopolysaccharid aus α -D-Glucose (siehe Abbildung 35) mit der Summenformel $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$. In der Natur wird Dextran von Bakterien der

Gattung *Leuconostoc* extrazellulär innerhalb von 24 h bei 25°C enzymatisch aus Saccharose gebildet (siehe Abbildung 35) [12, Römpp].

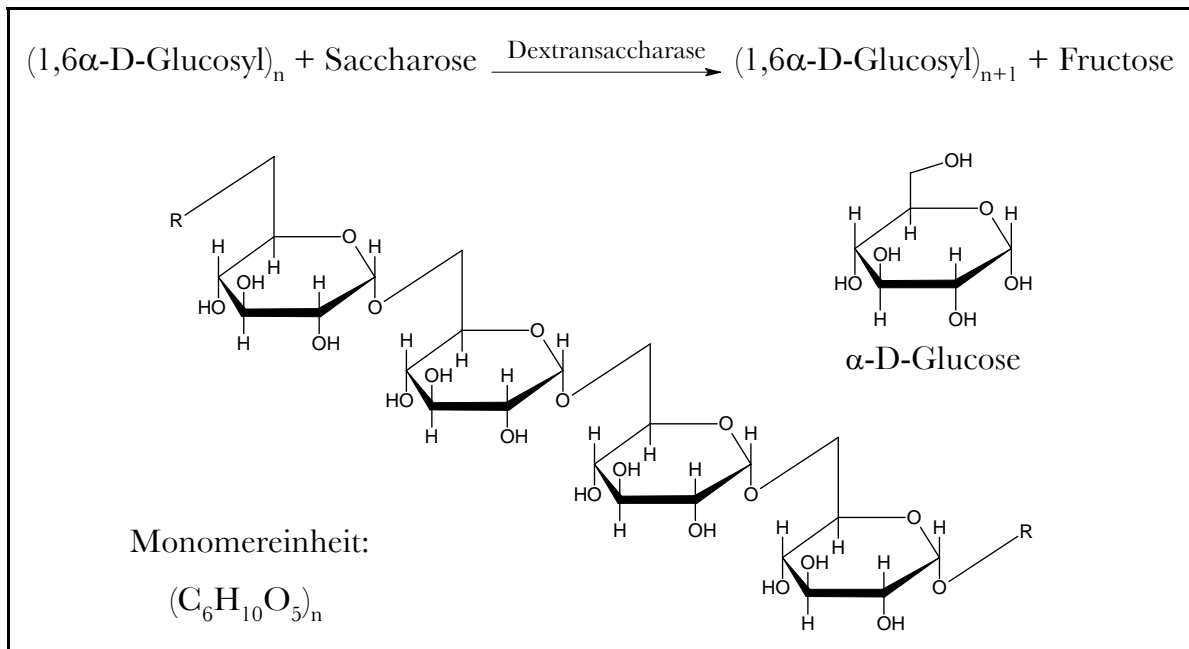


Abbildung 35: Glucose, Dextran und Dextrandarstellung

Dextran weist viele Hydroxylgruppen als Angriffspunkt für eine kovalente Bindungsknüpfung mit der primären Aminogruppe des Gastrins auf. Eine direkte Bindungsknüpfung zwischen diesen beiden Gruppen ist nicht ohne weiteres möglich, somit ist eine chemische Umwandlung der Gruppen erforderlich.

Die Hydroxylgruppen der Dextranhülle werden durch Behandlung mit konzentriertem Ammoniak in Aminogruppen überführt. Die vollständige Substitution aller Hydroxylgruppen ist unter diesen brachialen Reaktionsbedingungen nicht zu erreichen. Aber es entstehen genügend Aminogruppen, an die das Gastrin mittels einer Thioharnstoffbrücke gebunden werden kann. Um das Gastrin über eine Thioharnstoffbrücke an das Dextran binden zu können, muss die primäre Aminogruppe am N-terminalen Ende des Gastrins in ein Isothiocyanat überführt werden. Die Umwandlung der Aminogruppe in das Isothiocyanat geschieht mittels Di-2-piridyl-thiocarbonat (DPT) [13, Kim]. Werden im Anschluss der aminierte Eisenoxidpartikel und das Gastrinisothiocyanat zusammengegeben, reagiert die Aminogruppe mit dem Isothiocyanat zu einem Thioharnstoffderivat und die kovalente Bindung zwischen AMI-25 und Gastrin ist geknüpft.

5 Experimenteller Teil

5.1 Berechnung der Partikelkonzentration pro mL Endorem®

Für die weitere Planung der Synthese ist es unumgänglich, die Konzentration des superparamagnetischen Eisenoxidpartikels AMI-25 pro mL Endorem® zu kennen. Da die Partikelkonzentration im Beipackzettel des Medikaments nur als Eisengehalt pro 1 mL angegeben ist, muss die Konzentration aus Partikelgröße und Dichte berechnet werden.

In der Literatur wird für den superparamagnetischen Eisenoxidpartikel AMI-25 eine Partikelgröße (Kristall) von 4,8 - 5,6 nm angegeben. Für die nachfolgenden Berechnungen wurde ein durchschnittlicher Durchmesser von $d = 5,2$ nm zugrundegelegt. Aus dem Partikeldurchmesser (d) lässt sich das Partikelvolumen (V) berechnen (siehe Gleichung 1).

$$\begin{aligned} V &= \frac{1}{6}\pi d^3 \\ V &= \frac{1}{6}\pi(5,2 \cdot 10^{-9}\text{m})^3 && \text{Gleichung 1} \\ V &= 7,362 \cdot 10^{-26}\text{m}^3 \\ V &= 7,362 \cdot 10^{-20}\text{cm}^3 \end{aligned}$$

AMI-25 kristallisiert in der inversen Spinellstruktur und hat eine Dichte von $\rho = 5,1$ g/cm³. Hieraus lässt sich die Partikelmasse (m) berechnen (siehe Gleichung 2).

$$\begin{aligned} m &= \rho \cdot V \\ m &= 5,1 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \cdot 7,362 \cdot 10^{-20}\text{cm}^3 && \text{Gleichung 2} \\ m &= 3,755 \cdot 10^{-19}\text{g} \end{aligned}$$

Aus der Partikelmasse (m), der molaren Masse von Fe₂O₃FeO ($M = 231,4$ g/mol) und der molaren Masse des Eisens ($M = 55,8$ g/mol) berechnet sich wie in den Gleichungen 3 und 4 gezeigt der Eisengehalt des Partikels (m_{Fe}).

$$\begin{aligned} x &= \frac{3 \cdot M_{\text{Fe}} \cdot 100\%}{M_{\text{Fe}_2\text{O}_3}} \\ x &= \frac{3 \cdot 55,8 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot 100\%}{231,4 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} && \text{Gleichung 3} \\ x &= 72,3\% \end{aligned}$$

$$m_{\text{Fe}} = \frac{m \cdot x}{100\%}$$

$$m_{\text{Fe}} = \frac{3,755 \cdot 10^{-19} \text{g} \cdot 72,3\%}{100\%}$$

$$m_{\text{Fe}} = 2,715 \cdot 10^{-19} \text{g}$$

Gleichung 4

Mit dem Eisengehalt von 11,2 mg pro 1,0 mL Endorem® kann nun wie in Gleichung 5 gezeigt die Partikelzahl (n) pro mL AMI-25-Lösung berechnet werden.

$$n = \frac{m}{m_{\text{Fe}}}$$

$$n = \frac{11,2 \cdot 10^{-3} \text{g}}{2,715 \cdot 10^{-19} \text{g}}$$

$$n = 4,125 \cdot 10^{16}$$

Gleichung 5

In einem Milliliter AMI-25-Lösung sind also $6,85 \cdot 10^{-8}$ mol superparamagnetische Eisenoxidpartikel enthalten. Dieser Eisenoxidpartikelgehalt entspricht einer Konzentration (c) von:

$$c = 6,85 \cdot 10^{-8} \frac{\text{mol}}{\text{mL}}$$

5.2 Darstellung des Gastrinisoithiocyanats

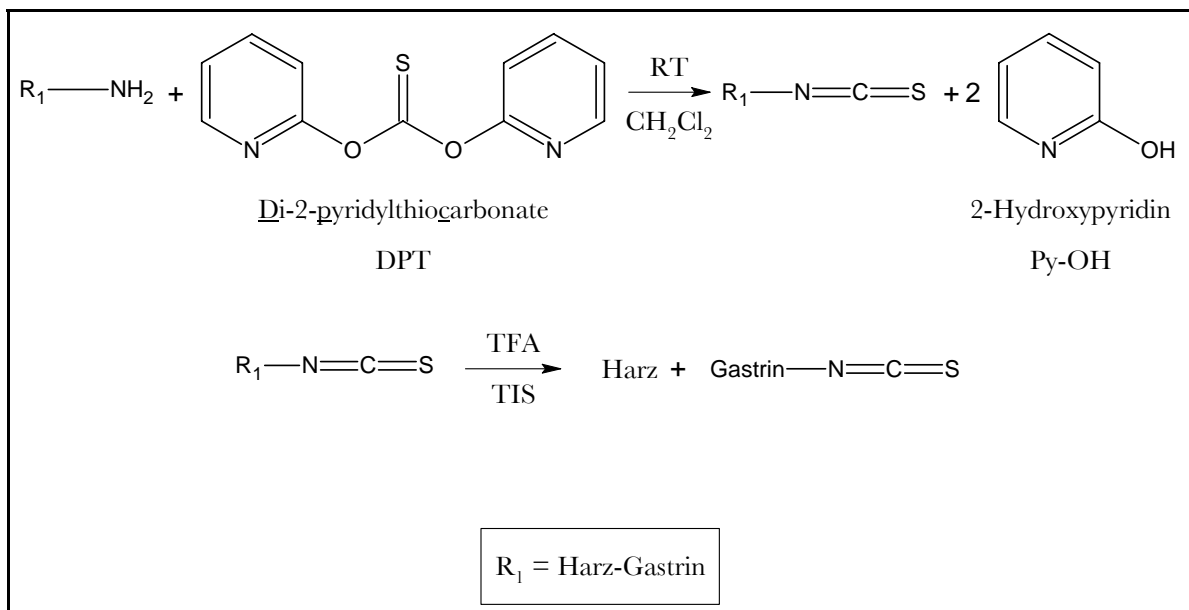


Abbildung 36: Darstellung des Gastrinisoithiocyanats, Reaktionsgleichungen

10 mg Harz ($5 \cdot 10^{-6}$ mol Minigastrin) in 2,0 mL Dichlormethan (CH_2Cl_2) wurden mit zwei Äquivalenten Di-2-pyridylthiocarbonate (DPT, 2,326 mg, $10 \cdot 10^{-6}$ mol) bei Raumtemperatur versetzt und 24 Stunden gerüttelt. Anschließend wurde abfiltriert und mit insgesamt 6,0 mL CH_2Cl_2 gewaschen. Zum Ablösen des Minigastrins vom Harz wurde mit 1,0 mL Trifluoressigsäure (TFA), 100 μL Wasser und 150 μL Triisopropylsilan (TIS) versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerüttelt. Die Reaktionslösung wurde im Anschluss in eiskalten Diethylether (Et_2O) filtriert, viermal mit Et_2O gewaschen und schließlich wurde das Reaktionsprodukt (Minigastrinisothiocyanat) getrocknet.

5.3 Aminierung des AMI-25

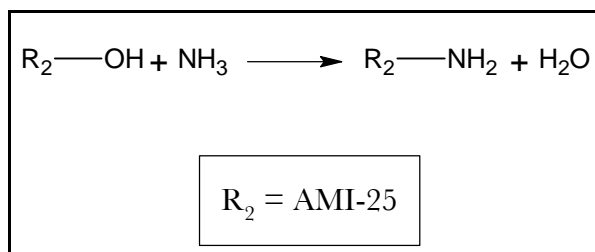


Abbildung 37: Aminierung des AMI-25, Reaktionsgleichung

500 μL AMI-25-Lösung wurden in einen 10 kDa-Zentrifugenfilter überführt, filtriert und fünf mal mit je 1,0 mL Wasser gewaschen. Der gewaschene Partikel wurde in 250 μL Wasser aufgenommen, mit 160 μL konzentriertem Ammoniak (NH_3 konz.) versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerüttelt. Nach Überführung des Reaktionsgemisches in einen 10 kDa-Zentrifugenfilter wurde filtriert und fünf mal mit je 2,0 mL Wasser gewaschen. Anschließend wurde der aminierte, superparamagnetische Eisenoxidpartikel in 400 μL Wasser aufgenommen.

5.4 Darstellung des Gastrin-AMI-25

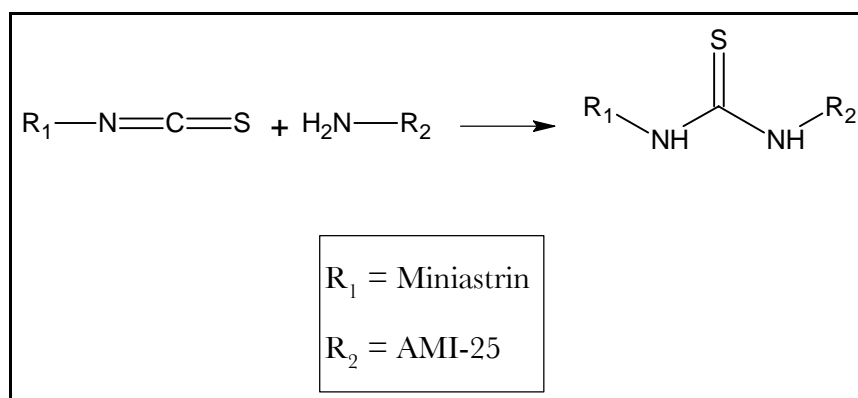


Abbildung 38: Darstellung des Minigastrin-AMI-25, Reaktionsgleichung

Aminierter Eisenoxidpartikel (ca. $3,475 \cdot 10^{-8}$ mol) in 400 μL Wasser, Minigastrin-NCS (ca. $5 \cdot 10^{-6}$ mol) in 400 μL Wasser und 100 μL Diisopropylethylamin (DIPEA) wurden 24 Stunden bei Raumtemperatur gerüttelt. Nachdem das Reaktionsgemisch in einen 10 kDa-Zentrifugenfilter überführt worden ist, wurde filtriert und fünf mal mit je 2,0 mL Wasser gewaschen und in 400 μL Wasser aufgenommen. Zur Stabilisierung des gastrinierten superparamagnetischen Eisenoxidpartikels wurde fünf mal mit je 2,0 mL Manitol (61,3 mg/mL) gewaschen und anschließen in 200 μL Manitol aufgenommen.

5.5 Bindungsversuch mit CCK/2-Zellen

Die rezeptorspezifische Bindung der minigastringekoppelten, superparamagnetischen Eisenoxidpartikel an den Gastrinrezeptor wurde in einem Bindungsversuch mit CCK/2-Zellen getestet. Bei dem Bindungsversuch wurde radioaktiv mit In-111 markiertes Minigastrin-DTPA als spezifisch an den Gastrinrezeptor bindende Substanz und der gastringekoppelte, superparamagnetische Eisenoxidpartikel als Blocksubstanz verwendet, so dass bei erfolgreicher rezeptorspezifischer Bindung des gastrinierten Eisenoxidpartikels an den Gastrinrezeptor ein deutlicher Unterschied bei der Rezeptorbindung des radioaktiv markierten Gastrins zu sehen sein müsste. Die Durchführung des Bindungsversuches war ähnlich zu den oben beschriebenen Bindungsstudien mit CCK/2-Zellen.

Zunächst wurden 2,0 μL Minigastrin-DTPA in 50 μL NaOAc (0,5-M, pH = 5,4) mit 7,4 MBq $^{111}\text{InCl}_3$ (16 μL) bei 37°C 30 min inkubiert. Nach anschließender Qualitätskontrolle

über Sep-Pac® C-18 Cartridge wurde die Menge von je 1 Million Counts ¹¹¹In-Minigastrin-DTPA (Gammacounter) für jedes Well bestimmt.

Die in 6-Well-Platten ausgesäten CCK/2-Zellen wurden durch Absaugen von ihrem Medium befreit und anschließend mit 1,0 mL Reaktionslösung (0,01 g BSA pro 1,0 mL DMEM) pro Well versehen. Zu drei der sechs Wells wurden je 10 µL der Eisenoxidpartikellösung als Blocksubstanz gegeben. Anschließend wurde je 1 Million Counts ¹¹¹In-Minigastrin-DTPA (mit dem Gammacounter bestimmt), in alle Wells gegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Lösung abgesaugt und je 1,0 mL PBS in alle Wells gegeben. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt, anschließend wurde abgesaugt. Zum Ablösen der Zellen wurde nun je 1,0 mL MOPS-Triton zu den Zellen gegeben und 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die abgelösten Zellen wurden in Röhrcchen überführt und die Zählraten mit dem Gammacounter bestimmt.

Zur Überprüfung der Vorgehensweise und der Qualität der Zellversuche wurde parallel ein Zellversuch mit CCK/2-Zellen, Minigastrin als Blocksubstanz und radioaktiv mit In-111 markiertem Minigastrin-DTPA durchgeführt.

Der Vergleich der Zählraten zwischen mit dem Eisenoxidpartikel als Blocksubstanz versehenen (geblockten) Wells und nur mit radioaktiv markierten Minigastrin-DTPA-Derivat versehenen (ungeblockten) Wells ist dann das Maß für die Bindung an den Gastrinrezeptor der CCK/2-Zellen. Je größer die Differenz der Zählraten, desto besser ist die Rezeptorbindung, wobei die Zählrate der ungeblockten Wells (spezifisch an den Rezeptor gebundenes ¹¹¹In-Minigastrin-DTPA) größer sein sollte als die Zählrate der geblockten Wells (unspezifisch an die Zellen gebundenes ¹¹¹In-Minigastrin-DTPA).

Blocksubstanz	spezifische Bindung	unspezifische Bindung
AMI-25-Gastrin	447,7 ±7,8 cpm	494,7 ±48,8 cpm
Minigastrin (Kontrolle)	546,7 ±65,8 cpm	201,0 ±34,6 cpm
AMI-25-Gastrin	3037,4 ±343,4 cpm	2698,4 ±72,2 cpm

Tabelle 12: Bindungsversuch AMI-25-Gastrin mit CCK/2-Zellen

Die in Tabelle 12 aufgeführten Ergebnisse der Bindungsversuche (2 x AMI-25-Gastrin und 1 x Kontrolle) zeigen keinen einheitlichen Trend. Die Kontrolle mit Minigastrin als Blocksubstanz zeigt eine um den Faktor 2,7 höhere spezifische Bindung an den Gastrinrezeptor als die unspezifische Bindung an die CCK/2-Zellen. Der erste

Bindungsversuch mit AMI-25-Gastrin als Blocksubstanz zeigt ähnliche Zählraten, wie der Kontrollversuch, aber keinen signifikanten Unterschied zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung.

Beim zweiten Bindungsversuch fallen zunächst die um den Faktor 10 erhöhten Zählraten im Vergleich zum Kontrollversuch und dem ersten Bindungsversuch auf. Außerdem ist auch eine geringfügig höhere Zählrate (Faktor 1,1) bei der spezifischen Bindung zu beobachten.

6 Ergebnisse und Zusammenfassung

Auf dem in diesem Teil der Arbeit beschriebenen Weg ist es prinzipiell möglich, peptidbasierte, rezeptorspezifische, superparamagnetische Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie zu synthetisieren.

Die kovalente Anbindung des zur Verfügung stehenden Peptids, dem Minigastrin, an die Dextranhülle des superparamagnetischen Eisenoxidpartikels AMI-25 (Endorem[®], Guerbet) gelang, nach chemischer Umwandlung der freien Aminogruppe des Minigastrins in ein Isothiocyanat und der Aminierung der Hydroxylgruppen der Dextranhülle des SPIOs, ohne Probleme. Bei dem beschrittenen Syntheseweg konnte mangels geeigneter Analysemethoden keine Aussage über das Verhältnis von Eisenoxidpartikel und an ihn gebundenem Peptid getroffen werden. Es ist aber anzunehmen, dass sich das Peptid statistisch auf die vorhandenen Eisenoxidpartikel verteilt und an sie bindet.

Der Zellversuch zur Rezeptorbindung des gastringekoppelten, superparamagnetischen Eisenoxidpartikels mit CCK/2-Zellen verlief nicht zufriedenstellend, da die Rezeptorspezifität nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte. Dennoch legen die Ergebnisse des Zellversuchs die Vermutung nahe, dass es prinzipiell möglich ist superparamagnetische Eisenoxidpartikel auf diesem Weg rezeptorspezifisch zu machen.

Eine endgültige Beurteilung der Eignung des auf dem beschriebenen Weg synthetisierten gastringekoppelten, superparamagnetischen Eisenoxidpartikels als rezeptorspezifisches Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie ist anhand dieser Arbeit nicht möglich, ließe sich aber durch weitere Tests, für die in dieser Arbeit im Rahmen dieses Nebenprojektes keine Zeit war, durchaus erbringen.

Synthese eines
Diethylentriaminpentaessigsäure-Derivats des
Polyethylenimmins

Teil II

7 Einleitung

7.1 Gentherapie

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Gentherapie als potenzielle Möglichkeit zur Therapie von verschiedenen Krankheiten herausgestellt und wird in vielen klinischen und prä-klinischen Studien untersucht.

Die Gentherapie, der Transport von RNA oder DNA in eukariontische Zellen, ist also ein vielversprechender Ansatz, Krankheiten (z.B. Mukoviszidose) zu behandeln. Die folgenden Punkte sind entscheidend für jedes Gentransfersystem [14, Kunath]:

- Bindung an Zielzellen
- Internalisierung
- Endosomale Ausschleusung (endosomal escape)
- Freisetzung der therapeutischen DNA oder RNA
- Einschleusung der therapeutischen DNA oder RNA in den Zellkern

Es gibt viele Ansätze für die Gentherapie, die je nach der Art unterschieden werden können, wie das genetische Material dem Patienten verabreicht wird [15, Ledley]:

- zellbasierte Therapie
- virusbasierte Therapie
- plasmidbasierte Therapie
- Therapie mit synthetischen Gentransfersystemen

Die zellbasierte Gentherapie wird oft als ex-vivo Therapie bezeichnet, da das genetische Material außerhalb des Körpers in Zellen eingeschleust wird. Für die zellbasierte Therapie wird therapeutische DNA außerhalb des Körpers in Zellen, die dem Patienten vorher entnommen wurden, eingeschleust. Die so veränderten Zellen werden anschließend durch Transplantation oder Infusion wieder in den Patienten gebracht und können dort für die Lebenszeit dieser Zellen wirken.

Bei der virusbasierten Therapie macht man sich die hochentwickelten Wege zur Infektion von Viren zu nutze, um therapeutische Gene effizient in den Körper zu bringen. Hierzu werden

abgeschwächte oder defekte (schadhafte, fehlerhafte) Viren genutzt, die therapeutisches Genmaterial auf dem Weg einer Infektion in Zellen bringen, sich aber nicht vermehren und keine viralen Krankheiten auslösen können. Verschiedene virale Vektoren wurden für die Gentherapie entwickelt und werden derzeit in klinischen Studien untersucht:

- retrovirale Vektoren
- adeno-assoziierte Vektoren
- adeneovirale Vektoren

Retroviren waren die ersten viralen Vektoren, die für die Gentherapie genutzt wurden, und sind bis heute die am meisten in klinischen Studien untersuchten. Retroviren sind RNA Viren, die die Fähigkeit besitzen, ihre Gene dauerhaft durch eine Infektion in die Chromosomen der Wirtszelle einzufügen. Theoretisch gibt es Bedenken wegen potentieller Gefahren bei der Anwendung von Retroviren. So könnte eine zufällig in ein Chromosom einer Wirtszelle eingefügte Gensequenz Mutagenese oder Onkogenese auslösen. Desweiteren neigen Retroviren dazu, mit anderen Viren oder RNAs zu rekombinieren, was zu fortpflanzungsfähigen Retroviren mit unbekanntem Eigenschaften führen kann. Dieses wurde während präklinischen Studien und während der Herstellung von Retroviren aber noch nicht in klinischen Studien beobachtet.

Adeno-assoziierte Viren (AAV) sind DNA Viren, die in der Lage sind, ihr Genom permanent und spezifisch in die Chromosomen einer Wirtszelle einzufügen. Als DNA Viren sind AAV weniger anfällig für Rekombination. Das Hauptproblem bei der Gentherapie mit AAV ist die Produktion von für die Therapie ausreichenden AAV-Mengen.

Aufgrund der hohen Effektivität der adenoviralen Infektion, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, ist der adenovirale Vektor im Vergleich zu den beiden anderen viralen Vektoren der Beste. Im Gegensatz zu den AAV fügen die adenoviralen Vektoren ihre DNA nicht in die Chromosomen der Gastzellen ein. Sie bleiben im Kern als extrachromosomales Element (Episom). Da adenovirale Vektoren abgeschwächte Viren nutzen, die verschiedene virale Proteine exprimieren, wird eine toxische Wirkung beobachtet, die auch die Hauptbeschränkung dieses Vektors ist. Eine weitere Beschränkung bei der Anwendung des adenoviralen Vektors sind Immunreaktionen und Entzündungen in Gewebe, das durch diesen Vektor angegriffen wird. Außerdem reagiert das Immunsystem auch auf die zur Therapie eingesetzten Adenoviren.

Plasmidbasierte Ansätze zur Gentherapie, oft als „nichtvirale Gentherapie“ bezeichnet, beinhalten die direkte Gabe von reiner DNA oder DNA Formulierungen in den Patienten. Die am intensivsten untersuchte Methode der plasmidbasierten Gentherapie ist die Gabe von DNA, die in Lipide eingeschlossen ist. Der Prototyp eines kationischen, peptidbasierten Gentransportsystems enthält DOTMA (1,2-Dioleoyloxypropyl-3-trimethylammoniumbromid) und DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamin). Die nichtviralen Gentherapievektoren besitzen theoretisch einige Vorteile gegenüber den viralen Vektoren: ihre offensichtliche Sicherheit (keine Immunreaktion und keine virale Rekombination) und ihre geringeren Produktionskosten. Ein weiterer Vorteil von nichtviralen Gentherapievektoren ist die sichere, einfache und reproduzierbare Synthese. Nachteile der nichtviralen Gentherapievektoren sind zum einen ihre geringere Effektivität bei der „Genlieferung“ im Vergleich zu viralen Vektoren und zum anderen können mit nichtviralen Vektoren nicht so hohe Level der Genexpression wie bei viralen Gentherapievektoren erreicht werden.

Andere synthetische Gentransfersysteme, wie zum Beispiel Liposomen und Polymere, werden im Hinblick auf ihre Nutzung in der Gentherapie untersucht. [16, De Smedt] Hierbei wird bei den Polymeren den kationischen Polymeren, zum Beispiel Polyethylenimin (PEI), die in der Lage sind, große Gene zu kleineren Strukturen zu kondensieren und außerdem auch die negative Ladung der DNA maskieren, besondere Aufmerksamkeit zu Teil. Diese Eigenschaften des PEIs entsprechen den Anforderungen für die Transfektion der meisten Zellarten.

Eine wichtige Anforderung an diese synthetischen, makromolekularen Gentransfersysteme ist, dass sie sich nicht im Körper anreichern und somit auch keine toxischen Reaktionen im Körper auslösen. [17, Petersen] (Die Ausscheidung der Polykationen als Funktion der Zeit ist also sehr wichtig.) Es wurde berichtet, dass sich kationische Makromoleküle und ihre Komplexe meist in der Leber oder der Niere anreichern. Desweiteren ist bekannt, dass hydrophile Substanzen mit kleineren Molekulargewichten durch die Nieren ausgeschieden werden, wenn ihr Molekulargewicht kleiner als 30 kDa ist. Makromolekulare Gentransporter mit höherem Molekulargewicht müssen metabolisiert werden, bevor sie ausgeschieden werden können. Synthetische Makromoleküle können im Gegensatz zu natürlichen Makromolekülen oft nicht enzymatisch gespalten werden. Die Gefahr der Anreicherung der kationischen Polymere im Körper macht es notwendig genau zu wissen, wie sie sich im Körper verteilen.

7.2 Ziel der Arbeit

Wie oben erwähnt ist bei der Gentherapie mit kationischen Polymeren darauf zu achten, dass diese nicht im Körper angereichert werden. Eine relativ einfache Methode den Verbleib eines Moleküls im Körper zu verfolgen, ist seine Visualisierung in radiologischen Bildgebungsverfahren, wie z.B. MRT oder SPECT.

Das Ziel dieser Arbeit ist die chemische Veränderung des PEIs, eines kationischen Polymeres, so dass es für diese Bildgebungsverfahren zugänglich ist. Hierzu sollte das PEI-Molekül mit einem Chelator, Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA), versehen werden, damit es nach anschließender Komplexierung mit Indium-111 oder Gadolinium für SPECT bzw. MRT sichtbar ist.

7.3 PEI Chemie

Polyethylenimine (PEI) ist ein Polymer (siehe Abbildung 39), das in zwei verschiedenen Formen vorkommt: der linearen und der verzweigten. Basiseinheit beider Formen sind zwei CH_2 -Gruppen gefolgt von einem Stickstoffatom.

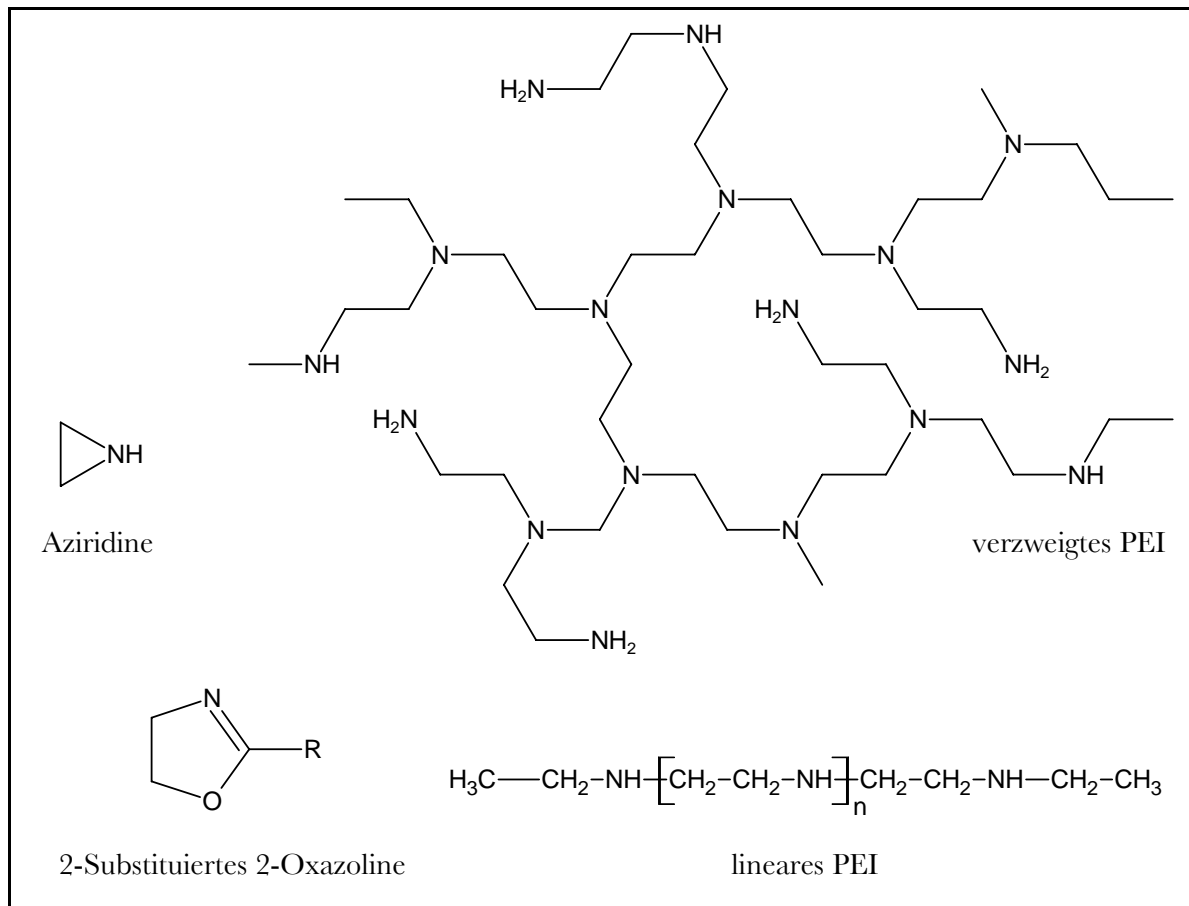


Abbildung 39: Strukturen von PEI und seinen Edukten

Das verzweigte PEI wird ausgehend vom Aziridine (siehe Abbildung 39) durch kationische Polymerisation über einen Kettenwachstumsmechanismus gewonnen, wobei die Verzweigungen von der Interaktion zweier wachsender Polymerketten herrühren. Das Polymerwachstum endet durch „back biting“ oder intramolekularer makrozyklischer Ringbildung [18, Godbey]. Das lineare PEI wird auch durch kationische Polymerisation, aber ausgehend von einem 2-substituierten 2-Oxazoline Monomer (siehe Abbildung 39), gewonnen. Das Produkt (z.B. lineares Poly(N-formalethylenimin)) wird hydrolysiert, um lineares PEI zu erhalten. Lineares PEI kann auch auf dem gleichen Reaktionsweg wie das verzweigte PEI erhalten werden, allerdings muss die Polymerisation hierzu bei relativ niedrigeren Temperaturen ablaufen. Diese Reaktion liefert dann lineare PEI-Moleküle höherer

Molekulargewichtes (bis zu 25 kDa), die hierbei durch Ausfällung vom verzweigten PEI getrennt werden. Verzweigtes PEI hat sich als erheblich besser geeignet für die Zelltransfektion herausgestellt und ist somit das Mittel der Wahl für PEI, welches für den Gentransfer genutzt wird.

Verzweigtes PEI enthält neben den Ethylenbrücken sowohl primäre, als auch sekundäre und tertiäre Amine. Da jedes dieser Amine protoniert werden kann, ist PEI über einen weiten pH-Bereich ein guter Puffer. Kommerziell erhältlich ist PEI von drei verschiedenen Firmen. Das Molekulargewicht des PEIs ist dabei abhängig vom jeweiligen Lieferanten.

8 Experimenteller Teil

Im nachfolgenden Kapitel wird zunächst auf die Synthese und im Anschluss auf die Analysen der PEI-DTPA-Derivate eingegangen.

8.1 Allgemeine Betrachtungen zur Synthese der PEI-DTPA-Derivate

Um Polyethylenimin (PEI) radioaktiv mit Indium-111 markieren zu können, wurden PEI und Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA, siehe Abbildung 40) als Chelator für das dreifach positiv geladene Ion $^{111}\text{In}^{3+}$ miteinander kovalent verbunden.

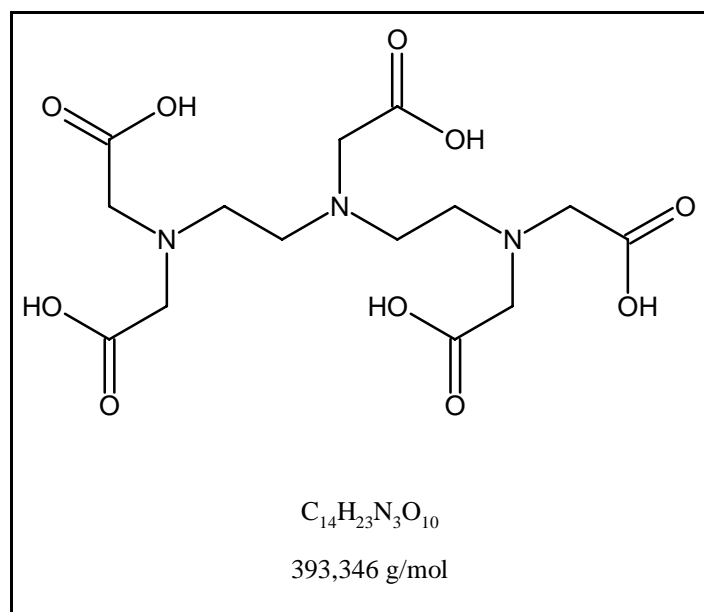


Abbildung 40: DTPA

Als „Angriffspunkt“ für die Kopplung wurden auf der einen Seite die freien, primären Aminogruppen des PEIs genutzt. Um bei der Bindungsknüpfung keine der fünf Essigsäuregruppen der DTPA zu verlieren und somit weiterhin eine optimale octaedrische Struktur des DTPA- In^{3+} -Komplexes [19, Mäcke] zu ermöglichen, wurde keine Amidbindung zwischen einer der Essigsäuregruppen und einer Aminogruppe des PEIs geknüpft. Statt der DTPA wurde die para-Isothiocyanato-benzyl-diethylentriaminpentaessigsäure (p-SCN-Bz-DTPA, siehe Abbildung 41) genutzt, so dass die Bindungsknüpfung über das Diethylentriamin-Gerüst der DTPA, durch Bildung eines Thioharnstoffs zu Stande kommt.

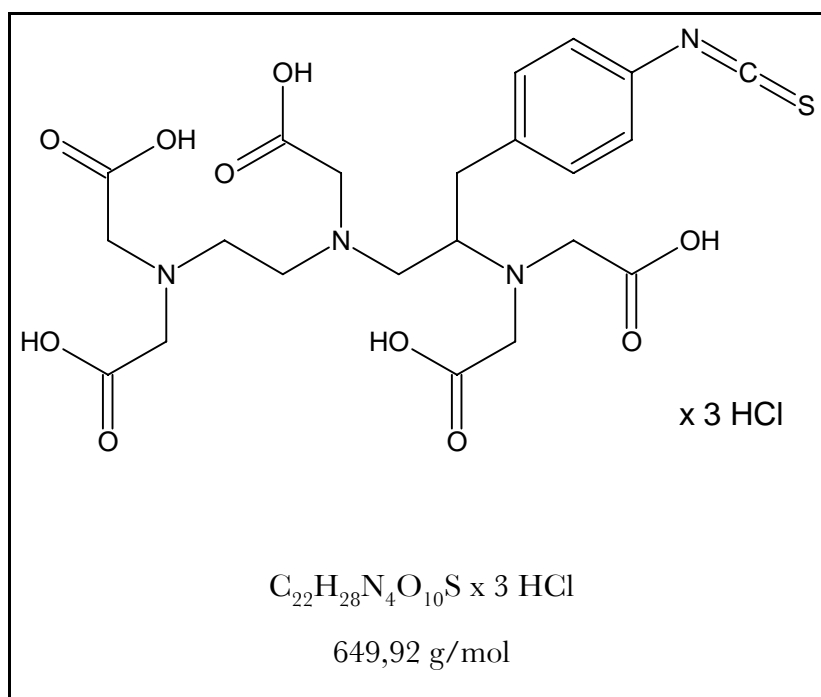


Abbildung 41: p-SCN-Bz-DTPA

8.2 Synthese der PEI-DTPA-Derivate

Zu Beginn der Arbeit wurden drei PEI-DTPA-Derivate synthetisiert, die sich in ihrem DTPA-Gehalt unterscheiden.

Hierzu wurden jeweils 10 mg PEI (Sigma, mittleres Molekulgewicht ca. 60000 kDa) in 1,0 mL Wasser (H_2O) gelöst. Zu diesen Lösungen wurden 5, 10 bzw. 15 mg p-SCN-Bz-DTPA \cdot 3 HCl (Macrocylics) gegeben und der pH-Wert der Reaktionslösungen mit Diisopropylethylamin (DIPEA) auf 8 eingestellt. Nach zweistündigem Schütteln bei Raumtemperatur wurden die Ansätze in 10 kDa-Filter (Ultrafree[®]-4, Centrifugal Filter Unit, Millipore) überführt und 30 min zentrifugiert (4000 min^{-1}). Anschließend wurde fünf mal mit je 1,0 mL Natriumacetatlösung (NaOAc, 0,5-M, pH = 5,4) zentrifugiert. Die schweren Fraktionen ($>10 \text{ kDa}$) wurden dann in je 1,0 mL NaOAc (0,5-M, pH = 5,4) aufgenommen. Dieser Arbeitsschritt wird im Folgenden als Umpuffern bezeichnet.

8.3 Analysen

Im Anschluss an die Synthesen wurden die Reaktionsprodukte verschiedenen Analysen unterzogen, die Aufschluss darüber geben sollten, ob und wenn ja wieviel p-SCN-Bz-DTPA ans PEI gebunden wurde.

8.3.1 UV/Vis-Analyse (Reaktionskontrolle)

Um den Erfolg der Kupplungsreaktion zu bestätigen, wurden von den Reaktionsprodukten und vom PEI UV/Vis-Spektren aufgenommen (siehe Abbildung 42).

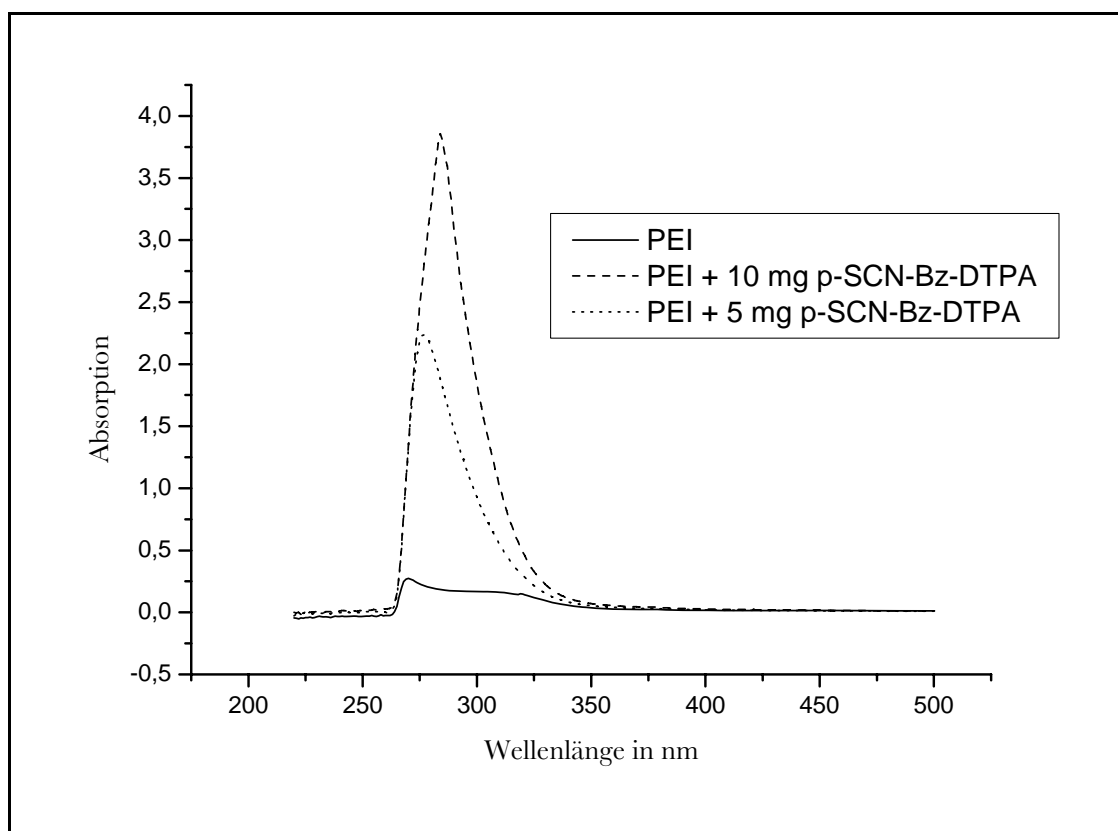


Abbildung 42: UV/Vis Spektren der Kopplungsprodukte

Die UV/Vis-Spektren zeigen eindeutig, dass eine Kopplung zwischen dem PEI und der p-SCN-Bz-DTPA stattgefunden hat. In den UV/Vis-Spektren der Kupplungsprodukte ist eine Absorptionsbande zwischen 260 und 350 nm zu erkennen. Diese Absorption rührt von der N-Phenylthioharnstoff-Gruppe her, über die die DTPA an das PEI gekoppelt wurde. Die im Vergleich zum 5 mg Ansatz doppelt so große Peakfläche des 10 mg Ansatzes legt die Vermutung nahe, dass auch doppelt so viel p-SCN-Bz-DTPA an das PEI gebunden wurde.

8.3.2 Radioaktive Probemarkierung (Reaktionskontrolle)

Von jedem Ansatz wurden radioaktive Probemarkierungen mit $^{111}\text{Indium(III)chlorid}$ ($^{111}\text{InCl}_3$) durchgeführt. Hierzu wurden jeweils $10\ \mu\text{l}$ der Produktlösung (siehe oben), $8\ \mu\text{l}$ NaOAc (0,5-M, pH = 5,4) und $0,1\ \mu\text{Ci}$ $^{111}\text{InCl}_3$ (ca. $2,0\ \mu\text{l}$) bei 40°C 30 min inkubiert. Anschließend wurde säulenchromatographisch über eine PD10/G25-Desalting-Culum (Amersham Pharmacia Biotech) getrennt (Laufmittel: NaOAc [0,5-M, pH = 5,4], 20 Fraktionen a 13 Tropfen). Die erhaltenen Fraktionen wurden mit je $5,0\ \text{ml}$ Liquid-Scintillation-Cocktail versetzt und jeweils 5 min im Liquid-Scintillation-Counter (LSC, Minaxi Tri-Carb[®] 4000 Series, United Technologies Packard[®]) gemessen. In den Chromatogrammen (siehe Abbildung 43) sind bei allen Ansätzen (5, 10 und 15 mg p-SCN-Bz-DTPA) zwei Peaks zu beobachten. Der Peak mit dem Maximum bei Fraktion 6 zeigt das mit $^{111}\text{In}^{3+}$ markierte Kopplungsprodukt. Der zweite, breitere Peak mit dem Maximum bei Fraktion 12 rührt von freien, unkomplexiertem $^{111}\text{In}^{3+}$ her.

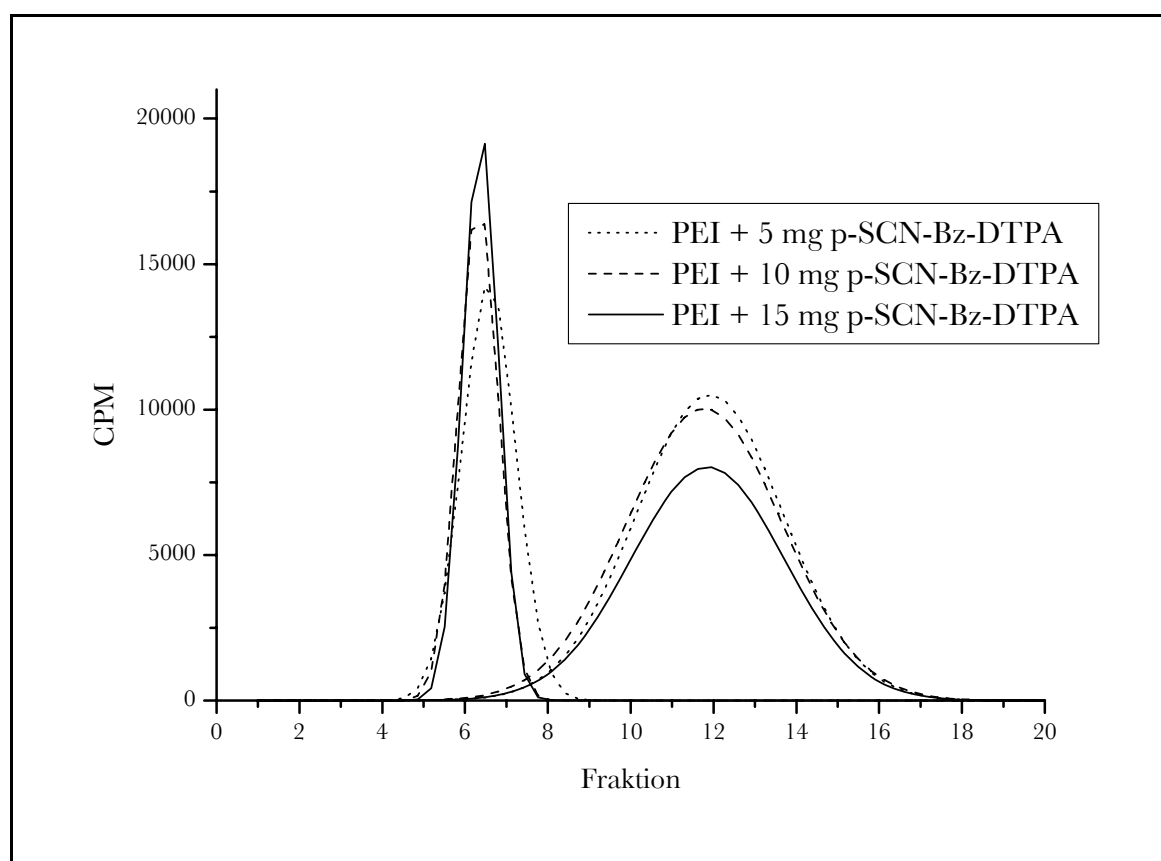


Abbildung 43: Probemarkierung

8.3.3 UV/Vis-Analyse

Nachdem der Erfolg der Kopplung sowohl durch UV/Vis-Spektroskopie als auch durch die radioaktive Probemarkierung, nachgewiesen worden ist, wurde nun mittels der UV/Vis-Spektroskopie die Menge der ans PEI gebundenen DTPA für den Ansatz mit 10 mg p-SCN-Bz-DTPA bestimmt.

Für die UV/Vis-Analyse wurde N-Phenylthioharnstoff (siehe Abbildung 44) als Standard genutzt, da seine Struktur mit der Struktur der Brücke, über die die DTPA mit dem PEI verbunden ist und die für die Absorption verantwortlich ist, übereinstimmt.

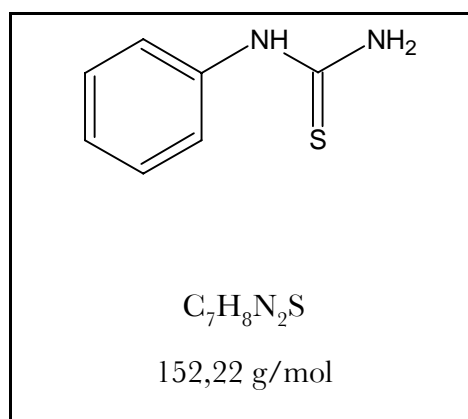


Abbildung 44: N-Phenylthioharnstoff

Die Absorptionsmaxima (siehe Abbildung 45) des gewählten Standards und der Zielverbindung liegen bei ca. 266 nm, während sowohl das PEI als auch das Lösungsmittel (Wasser) in diesem Bereich keine signifikante Absorption aufweisen.

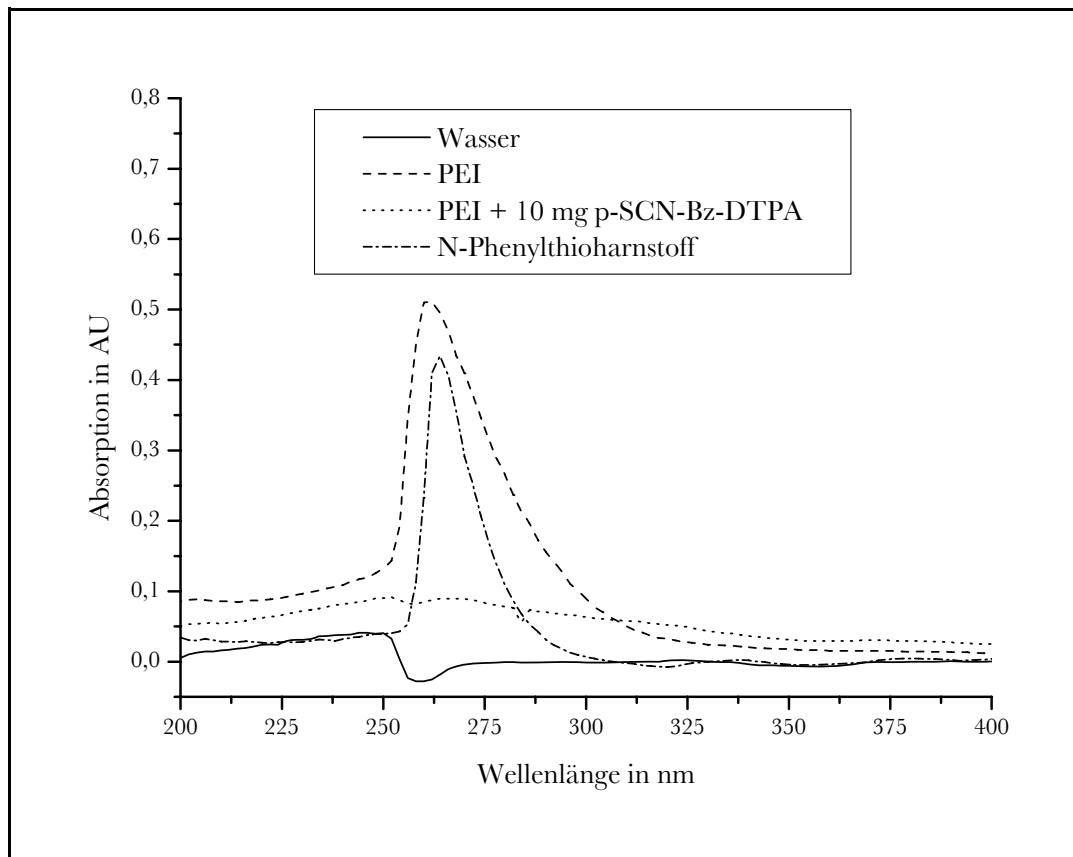


Abbildung 45: UV/Vis-Überblick

Für die Kalibriergerade wurden 0,1036 g N-Phenylthioharnstoff in 100 mL Wasser gelöst ($6,806 \cdot 10^{-3}$ mol/L). Aus dieser Lösung wurden durch verdünnen mit Wasser Lösungen verschiedener N-Phenylthioharnstoffkonzentration hergestellt und in einem Wellenlängenbereich von 190 nm bis 450 nm gegen Wasser als Referenz gemessen. Anschließend wurden die N-Phenylthioharnstoff Stoffmengen in mol und die Peakflächen der Absorptionsbanden gegeneinander aufgetragen (siehe Abbildung 46).

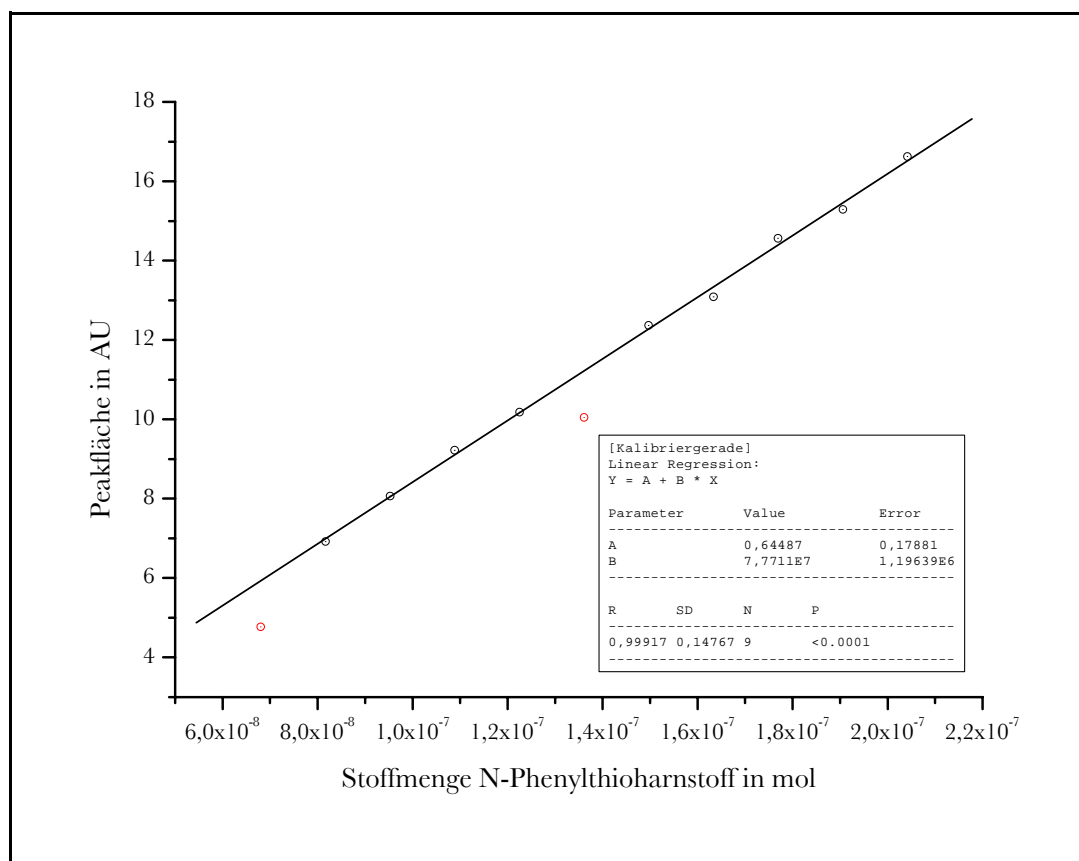


Abbildung 46: Kalibriergerade

Für die Bestimmung des DTPA-Gehaltes der Lösung des 10 mg p-SCN-Bz-DTPA Ansatzes wurden 10 μL dieser Lösung mit Wasser auf 1,0 mL aufgefüllt und ebenfalls gemessen. Es ergab sich eine Absorptionsbandenpeakfläche von 12,445. Durch Einsetzen in die Kalibriergeradengleichung konnte nun ein N-Phenylthioharnstoff-Gehalt von $1,518 \cdot 10^{-7}$ mol pro 10 μL Lösung berechnet werden. Folglich enthalten 1,0 mL Lösung $1,518 \cdot 10^{-5}$ mol N-Phenylthioharnstoff. Diese Stoffmenge N-Phenylthioharnstoff stimmt im Rahmen von Messungenauigkeit und Wägefehlern ziemlich genau mit der eingesetzten Stoffmenge p-SCN-Bz-DTPA von $1,539 \cdot 10^{-5}$ mol (10 mg) überein (siehe Tabelle 13).

eingesetzte Stoffmenge p-SCN-Bz-DTPA in mol	$1,539 \cdot 10^{-5}$
experimentell bestimmte Stoffmenge N-Phenylthioharnstoff in mol	$1,518 \cdot 10^{-5}$

Tabelle 13: Stoffmengen

Es kann also festgestellt werden, dass praktisch die gesamte eingesetzte Menge p-SCN-Bz-DTPA über die N-Phenylthioharnstoffbrücke an das PEI gebunden hat.

8.3.4 Ermittlung der maximalen Indium(III)-Aufnahme

Mit den nachfolgenden Analysen soll die Stoffmenge an In^{3+} bestimmt werden, die maximal von den zuvor synthetisierten PEI-DTPA-Derivaten aufgenommen (komplexiert) werden kann.

Hierzu wurden die PEI-DTPA-Derivate mit InCl_3 -Lösung (mit $0,1 \mu\text{Ci}$ In-111 pro Analyse getracert) 30 min bei 40°C inkubiert und anschließend über PD10/G25-Desalting-Culums getrennt (Laufmittel: NaOAc [0,5-M, pH = 5,4], 20 Fraktionen a 13 Tropfen). Die erhaltenen Fraktionen wurden mit je 5,0 mL Liquid-Scintillations-Cocktail versetzt und jeweils 5 min im Liquid-Scintillation-Counter (LSC, Minaxi Tri-Carb[®] 4000 Series, United Technologies Packard[®]) gemessen. Die resultierenden Chromatogramme (siehe: Abbildung 47) zeigen zwei Peaks. Der als erstes eluierte Peak ist das PEI-DTPA-Derivat, das In^{3+} komplexiert hat. Der an zweiter Stelle im Chromatogramm erscheinende Peak rührt von unkomplexiertem In^{3+} her.

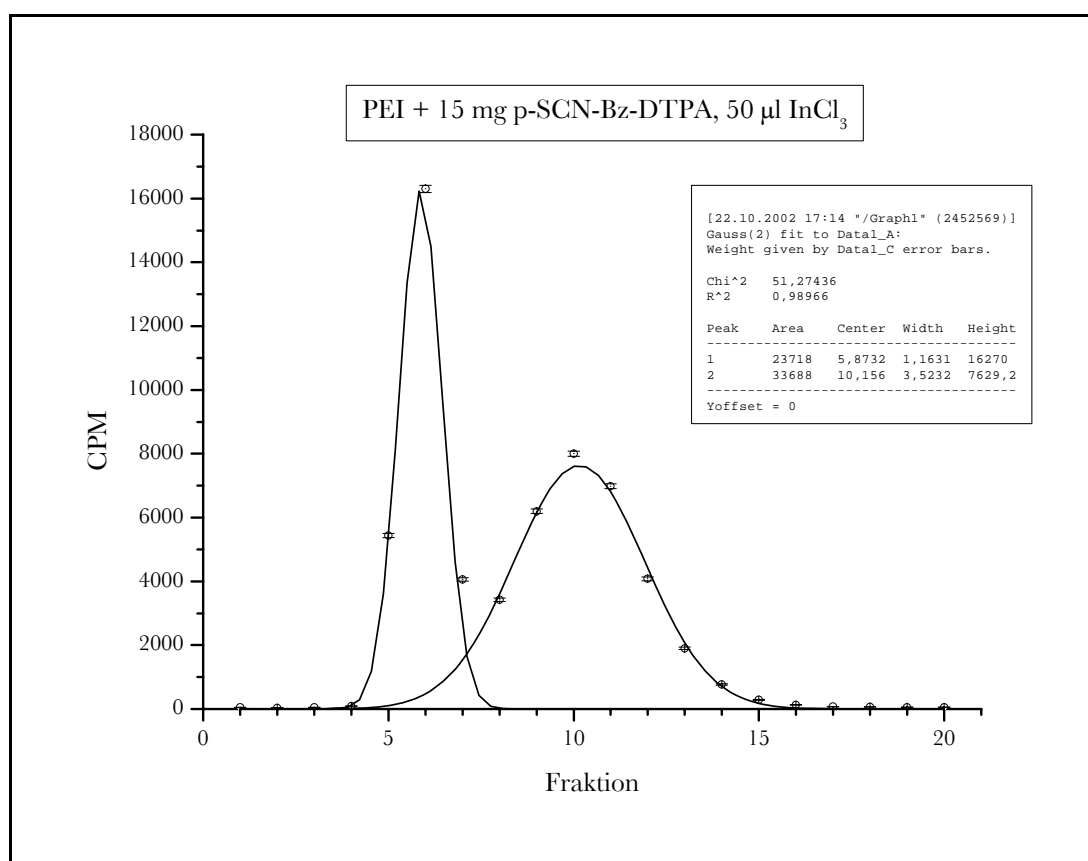


Abbildung 47: Beispielchromatogramm

Steigert man die Indiummenge immer weiter, so sollte die Stoffmenge des komplexierten Indiums in eine Sättigung laufen. Die Sättigungskonzentration entspricht dann der maximal von den PEI-DTPA-Derivaten aufnehmbaren (komplexierbaren) Indiummenge, die im Idealfall gleich der Chelatormenge sein sollte, die an das PEI gekoppelt worden ist.

Als erstes wurde untersucht, ob es einen Unterschied in der aufgenommenen Indiummenge zwischen PEI und einem synthetisiertem PEI-DTPA-Derivat gibt. Hierzu wurden 50 μL NaOAc (0,5-M, pH = 5,4), unterschiedliche Mengen einer InCl_3 -Lösung ($3,777 \cdot 10^{-2}$ mol/L), 0,1 μCi In-111 und je 50 μL PEI (10 mg pro 1,0 mL NaOAc [0,5-M, pH = 5,4]) bzw. 50 μL PEI+15 mg p-SCN-Bz-DTPA (10 mg pro 1,0 mL NaOAc [0,5-M, pH = 5,4]) bei 40°C 30 min inkubiert und anschließend wie oben beschrieben über PD10/G25-Desalting-Colum säulenchromatographisch getrennt und gemessen. Zur Veranschaulichung wurde die eingesetzte Stoffmenge In^{3+} gegen die gebundene (komplexierte) Stoffmenge In^{3+} aufgetragen (siehe Abbildung 48).

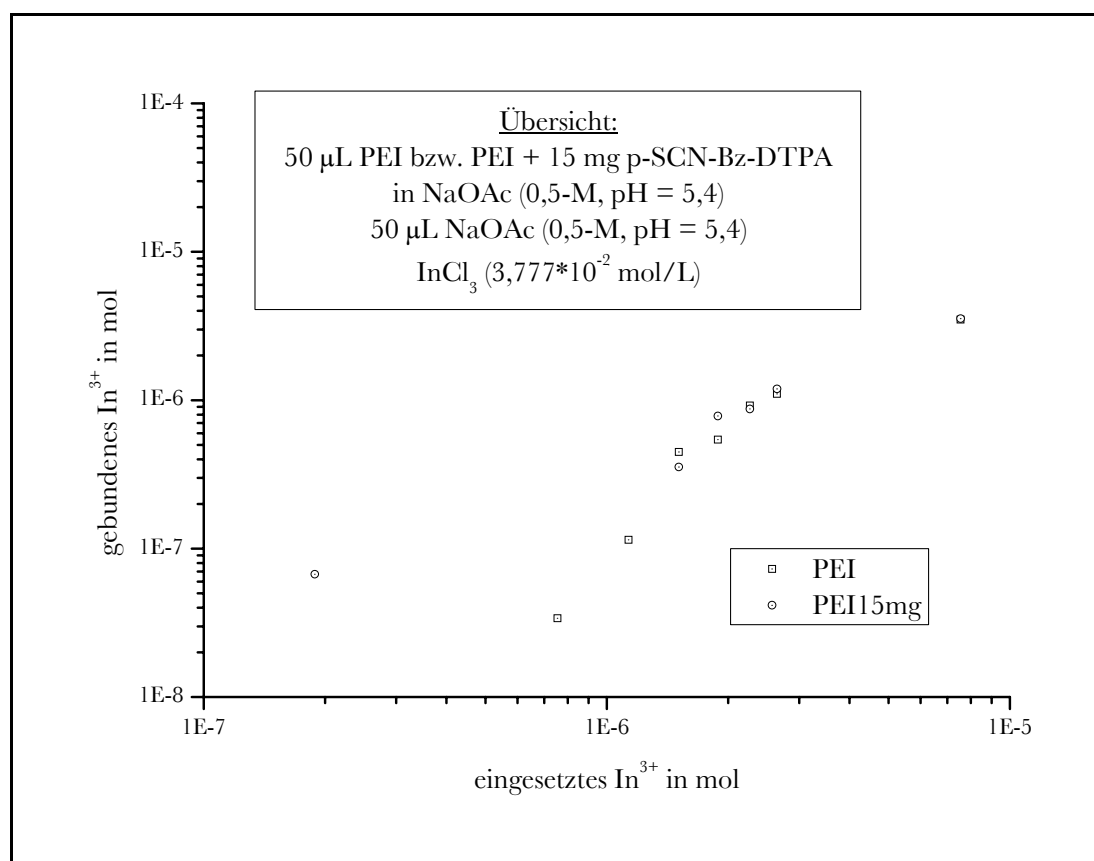


Abbildung 48: PEI und PEI + 15 mg p-SCN-Bz-DTPA

Die Auftragung der gebundenen In^{3+} -Menge für das reine PEI und das PEI-DTPA-Derivat mit 15 mg p-SCN-Bz-DTPA zeigt deutlich, dass sowohl das PEI als auch das PEI-DTPA-Derivat unter diesen Bedingungen ähnlich, wenn nicht sogar gleich viel In^{3+} binden.

Aufgrund dieser Tatsache wurde die Arbeitsvorschrift dahingehend geändert, dass der Markierungsansatz nach der dreißigminütigen Inkubationszeit in einen 10 kDa-Filter (Ultrafree[®]-4, Centrifugal Filter Unit, Millipore) überführt und 25 min zentrifugiert (4000 min^{-1}) wurde, um das unkomplexierte In^{3+} von dem komplexierten zu trennen. Zusätzlich wurde anschließend viermal mit je 100 μL NaOAc (0,5-M, $\text{pH} = 5,4$) gewaschen. Hierzu wurden die 100 μL NaOAc (0,5-M, $\text{pH} = 5,4$) in den 10 kDa-Filter gegeben, dann wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wurde 25 min zentrifugiert (4000 min^{-1}). Das Ziel dieser „Waschung“ war die Entfernung von schwach im PEI-Gerüst des PEI-DTPA-Derivats gebundenen In^{3+} . Den Erfolg dieser Maßnahme, eine um den Faktor 5 bis 9 verminderte gebundene In^{3+} -Menge, kann man deutlich in der Auftragung (siehe Abbildung 49) und in der Tabelle (siehe: Tabelle 13) sehen.

	Analyse Methode	Stoffmenge In^{3+} in mol	
		eingesetzt	gebunden
A	ohne Waschen	$1,885 \cdot 10^{-7}$	$6,716 \cdot 10^{-8}$
	mit Waschen		$1,145 \cdot 10^{-8}$
B	ohne Waschen	$2,644 \cdot 10^{-6}$	$1,924 \cdot 10^{-6}$
	mit Waschen		$1,986 \cdot 10^{-7}$

Tabelle 13: Vergleich der gebundenen In^{3+} Stoffmengen

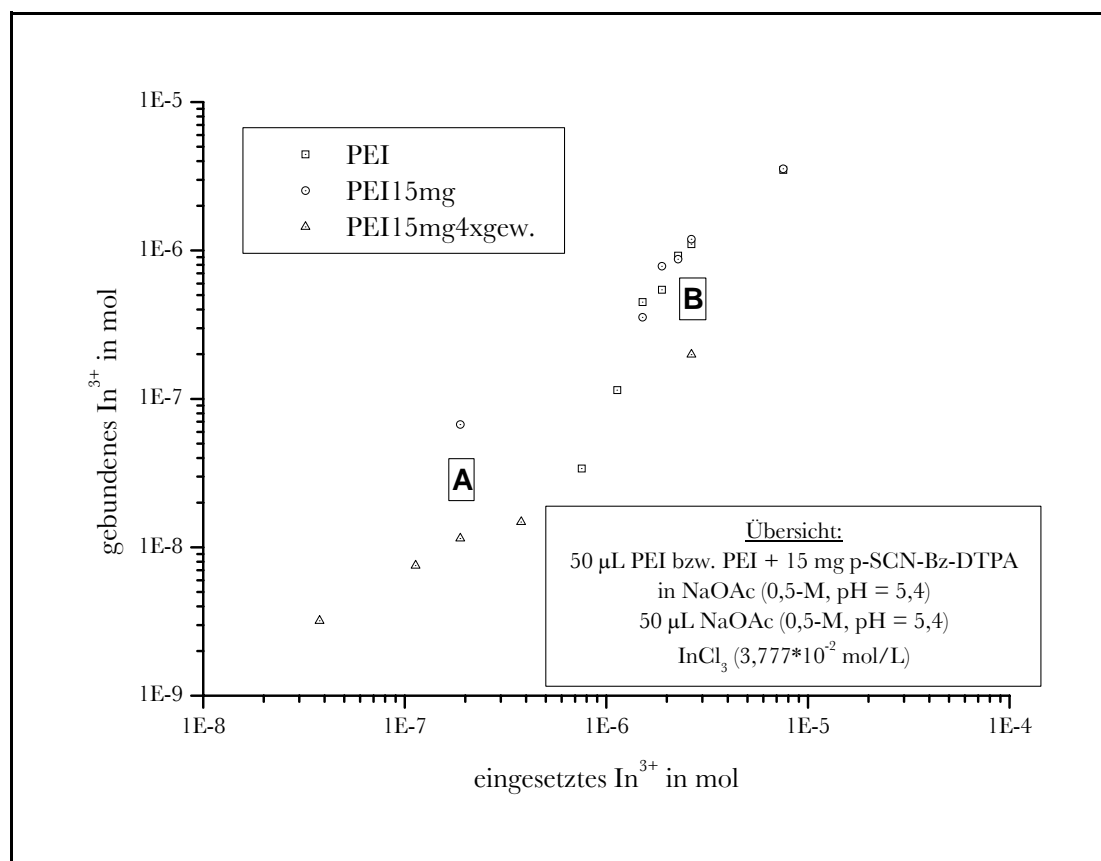


Abbildung 49: PEI-DTPA-Derivat 4 mal gewaschen

Für die nachfolgenden Analysen zur In^{3+} -Aufnahme der PEI-DTPA-Derivate wurde der Ansatz mit 10 mg p-SCN-Bz-DTPA genutzt, da durch die Reduzierung der p-SCN-Bz-DTPA-Menge im Vergleich zum Ansatz mit 15 mg p-SCN-Bz-DTPA, bei den nicht unerheblichen Preisen der p-SCN-Bz-DTPA, die Kosten um ein Drittel reduziert wurden.

Als nächstes wurde die pH-Abhängigkeit der In^{3+} -Aufnahme untersucht. Hierzu wurde wie oben beschrieben vorgegangen, mit dem einzigen Unterschied, dass der Markierungslösung eine im Vergleich zur In^{3+} -Stoffmenge gleich große Menge Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung (EDTA-Lösung) zugesetzt wurde. Die EDTA-Zugabe soll verhindern, dass In^{3+} an das PEI-Gerüst gebunden wird. Da der resultierende In^{3+} -EDTA-Komplex kleiner als 10 kDa ist, wird er beim Waschen entfernt und somit wie freies In^{3+} gewertet.

Die pH-Abhängigkeit der In^{3+} -Aufnahme wurde bei drei verschiedenen pH-Werten mit zwei verschiedenen Lösemitteln untersucht (siehe Tabelle 14). Die Auftragung der Analysenergebnisse (siehe: Abbildung 50) zeigt, dass die In^{3+} -Aufnahme einer deutlichen

pH-Abhängigkeit unterliegt. Je geringer der pH-Wert der Markierungslösung ist, desto mehr In^{3+} wird, bei gleicher eingesetzter In^{3+} -Menge, an das PEI-DTPA-Derivat gebunden.

Lösemittel	Konzentration in mol/L	pH-Wert
NaOAc	0,5	5,4
HOAc	0,5	4,1
HOAc	0,5	2,6

Tabelle 14: Lösemittel

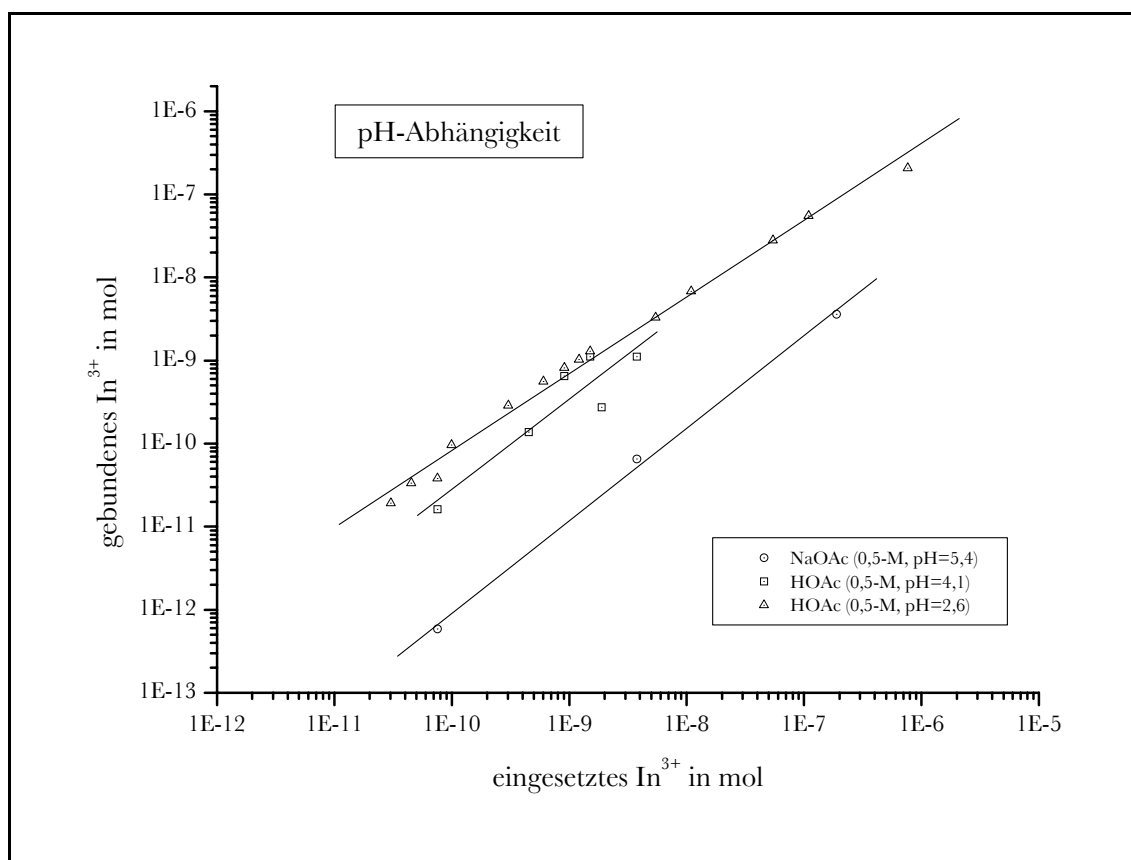


Abbildung 50: pH-Abhängigkeit

Im Anschluss an die vorhergegangenen Analysen wurde nun mit HOAc (0,5-M, pH = 2,6) als „Lösemittel“ für alle weiteren Analysen, zur Ermittlung der maximalen Indiummenge, die das PEI-DTPA-Derivat binden kann, fortgefahren. D.h. das PEI-DTPA-Derivat wurde für die Analysen mit diesem Lösemittel umgepuffert, bei allen Markierungen wurde dieses Lösemittel verwendet, sowohl zum Waschen der Markierungsansätze nach der Inkubation, als auch als Laufmittel bei der chromatographischen Trennung.

Die Auftragung (siehe: Abbildung 51) der gebundenen Stoffmenge In^{3+} gegen die eingesetzte Stoffmenge In^{3+} zeigt deutlich, dass die Stoffmenge des gebundenen In^{3+} begrenzt ist und in ein Maximum läuft.

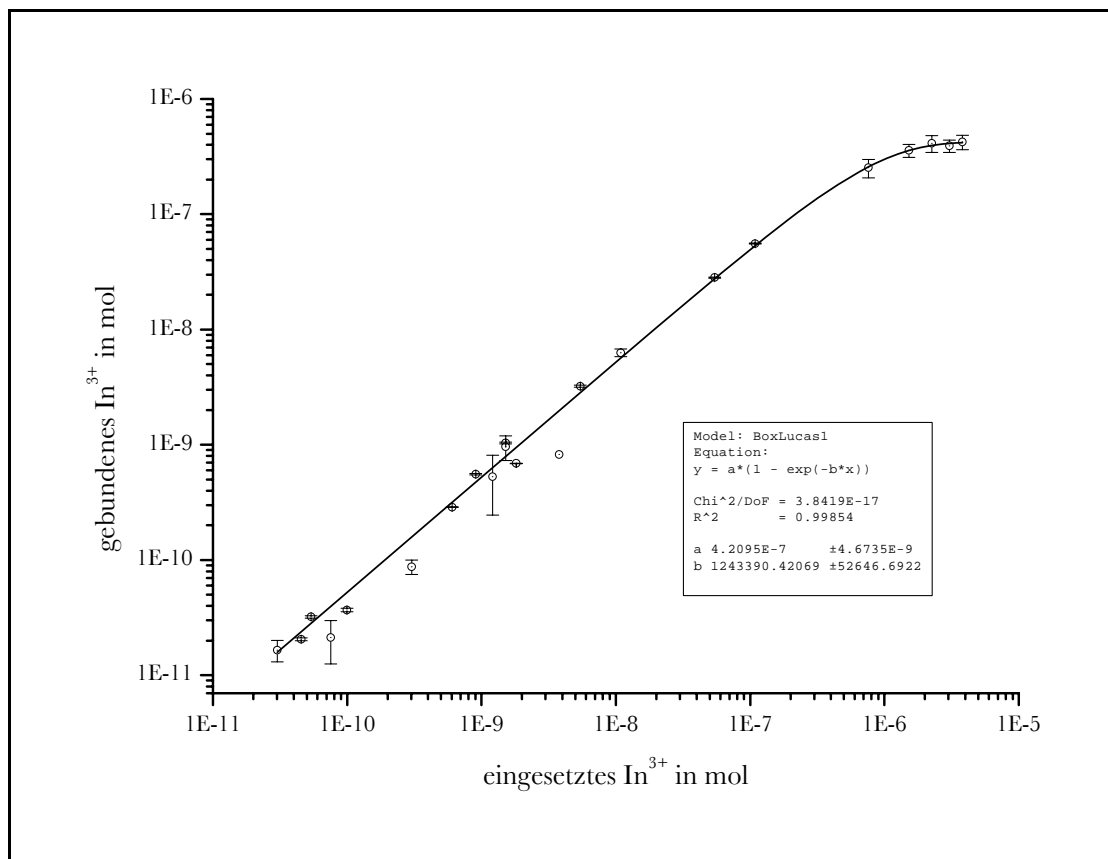


Abbildung 51: maximal komplexierbare Indiummenge

Die experimentell bestimmte maximal komplexierbare In^{3+} -Stoffmenge ($4,21 \cdot 10^{-7}$ mol pro 50 μL PEI-DTPA-Derivat) ist geringer als die theoretisch mögliche Stoffmenge ($7,70 \cdot 10^{-7}$ mol pro 50 μL PEI-DTPA-Derivat) (siehe: Tabelle 15).

eingesetzte Stoffmenge p-SCN-Bz-DTPA in mol	gebundene Stoffmenge In^{3+} in mol
$7,70 \cdot 10^{-7}$	$4,21 \cdot 10^{-7}$

Tabelle 15: Stoffmengenvergleich

Mit der verwendeten Markierungsvorschrift lassen sich also ca. 55% der DTPA-Gruppen des PEI-DTPA-Derivats mit In^{3+} sättigen.

9 Ergebnisse und Zusammenfassung

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Sichtbarmachung des kationischen Gentransferreagenzes Polyethylenimin (PEI) für die Magnetresonanztherapie (MRT) und die Einzelphotonenemissionstomographie (SPECT) auf dem verfolgten Weg möglich ist.

Der Chelator Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) wurde unter einfachen Reaktionsbedingungen über sein Grundgerüst ausgehend vom para-Isothiocyanato-benzyl-diethylentriaminpentaessigsäure (p-SCN-Bz-DTPA) über eine Thioharnstoffbrücke kovalent mit den Aminogruppen des PEI verbunden, so dass die Sichtbarmachung entweder durch $^{111}\text{In}^{3+}$ (SPECT) oder Gd^{3+} (MRT) möglich ist. Durch quantitative UV/Vis-spektroskopische Untersuchungen mit N-Phenylthioharnstoff als Standard konnte der vollständige Ablauf der Kupplungsreaktion nachgewiesen werden.

Bei Untersuchungen zur Komplexierung des dreiwertigen Indiums durch das synthetisierte PEI-DTPA-Derivat stellte sich heraus, dass durch das PEI-Gerüst gebundene In^{3+} in einfacher Weise durch Waschen im Zentrifugenfilter entfernt werden kann. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte eine pH-Wert-Abhängigkeit bei der komplexierten In^{3+} -Menge beobachtet werden. Je niedriger der pH-Wert der PEI-DTPA-Derivat-Lösung ist, desto mehr In^{3+} wird komplexiert. Die ermittelte maximal komplexierbare In^{3+} -Menge des synthetisierten PEI-DTPA-Derivats, in 0,5 molarer Essigsäure als Lösungsmittel, betrug 55% und lag bei einem pH-Wert von 2,6, der sich als niedrigst möglicher pH-Wert bei dem das PEI-DTPA-Derivat in Lösung bleibt, herausgestellt hat. Es konnten also 55% der DTPA-Gruppen mit In^{3+} gesättigt werden. Aufgrund seiner gleichen Ladung und ähnlichen Größe ist davon auszugehen das gleiches auch für das Gd^{3+} gilt.

Auf dem in diese Arbeit aufgezeigten Weg ist es also möglich das kationische Gentransferreagenzes Polyethylenimin so zu modifizieren, dass eine Verfolgung seines Verteilungsweges im Körper mit bildgebenden Verfahren möglich ist.

Anhang

10 Abkürzungen

^1H	Proton
α	Rotationswinkel in Rad
AAV	Adeno-assoziierte Viren
AMI-25	Endorem [®] (superparamagnetisches Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie)
AU	arbitrary units
B	magnetisches Feld
Boc	Tertiär-Buoxycarbonyl (Schutzgruppe)
c	Konzentration
CLIO	Cross Linked Iron Oxide
CPM	Zählrate pro Minute (engl.: counts per minute)
CT	Computertomographie
d	Durchmesser
ΔE	Energiedifferenz
E	Energie
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
DOPE	Dioleoylphosphatidylethanolamin
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododekan-N,N',N'',N'''-Tetraessigsäure
DOTMA	1,2-Dioleoyloxypropyl-3-trimethylammoniumbromid
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
E	Energie
ECF	extrazelluläre Flüssigkeit (engl.: extracellular fluid)
eq	Äquivalent
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Schutzgruppe)
γ	gyromagnetisches Verhältnis
Gd-DOTA	Dotarem [®] (Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie)
Gd-DTPA	Magnevist [®] (Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie)
Gd-EOB-DTPA	Eovist [®] (Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie)
h	Planck-Konstante
Harz	unlöslicher, polymerer Supporter bei der SPPS (engl.: resin)
HF	Fluorwasserstoffsäure

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: high performance liquid chromatographie)
I	Spinquantenzahl
k	Boltzman-Konstante
KM	Kontrastmittel
μ	magnetisches Moment
M	Molare Masse, resp. magnetisches Gesamtmoment
m	Spinquantenzahl, magnetische Quantenzustände, resp. Masse
MION	Monokristalliner Eisenoxidnanopartikel (engl.: monocrystalline iron oxide nanoparticles)
Mn-DPDP	Mn-N,N'-dipyridoxyl-ethylenediamine-N,N'-diacetate-5,5'-bis(phosphate) (Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie)
MRT	Magnetresonanztomographie
ν	Frequenz
n	Partikelzahl, Teilchenzahl
ν_0	Präzessionsfrequenz, Larmorfrequenz
p	Drehimpuls
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
ρ	Dichte
R	Relaxationsrate
r	Relaxivität
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
SPECT	Einzelphotonen-Emissions-Tomographie (engl.: single photon emission computed tomographie)
SPIO	Superparamagnetisches Eisenoxid (engl.: superparamagnetic ironoxide)
SPPS	Festphasenpeptidsynthese (engl.: solid phase peptid synthesis)
T	Temperatur
T_1	Zeitkonstante der Spin-Gitter-Relaxation
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
T_2	Zeitkonstante der Spin-Spin-Relaxation
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
USPIO	engl.: ultrasmall superparamagnetic ironoxide

UV/Vis	Ultravioletter/sichtbarer Bereich des Lichts (UV: 10 - 400 nm; Vis: 400 - 750 nm)
V	Volumen
VSIOP	Very Small SPIO
ω_0	Kreisfrequenz

11 Chemikalien

In der nachfolgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien mit ihren Summenformeln, ihren Molmassen und dem Hersteller von dem sie erworben wurden aufgeführt. Die Liste der Chemikalien ist nach den in der Arbeit verwendeten Abkürzungen sortiert.

Abkürzung	Name		
	Summenformel	Molmasse in g/mol	Hersteller
BSA	Albumin aus Rinderserum		
	$C_8H_{21}NOSi_2$	203,43	Fluka
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid		
	$C_{13}H_{22}N_2$	206,33	Fluka
DCM	Dichlormethan		
	CH_2Cl_2	84,93	Merck
DIPEA	Diisopropylethylamin		
	$C_6H_{15}N$	101,19	Fluka
DMEM	Dulbecco's Modified Medium		
	-	-	PAA
DMF	N,N-Dimethylformamid		
	C_3H_7NO	73,09	Fluka
DPT	Di-2-pyridylthiocarbonate		
	$C_{11}H_8N_2O_2S$	232,23	Aldrich
DTPA	Diethlentriamin-pentaessigsäure		
	$C_{14}H_{23}N_3O_{10}$	393,35	Fluka, Sigma
DTPA-DA	Diethlentriamin-pentaessigsäure-dianhydrid		
	$C_{14}H_{19}N_3O_8$	357,32	Fluka, Sigma
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure		
	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	292,24	Fluka
Et ₂ O	Diethylether		
	$C_4H_{10}O$	74,12	Merck

Abkürzung	Name		
	Summenformel	Molmasse in g/mol	Hersteller
EtOH	Ethanol		
	C ₂ H ₅ OH	46,07	Merck
Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH	N- α,ϵ -Fmoc-L-Lysin		
	C ₃₆ H ₃₄ N ₂ O ₆	590,70	Novabiochem
Harz-Gastrin	EEEEEEAYGWMDf 13mer		
	-	1663,70	Genossys
HOAc	Essigsäure		
	C ₂ H ₄ O ₂	60,05	Fluka
HOBt	1-Hydroxy-Benzotriazol		
	C ₆ H ₅ N ₃ O	135,12	Fluka
KCl	Kaliumchlorid		
	KCl	74,55	Fluka
KCN	Kaliumcyanid		
	KCN	65,12	Merck
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat		
	KH ₂ PO ₄	136,09	Fluka
Mannitol	D-Mannit		
	C ₆ H ₁₄ O ₆	182,17	Fluka
MeCN	Acetonitril		
	CH ₃ CN	41,05	Fluka
MeOH	Methanol		
	CH ₃ OH	32,00	Fluka
Minigastrin	Minigastrin 1 (Human)		
	C ₇₄ H ₉₉ N ₁₅ O ₂₆ S	1646,75	Bachem
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure		
	C ₇ H ₁₅ NO ₄ S	209,26	Fluka
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat		
	Na ₂ HPO ₄	141,96	Fluka

Abkürzung	Name		
	Summenformel	Molmasse in g/mol	Hersteller
NaCl	Natriumchlorid		
	NaCl	58,44	Fluka
NaOAc	Natriumacetat		
	CH ₃ COONa	82,03	Fluka
NaOH	Natriumhydroxid		
	NaOH	40,00	Fluka
NH ₃	Ammoniak		
	NH ₃	17,03	Fluka
NH ₄ OAc	Ammoniumacetat		
	C ₂ H ₇ NO ₂	77,08	Fluka
Ninhydrin	2,2-Dihydroxy-1,3-dioxohydrinden		
	C ₉ H ₆ O ₄	178,14	Fluka
PEI	Polyethyleneimine		
	-	-	Sigma
Phenol	Phenol		
	C ₆ H ₅ OH	94,11	Merck
Piperidin	Piperidin		
	C ₅ H ₁₁ N	85,15	Fluka
TFA	Trifluoressigsäure		
	CF ₃ COOH	114,02	Solvay
TIS	Triisopropylsilan		
	C ₉ H ₂₂ Si	158,36	Fluka
Triton® X-100	4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)-phenylpolyethylenglycol		
	t-Oct-C ₆ H ₄ -(OCH ₂ CH ₂) _x -OH x=9-10	-	Sigma

12 Literatur

- [1, Merbach] André E. Merbach, Eva Tóth; The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging; 2001; Wiley & Sons
- [2, Krause] Werner Krause; Contrast Agents 1 - Magnetic Resonance Imaging; Topics in Current Chemistry; 2002; Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- [3, Skoog] Douglas A. Skoog, J. J. Leary; Instrumentelle Analytik: Grundlagen - Geräte - Anwendungen; 1996; Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- [4, Anderson] Carolyn J. Anderson, Michael J. Welch; Radiometal-Labeled Agents (Non-Technetium) for Diagnostic Imaging; Chemical Reviews; 1999 (99), 2219-2234
- [5, Behr] T. M. Behr, M. Gotthardt, A. Bart, M. Béhé; Imaging Tumors with peptide-based radioligands; The Quarterly Journal of Nuclear Medicine; Vol. 45; 2001 (2); 189-200
- [6, White] P. White, B. Dörner, R. Steinauer; Synthesis Notes; 2004/5; Novabiochem
- [7, Kaiser] E. Kaiser; R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook; Color Test for Detection of free Terminal Amino Groups in the Solid-Phase Synthesis of Peptides; Analytical Biochemistry; 1970 (34), 595-598
- [8, Brückner] Reinhard Brückner; Reaktionsmechanismen - Organische Reaktionen, Stereochemie, moderne Synthesemethoden; 1996; Spektrum Akademischer Verlag Berlin Heidelberg Oxford
- [9, Bio-Rad] Bio-Rad Protein Assay Rev. C; Instruction Manual; Bio-Rad Laboratories, Bulletin-Nr.: Lit33

-
- [10, Xiang] Yi Xiang, J. Wang, Shahid M. Hussain, Gabriel P. Krestin; Superparamagnetic ironoxide contrast agents: physiochemical characteristics and applications in MR imaging; *European Radiology*; 2001 (11); 2319-2331
- [11, Taupitz] M. Taupitz, S. Schmitz, B. Hamm; Superparamagnetische Eisenoxidpartikel: Aktueller Stand und Entwicklungen; *RöFo - Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der Bildgebenden Verfahren*; Vol. 175; 2003 (06); 752-765
- [12, Römpp] Römpp Lexikon Chemie - Version 2.0; 1999 Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York
- [13, Kim] Sunggak Kim, Kyn Yang Yi; Di-2-Pyridyl-Thiocarbonate, A new Reagent for the Preparation of Isothiocyanates and Carbodiimides; *Tetrahedron Letters*; Vol. 26; 1985 (13); 1661-1664
- [14, Kunath] Klaus Kunath, Anke von Harpe, Dagmar Fischer, Holger Petersen, Ulrich Bickel Karlheinz Voigt, Thomas Kissel; Low-molecular-weight polyethylenimine as non-viral vector for DNA delivery: comparison of physiochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine; *Journal of Controlled Release*; Vol. 89; 2003 (1); 113-125
- [15, Ledley] Fred D. Ledley; *Pharmaceutical Approach to Somatic Gene Therapy*; *Pharmaceutical Research*; Vol. 13; 1996 (11); 1595-1614
- [16, De Smedt] Stefaan C. De Smedt, Joseph Demeester, Wim E. Hennink; Cationic Polymer Based Gene Delivery Systems; *Pharmaceutical Research*; Vol. 17; 2000 (2); 113-126
- [17, Petersen] Holger Petersen Thomas Merdan, Klaus Kunath, Dagmar Fischer, Thomas Kissel; Poly(ethylenimine-co-L-lactamide-co-succinamide): A Biodegradable Polyethylenimine Derivative with an Advantageous pH-Dependent Hydrolytic Degradation for Gene Delivery; *Bioconjugate Chemistry*; Vol. 13; 2002 (4); 812-821

-
- [18, Godbey] W. T. Godbey, Kenneth K. Wu, A. G. Mikos; Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery; *Journal of Controlled Release*; Vol. 60; 1999 (1-2); 149-160
- [19, Maecke] Helmut R. Maecke, Andreas Riesen, Walter Ritter; The Molecular Structure of Indium-DTPA; *Journal of Nuclear Medicine*; Vol. 30; 1989; 1235-
- [20, Massoud] Tarik F. Massoud, Sanjiv S. Gambir; Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light; *Genes & Development*; Vol. 17; 2003 (5); 545-580

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Hartmut Jungclas herzlich für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Kernchemie durchführen zu können, für die freundliche Betreuung und für die gewährten Freiheiten bei der Durchführung der Arbeiten.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Ensinger danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Mein besonderer Dank gilt Herr Dr. Martin Béhé für den interessanten Themenvorschlag, die gute Zusammenarbeit und vor allem für die Möglichkeit einen großen Teil der Arbeit im Laboratorium der Klinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Gießen und Marburg durchführen zu können.

Dank schulde ich weiterhin Frau Birgit Herbst und Frau Ursula Cramer für ihre Unterstützung bei den im Laboratorium der Nuklearmedizin angefallenen Arbeiten, insbesondere für ihre Hilfe bei der Durchführung der Zellversuche.

Frau Elke Vaupel danke ich für ihre unschätzbare Kreativität bei organisatorischen und finanziellen Dingen, die meine Zeit in der Kernchemie sehr erleichtert hat.

Herrn Andreas Brand, Herrn Steffen Happel, Frau Barbara Herrmann, Frau Maria Nau, Herrn Daniel Severin, Herrn Roman Streng, Herrn Martin Stumpf, Frau Elke Vaupel und Herrn Alexander Zulauf gilt mein Dank für unzählige fruchtbare Diskussionen, sowohl fachlicher als auch privater Natur und die angenehme Arbeitsatmosphäre, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Meiner Mutter und Horst danke ich für ihre Unterstützung, die es mir ermöglicht hat das Studium zu durchlaufen.