

**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 Syntheseplanung 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 Partikelaufbau 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 Gastrinisothiocyanats	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.

