

# Funktionalisierung von Partikeln bzw. Markierung von MRT-Partikeln mit Positron-emittierenden Nukliden zur molekularen Visualisierung in vivo mittels PET

M Laurent<sup>1</sup>, C Burtea<sup>1</sup>, R Muller<sup>1</sup>, F Rösch<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Département de Chimie Organique et Biomédicale, Laboratoire de R.M.N. et d'Imagerie Moléculaire, Faculté de Médecine-Faculté des Sciences, Université de Mons-Hainaut, Belgien;

<sup>2</sup>Institut für Kernchemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany

In diesem Projekt sollten sehr kleine Dextran-umhüllte Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Kristalle (USPIOs) dahingehend modifiziert werden, dass diese für die MR-Diagnostik relevanten Verbindungen eine biologische Affinität zu bestimmten Tumortypen erhalten. Damit sollte ein molekulares Targeting ermöglicht werden, was u.U. als diagnostische Methode klinisch relevant sein könnte. Dazu wurde aus dem Institut für Kernchemie ein Octapeptid (Octreotid) ausgewählt, welches eine hohe Bindungsaffinität zu humanen Somatostatin-Rezeptoren aufweist. Solche Rezeptoren sind auf neuroendokrinen Tumoren überexprimiert und bilden in der Radiopharmazie bzw. Nuklearmedizin bereits ein bewährtes System Targetingvektor / biologisches Target.

Dieses Lys<sup>3</sup>-boc-geschützte Octreotid sollte über geeignete präparativ-organische Synthesen an USPIOs gekoppelt werden. Hier fanden Experimente in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Robert Muller, Département de Chimie Organique et Biomédicale, Laboratoire de R.M.N. et d'Imagerie Moléculaire, Faculté de Médecine-Faculté des Sciences, Université de Mons-Hainaut, Belgien, statt. Diese Gruppe stellte die Dextran-umhüllten Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Kristalle zur Verfügung.

Anschließend sollte in ersten Evaluierungen getestet werden, ob diese Octreotid-„grafted“ USPIO-Konjugate in Zellen aufgenommen werden bzw. noch eine hohe Affinität zum Tumorrezeptor aufweisen. Dazu wurde der belgischen Gruppe die entsprechende Zelllinie AR4-2J aus Mainz bereitgestellt. Die Tests wurden nach 2 Methoden durchgeführt: Inkubation der Konjugate USPIO-g-Oct mit Zellen im Kulturmedium bzw. C-MALISA-Test nach [1].

**Synthesen:** Das Lys<sup>3</sup>-boc-geschützte Octreotid wurde kovalent in einer 2-Stufen-Reaktion eingeführt: Epichlorhydrin wurde an die Hydroxy-Gruppen der Dextran-Hülle der Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Kristalle gekoppelt, um ein terminales Halogenderivat zu erzeugen, welches als Bindungsstelle für das Peptid wirkt [2]. Danach wurde die Lys<sup>3</sup>-boc-Gruppe der nicht-terminalen NH<sub>2</sub>-Gruppe des Octreotids mittels THF entschützt. Der pH wurde auf 7 mittels NaOH eingestellt und die Suspension dialysiert.

**Analytik:** Zur Charakterisierung der Partikel wurden *Photon Correlation Spectroscopy* (PCS) und *relaxivity profiles* bei verschiedenen Feldstärken aufgenommen. Die PCS-Messungen ergaben einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser der USPIOs von 30 nm.

**Validierungen:** Bei den Tests in Kulturmedium wurde das spezifische Kontrastmittel USPIO-g-Oct in geringeren Konzentrationen aufgenommen als das nicht-konjugierte USPIO (Abb. 1). Eine Erklärung könnte sein, dass im Gegensatz zur intrazellulären Inkorporation der USPIOs das USPIO-g-Oct eher/nur am transmembranständigen Rezeptor extrazellulär gebunden bleibt. Weitere Hypothesen sind

eine eventuelle Zerstörung der Rezeptoren durch Trypsin (verwendet zum Ablösen der Zellen) oder ein Verlust der Bindungsaffinität des am USPIO konjugierten Octreotids. Die Ergebnisse der C-MALISA-Tests belegten insofern die erste Hypothese, da eine höhere Bindungskapazität für das USPIO-g-Oct als für die Referenz-USPIOs nachgewiesen werden konnte (Abb. 2). Allerdings konnte diese Bindung erst bei langen Echozeiten im MRI (530 ms) erhalten werden, was wiederum auf eine geringe Konzentration des funktionalisierten Kontrastmittels hinweist.

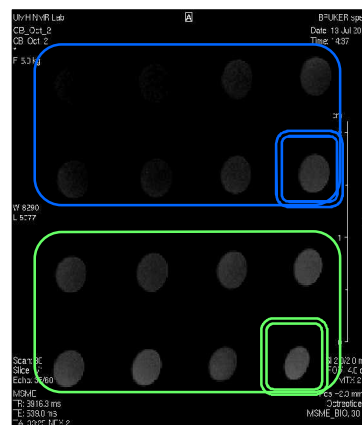


Abb. 1: MR-Messungen (TR/TE = 3000/530 ms) der Tumorzellen inkubiert mit USPIO-g-Oct (blau) bzw. USPIO (grün) in verschiedenen Konzentrationen (4-0.25 µmol Fe/mL). Proben im Doppelrahmen sind Referenzproben.

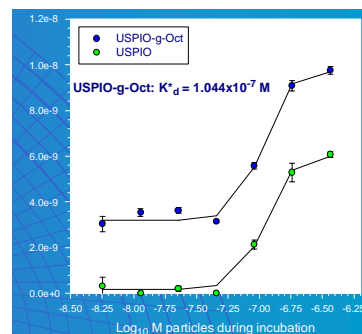


Abb. 2: Aufnahmen von USPIO-g-Oct bzw. USPIO in verschiedenen Konzentrationen in AR4-2J-Tumorzellen (C-MALISA-Tests)

**Ausblick:** Die biologische Funktionalisierung von Dextran-USPIOs mit tumoraffinen Peptiden ist chemisch möglich. Diese Verbindungen stehen am Beispiel des Systems USPIO-g-Oct für weitere Studien zur Verfügung. Hier bliebe zu untersuchen, inwieweit die durch das zugrunde liegende molekulare targeting zu erwartende geringere Konzentration der modifizierten USPIOs am Tumor noch für MRT-Messungen relevant ist.

1. Burtea C, Laurent S, Roch A, Vander Elst L, Muller RN, C-MALISA (Cellular Magnetic-Linked Immunosorbent Assay), a new application of cellular ELISA for MRI, *J. Inorg. Chem.*, 99(5), 1135-1144 (2005).
2. L Josephson, C-H Tung, A Moore, R Weissleder, High efficiency intracellular magnetic labelling with novel superparamagnetic-tat peptide conjugates, *Bioconjugate Chem.*, 10, 186-191 (1999)