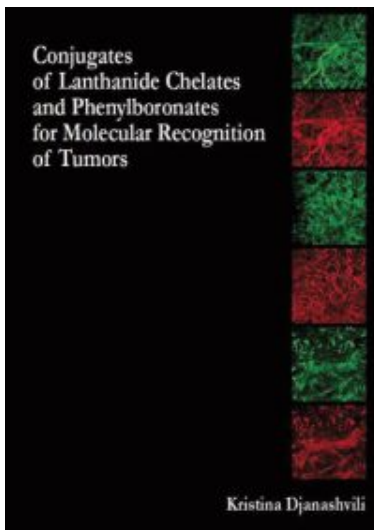




Kristina Djanashvili

DFT	density function theory
DOTA	dodecanetetra-acetic acid
DTPA-EN	diethylene triamine pentaacetic acid-enhanced
Eu	euporium
Gd	gadolinium
ICP	inductive coupled plasma
Ln	lanthanide
MRI	magnetic resonance imaging
Neu5Ac	N-Acetylneuraminic acid, siaalzuur
NMR	nuclear magnetic resonance
PBA	phenyl boric acid, fenylboorzuur
SAP	square antiprism
Sm	samarium
Tb	terbium
TTP	tricapped trigonal prism

Conjugates of lanthanide chelates and phenylboronates for molecular recognition of tumors



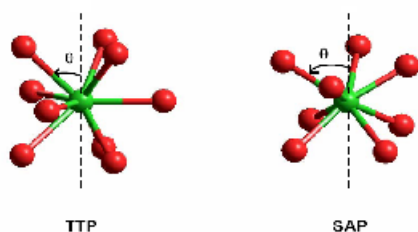
Moleculaire imaging is een zeer belangrijk onderdeel van de moderne geneeskunde geworden. De recente technologische vooruitgang maakt het mogelijk moleculaire gebeurtenissen *in vivo* zichtbaar te maken op een manier die tot nu toe ondenkbaar was. Dit proefschrift beschrijft een multidisciplinaire zoektocht naar geoptimaliseerde contrastmedia voor medische imaging.

Elk van de nu beschikbare beeldvormende technieken heeft haar eigen sterke en zwakke punten met betrekking tot ruimtelijke resolutie en detectiegrens. De complementaire informatie die verkregen kan worden met de verschillende beeldvormende modaliteiten is uitermate waardevol gebleken. Het bevordert onderzoek naar nieuwe gecombineerde technieken en, als gevolg daarvan, de ontwikkeling van nieuwe reporter probes. Het belang van chemie in de medische wetenschap is sterk groeiende dankzij de vraag naar specifieke doelzoekende reagentia voor biologische targets. Hoofdstuk 1 geeft een beknopt overzicht van de beschikbare

beeldvormende technieken en evalueert de vooruitzichten in de ontwikkeling van contrastmedia.

Ln(III)-complexen van polyaminocarboxylaten worden op grote schaal als MRI-contraststof toegepast. De paramagnetische eigenschappen van het metaalion daarin zijn verantwoordelijk voor de versnelling van de ^1H -relaxatiesnelheid, terwijl het chelaat voor een stabiele binding van het metaalion zorgt. Het aantal watermoleculen dat rechtstreeks gecoördineerd is aan het Ln(III)- ion is uitermate belangrijk voor het relaxatieversnellend vermogen (de relaxivity), en zodoende voor de werkzaamheid van deze contrastreagentia. Hoofdstuk 2 beschrijft praktische methoden om deze parameter te bepalen door het meten van Ln(III)-geïnduceerde chemische verschuivingen van de ^{17}O -NMR-resonantie van het water.

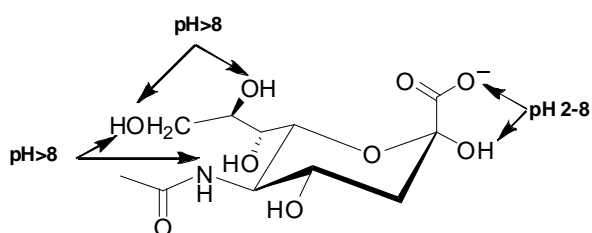
Een van de toepassingen van deze methode wordt behandeld in hoofdstuk 3. De ^{17}O -NMR-chemische verschuivingen van waterige oplossingen van lanthanidetriflaten werden gemeten en geanalyseerd. In deze systemen is het triflaatanion niet in staat de eerste coördinatiesfeer binnen te gaan. De contactbijdrage aan de chemische verschuiving vertoont een breuk bij Eu(III) als gevolg van de vermindering van het aantal watermoleculen in de eerste coördinatiesfeer van het Ln(III)-ion van 9 voor Ln-Sm naar 8 voor de zwaardere lanthaniden. Deze verlaging van het hydratatiegetal gaat gepaard met veranderingen in de parameters die de pseudocontactbijdrage aan de chemische verschuivingen bepalen. Fitten van de data met 'tricapped trigonal prism' (TTP) en antiprismatische conformaties (SAP) (Figuur 1), verkregen met DFT (density function theory)-berekeningen, toont aan dat de kristalveldparameters voor deze conformaties een order van grootte verschillen. De hyperfijne koppelingsconstante voor beide conformaties werd bepaald op $A/h = -4.2 \times 10^6 \text{ rad s}^{-1}$.



Figuur 1. De coördinatiepolyhedra van de Ln(III) aquo-ionen.

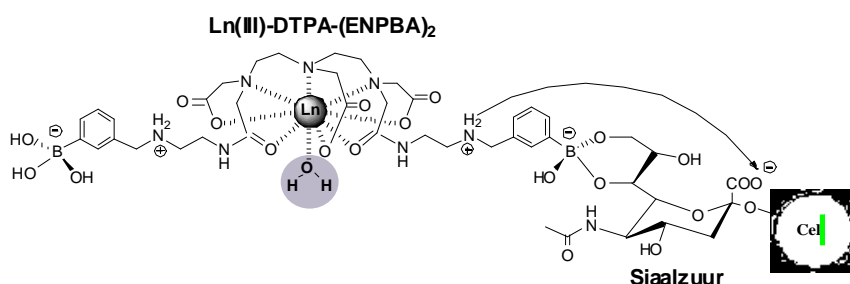
Hoofdstuk 4 beschrijft de bepaling van wateruitwisselingssnelheden in Gd(III)-complexen van pyridinehoudende liganden met behulp van ^{17}O -NMR: L^1 (= N,N' -Bis[(6-carboxy-2-pyridyl)methyl]ethaan-1,2-diamine- N,N' -diazijnzuur) en zijn fosfonaatvariant met ethaan-1,2-diamine-, L^2 (= N,N' -Bis[(6-carboxy-2-pyridyl)methyl]ethaan-1,2-diamine- N,N' -methylenefosfonzuur) of cyclohexaan-1,2-diamine basisskelet L^3 (= N,N' -Bis[(6-carboxy-2-pyridyl)methyl]cyclohexaan-(1*R*,2*R*)-diamine- N,N' -methylenefosfonzuur). De uitwisselingssnelheid van $\text{GdL}^1(\text{H}_2\text{O})_q$ (k_{ex}^{298}) was $5.0 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, wat enigszins sneller is dan die van $[\text{Gd}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^{-1}$ (DOTA=1,4,7,10-tetraazacyclododecaan-1,4,7,10-tetraacetaat). Modificatie van L^1 door vervanging van de carboxylgroepen door de grotere fosfonaatgroepen leidt tot aanzienlijke verhoging van de wateruitwisselingssnelheid van $\text{GdL}^2(\text{H}_2\text{O})_q$ tot $k_{ex}^{298} = (7.0 \pm 0.8) \times 10^8 \text{ s}^{-1}$, een waarde die vergelijkbaar is met die voor het Gd(III)-aquo-ion. Deze snelle uitwisselingssnelheid kan verklaard worden door de zeer flexibele eerste coördinatiesfeer. Het aantal watermoleculen dat rechtstreeks aan het lanthanide-ion gecoördineerd is (q) bleek te variëren tussen 0,5 en 0,8. Dit kan verklaard worden door een evenwicht tussen complexen met $q = 0$ en 1. Verdere veranderingen in de structuur van de amine-backbone, door introductie van een cyclohexylgroep, zoals in het geval van $\text{GdL}^3(\text{H}_2\text{O})_q$, leidde tot een afname van de wateruitwisselingssnelheid met een factor 5 ten gevolge van de verminderde flexibiliteit ($k_{ex}^{298} = (1.5 \pm 0.8) \times 10^8 \text{ s}^{-1}$).

Hoofdstuk 5 beschrijft een NMR-studie van de interactie tussen fenylboorzuur (PBA) en siaalzuur (Neu5Ac). Resultaten van dit onderzoek suggereren dat PBA siaalzuur op twee verschillende manieren kan binden, namelijk via de α -hydroxycarboxylaatfunctie en via de glycerolrijketen. Deze interacties blijken pH -afhankelijk te zijn. ^{17}O -NMR-experimenten met glycolzuur, als modelverbinding, laten zien dat een interactie met α -hydroxycarboxylaat plaatsvindt bij $pH < 9$, terwijl onderzoek aan threon- en erythronzuur aantoont dat de fenylboronaatgroep bij een hogere pH naar de vicinale diolfuncties verschuift. Analooq vindt de binding aan PBA van Neu5Ac via de α -hydroxycarboxylaatfunctie plaats bij $pH < 9$ en via glycerolrijketen bij een hogere pH (Figuur 2). De conditionele stabiliteitsconstante van de fenylboronaatester bij $pH 7,4$ is 11,4. Siaalzuur is gebonden aan de naburige suiker op het celoppervlak via zijn 2-hydroxygroep. Om de *in vivo*-situatie na te bootsen en de diolinteractie te stimuleren, werd Neu5Ac omgezet naar zijn 2- α -O-methyl derivaat. De erythroconfiguratie van de hydroxylsubstituenten is niet gunstig voor de vorming van een stabiel complex op posities C7 en C8, en als gevolg daarvan is er een sterkere interactie op posities C8 en C9 onder de vorming van een 2-boor-1-3-dioxalaatvijfing en een geringe hoeveelheid C7-C9-zesring.



Figuur 2. Schematische weergave van de mogelijke bindingposities tussen PBA en siaalzuur.

Hoofdstuk 6 beschrijft een *in vitro*-studie aan de moleculaire herkenning van siaalzuur op het oppervlak van menselijke gliomacellen door $^{160}\text{Tb(III)}$ -DTPA-EN, $^{160}\text{Tb(III)}$ -DTPA-(ENPBA) $_2$ en $^{160}\text{Tb(III)}$ -DTPA-(PBA) $_2$ -complexen. De overexpressie van siaalzuur in het membraan van tumorcellen in vergelijking tot gezonde cellen maakt deze suiker een aantrekkelijke biomarker voor moleculaire diagnose en therapie. De experimentele data wijzen erop dat Tb(III)-DTPA-(ENPBA) $_2$ de meest efficiënte doelzoekende verbinding is dankzij een elektrostatistische interactie tussen haar twee positief geladen ammoniumgroepen en het negatief geladen celoppervlak (Figuur 3). Dit verschaft een additionele stabilisatie van de covalente binding tussen PBA en diolgroepen van het siaalzuurmolecuul.

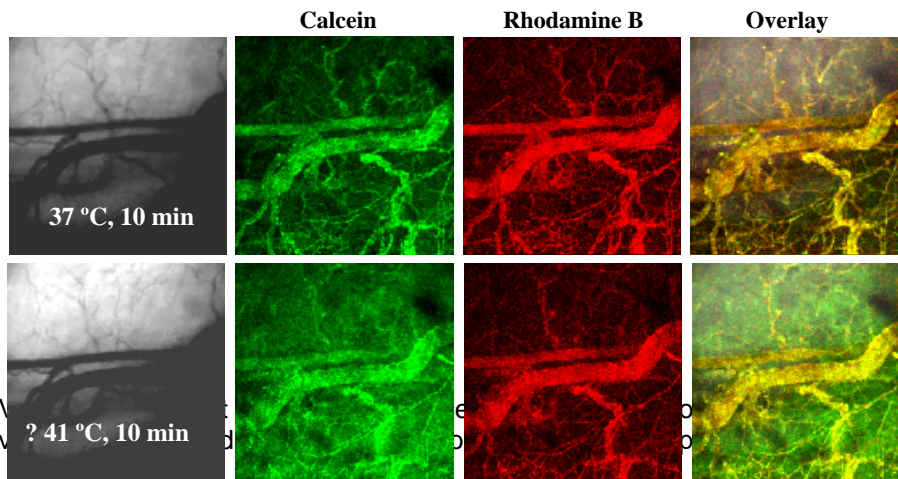


Figuur 3. Interactie van Ln(III)-DTPA-(ENPBA) $_2$ met siaalzuur aan het celoppervlak via de PBA-Sia-esterformatie.

Er werd tot maximaal 5,5 nmol Tb/mg proteïne door de cellen opgenomen. ICP-analyse na afloop van incubatie met niet-radioactief Tb(III)-DTPA-(ENPBA) $_2$ duidt op de dissociatie van Tb uit het complex nadat dit geadsorbeerd is aan het celoppervlak. Het is zeer waarschijnlijk dat het grootste deel van het vrije Tb aan het oppervlak geadsorbeerd blijft, hoewel het niet uitgesloten kan worden dat een kleine hoeveelheid Tb door de cellen geïnternaliseerd wordt.

In hoofdstuk 7 wordt het concept van herkenning van sialaanzuur verder ontwikkeld. Thermogevoelige liposomen worden toegepast als dragers voor Ln(III)-DOTA-ENPBA doelzoekende reagentia. De stabiliteitsaspecten van het DTPA-chelaat die in de voorafgaande studie naar voren kwamen worden aangepakt door het in de molecuul te vervangen door een

DOTA-analoog. De laatste staat bekend als een thermodynamisch en kinetisch stabiel chelaat. De lipidsamenstelling van de gebruikte liposomen werd zodanig bijgesteld dat een faseovergang tussen 41 en 42 °C bereikt werd. Deze temperatuur is geschikt voor milde hyperthermia. Intravitale fluorescentiemicroscopie werd toegepast om het thermische gedrag van de ontwikkelde liposomen *in vivo* te testen. Daartoe werden liposomen die calceïn/rhodamine als markers bevatten geïnjecteerd in een muis met een BLM-melanomatumor geïmplantieerd onder de rughuid. Door middel van een dubbele-golflengtedetector werd de accumulatie van de liposomen in het tumorweefsel en het vrijkomen van de inhoud na het verhogen van de temperatuur gevolgd (Figuur 4). De efficiëntie van de ontwikkelde liposomen werd aangetoond in een eerste serie experimenten. In een vervolgstudie zullen de Ln(III)-DOTA-ENPBA geladen liposomen gebruikt worden om de tumorherkenning te realiseren.



Figuur 4. V... thermogev... ? 41 °C, 10 min

Delft, 13 januari 2009

Dr. K. Djanashvili

Promotor:
Prof.dr. I.W.C.E. Arends
afdeling Biotechnologie TU Delft

Copromotor:
Dr. J.A. Peters
afdeling Biotechnologie TU Delft

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.