

# Zielspezifische LipoCEST-Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie: die Ausrichtung asphärischer Liposomen auf einer Kapillaroberfläche\*\*

Dirk Burdinski,\* Jeroen A. Pikkemaat, Mustafa Emrullahoglu, Francesca Costantini, Willem Verboom, Sander Langereis, Holger Grüll und Jurriaan Huskens

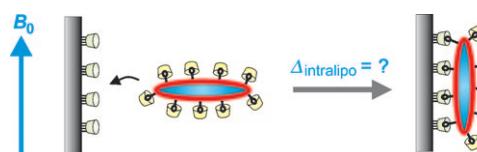
Die molekulare Bildgebung wird, durch die frühe Diagnose von Krankheiten auf zellulärem oder molekularem Niveau, das Gesundheitswesen vermutlich stark beeinflussen. Unter den relevanten klinischen Bildgebungsverfahren zeichnet sich die Magnetresonanztomographie (MRT) vor allem dadurch aus, dass anatomische sowie kontrastverbesserte Bilder mit sehr hoher räumlicher Auflösung ohne den Einsatz von ionisierender Strahlung aufgenommen werden können. Allerdings erschwert die geringe Empfindlichkeit der MRT ihren Einsatz zur Lokalisierung niedrig konzentrierter molekularer Epitope auf der Oberfläche kranker Zellen. Diese Empfindlichkeitslücke kann aber möglicherweise mittels neuer Nanoträger überbrückt werden, die eine deutliche Kontrastverstärkung bewirken.<sup>[1]</sup>

In diesem Zusammenhang sind die liposomalen Kontrastmittel (KMs) mit Nachweisgrenzen im Pikomolbereich besonders vielversprechend, deren Wirkmechanismus auf dem chemischen Austausch ihrer magnetischen Sättigung beruht („liposomal chemical exchange saturation transfer“ (LipoCEST)).<sup>[2]</sup> Die Detektion von LipoCEST-KMs basiert auf der selektiven Sättigung des MR-Signals des intraliposomal Wassers mit einem selektiven Radiofrequenzpuls. Der Wasseraustausch durch die Liposomenmembran verursacht dann eine teilweise Sättigung des MR-Signals auch des

umgebenden Wassers, was letztlich zu einer negativen Kontrastverstärkung im MRT-Bild führt.

Die selektive Adressierbarkeit der LipoCEST-KMs mit einem Radiofrequenzsättigungspuls wird erreicht, indem diese mit einem Shiftreagens versehen werden. Hierdurch wird im wässrigen Innern ein Volumen liposomalen Wassers definiert, das eine andere chemische Verschiebung aufweist als das umgebende extraliposomale Wasser. Für In-vivo-Anwendungen ist es nun entscheidend, große, gut definierte intraliposomale chemische Verschiebungen ( $\Delta_{\text{intralipo}}$ ) zu erzielen, da größere Verschiebungen zu einem besseren Kontrast führen, die Interferenz mit natürlichen Magnetisierungstransfereffekten verringern und die Möglichkeit des frequenzbasierten Multiplexing eröffnen.<sup>[3]</sup>

Sehr große  $\Delta_{\text{intralipo}}$ -Werte können durch die asphärische Deformierung in Folge einer osmotischen Volumenverkleinerung sowie den zusätzlichen Einbau amphiphiler, paramagnetischer Lanthanoidkomplexe in die Phospholipidmembran erzielt werden.<sup>[4]</sup> In diesem Fall wird die Richtung der chemischen Verschiebung durch die Ausrichtung der asphärischen Liposomen im externen Magnetfeld beherrscht, die wiederum durch das Vorzeichen der magnetischen Anisotropie ( $\Delta\chi$ ) des in der Membran gebundenen amphiphilen Lanthanoidkomplexes bestimmt wird (Schema 1).<sup>[3a,5]</sup>



**Schema 1.** Umorientierung asphärischer (z. B. abgeflachter) Liposomen relativ zum externen Magnetfeld  $B_0$  nach Bindung an eine Zieloberfläche.

Der Einsatz von LipoCEST-KMs als zielspezifische Sonden für molekulare MRT-Anwendungen setzt deren Bindung und Demobilisierung am Zielort, z. B. der Oberfläche einer biologischen Struktur oder einer Zelle, voraus. Zur Maximierung der anziehenden Wechselwirkungen sollten sich solche asphärischen Liposomen entlang der Oberfläche der Zielstruktur ausrichten. Diese erzwungene Ausrichtung kann jedoch von der durch die magnetische Wechselwirkung begünstigten Ausrichtung abweichen, die durch  $\Delta\chi$  bestimmt wird (Schema 1). Als Folge kann sich  $\Delta_{\text{intralipo}}$  des gebundenen KM von dem des ungebundenen unterscheiden. Es ist daher notwendig, das Wechselspiel zwischen der bevorzugten ma-

[\*] Dr. D. Burdinski, Dr. S. Langereis, Prof. H. Grüll  
Department of Biomolecular Engineering, Philips Research Europe  
High Tech Campus 11, 5656 AE Eindhoven (Niederlande)  
Fax: (+31) 40-27-44906  
E-Mail: dirk.burdinski@philips.com  
Homepage: <http://www.research.philips.com>  
Prof. H. Grüll  
Department of Biomolecular Engineering  
Eindhoven University of Technology (Niederlande)  
Dr. J. A. Pikkemaat  
Department of Materials Analysis  
Philips Research Europe (Niederlande)  
M. Emrullahoglu, Dr. F. Costantini, Dr. W. Verboom, Prof. J. Huskens  
Molecular Nanofabrication Group, University of Twente  
Enschede (Niederlande)

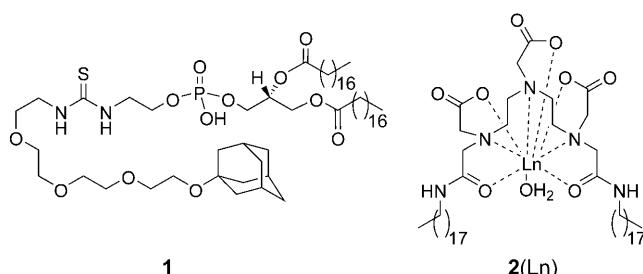
[\*\*] Diese Arbeit wurde durch die niederländische Regierung (Projekt: BSIK 03033 „Molecular Imaging of Ischemic Heart Disease“) gefördert. Wir danken H. Keizer, H. Janssen (SyMO-Chem, Niederlande) und B. Schmitt (Philips Research) für die Unterstützung bei der Synthese und Marcel Verheijen (Philips Research) für die Cryo-TEM-Analysen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200905731> zu finden.

gnetischen und der erzwungenen mechanischen Ausrichtung solcher asphärischen Liposomen zu verstehen. Wir berichten hier über die Änderung der Orientierung asphärischer Liposomen bei multivalenter Bindung an eine Zieloberfläche, wobei zur Analyse nur Standard-CEST-MR-Methoden verwendet wurden.

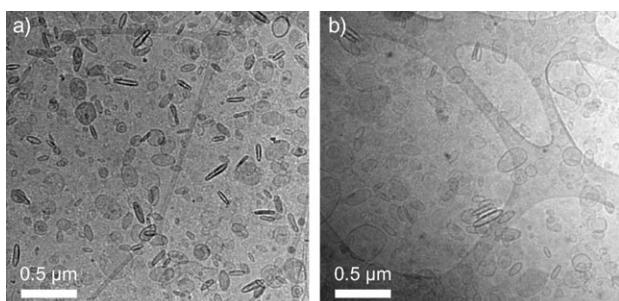
Um die Bindung asphärischer Liposomen an die Oberfläche einer Glaskapillare zu erreichen, wurde das gut untersuchte  $\beta$ -Cyclodextrin-Adamantan(CD-Ad)-Modellsystem für multivalente Wechselwirkungen eingesetzt.<sup>[6]</sup> Die Innenwand der Glaskapillare mit einem Innendurchmesser von 100  $\mu\text{m}$  wurde mit einer Monoschicht eines CD-Heparin-Derivats beschichtet. Solche mit CD funktionalisierten Oberflächen sind bekannt dafür, spezifische hydrophobe Wechselwirkungen mit einer großen Zahl der apolaren Ad-Gruppen einzugehen, woraus eine starke multivalente Bindung resultiert.<sup>[6]</sup>

LipoCEST-KMs aus den Phospholipiden Distearoyl-(DSPC, 40 %) und Oleoylpalmitoylphosphatidylcholin (POPC, 20 %) sowie einem mit Ad funktionalisierten DSPE-Derivat (**1**, 20 %; DSPE = Distearoylphosphatidylethanol-

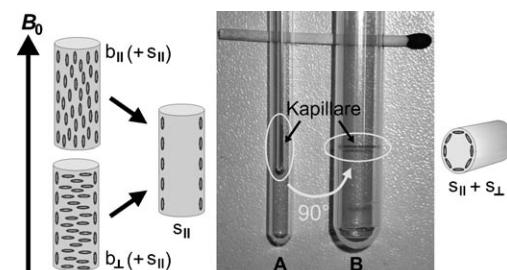


amin) wurden synthetisiert. Die Lipiddoppelschicht enthielt zudem einen amphiphilen Lanthanoidkomplex **2(Ln)** (20 %) mit  $\text{Ln} = \text{Dy}$  ( $\Delta\chi < 0$ ) oder  $\text{Tm}$  ( $\Delta\chi > 0$ ). Aufgrund der unterschiedlichen Vorzeichen der magnetischen Anisotropie wurde erwartet, dass die asphärischen Liposomen mit **2(Dy)** orthogonal zu denen mit **2(Tm)** ausgerichtet sein würden.<sup>[4]</sup> Die intraliposomale Wasserphase enthielt zudem **3(Ln)** ( $[\text{Ln}(\text{hpdo}3\text{a})(\text{H}_2\text{O})]$ ,  $\text{Ln} = \text{Dy}$  oder  $\text{Tm}$ ,  $c = 65 \text{ mM}$ ) als Shiftreagens.<sup>[7]</sup> Die Liposomen mit einer Größe von 200 nm wurden durch Dialyse gegen einen HEPES/CD/NaCl-Puffer (300 mosmol, pH 7.4) asphärisch deformiert, wobei sich, wie Cryo-TEM-Studien zeigten (Abbildung 1), überwiegend abgeflachte (linsenförmige) Sphäroide bildeten.

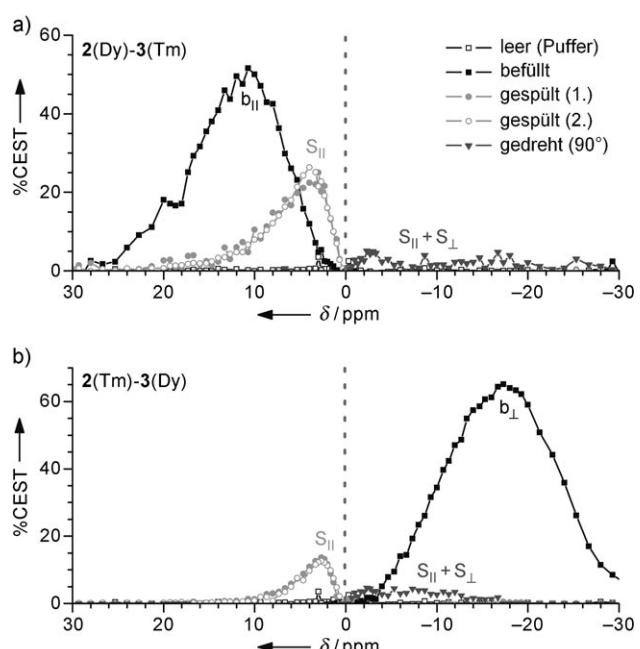
Eine mit CD funktionalisierte Kapillare wurde mit einer Lösung abgeflachter **2(Dy)-3(Tm)**-Liposomen gefüllt (Hintergrundinformationen, Abbildung S1), coaxial in einem gewöhnlichen NMR-Röhrchen befestigt und schließlich parallel zum  $B_0$ -Feld eines 7-T-NMR-Spektrometers ausgerichtet (A in Abbildung 2). Die Signalintensität des umgebenden Wassers wurde als Funktion der Vorsättigungsfrequenz gemessen (Z-Spektrum). Aus diesen Daten wurde das Ausmaß der Sättigungsübertragung (% CEST) berechnet (Hintergrundinformationen, Gleichung S1) und als Funktion der entsprechenden chemischen Verschiebung aufgetragen (Abbildung 3a, schwarze Quadrate). Das Auftreten eines CEST-Signals im Bereich positiver chemischer Verschiebungen



**Abbildung 1.** Cryo-TEM-Aufnahmen asphärisch deformierter LipoCEST-KMs, die überwiegend abgeflachte (linsenförmige) Sphäroide zeigen: a) **2(Dy)-3(Tm)**, b) **2(Tm)-3(Dy)**.



**Abbildung 2.** Parallele ( $\parallel$ ) und senkrechte ( $\perp$ ) Ausrichtung abgeflachter LipoCEST-KMs relativ zum  $B_0$ -Feld in Lösung (b) und an der Kapillarwand (s). Die ungebundenen Liposomen wurden durch Spülen mit Pufferlösung entfernt. Foto: Kapillaren in NMR-Röhrchen mit festgelegter Orientierung  $\parallel$  (A) oder  $\perp$  (B) zu  $B_0$ .



**Abbildung 3.** CEST-MR-Spektren von Kapillaren, die mit einer von zwei Liposomenformulierungen beladen wurden: **2(Dy)-3(Tm)** (a) oder **2(Tm)-3(Dy)** (b). Die Kapillaren (zunächst parallel zu  $B_0$  ausgerichtet) wurden gefüllt, mit Pufferlösung gespült und schließlich auch um 90° gedreht.

(+11 ppm) ist in Einklang mit entsprechenden Literaturdaten für vergleichbare **2**(Dy)-haltige LipoCEST-Reagenten ( $\Delta\chi < 0$ ).<sup>[4]</sup> Durch den Vergleich mit entsprechenden **2**(Gd)-haltigen Liposomen ( $\Delta\chi = 0$ ), die eine ungestörte parallele Ausrichtung im externen Feld aufweisen, war für diese Reagenten bereits früher eine parallele Ausrichtung von langer Partikelachse und  $B_0$  ( $b_{\parallel}$ ) abgeleitet worden.

Um die Orientierung der an die Oberfläche gebundenen Liposomen ermitteln zu können, wurde die Kapillare zur Entfernung aller ungebundenen Liposomen zunächst mit Pufferlösung gespült. In der gespülten Kapillare wurde bei  $\delta > 0$  noch stets ein CEST-Effekt von mehr als 20 % gemessen (Abbildung 3a, hellgraue Punkte), der selbst nach weiterem, ausgiebigem Spülen unverändert blieb (hellgraue Kreise). Diesen CEST-Effekt führten wir auf die Anwesenheit von an die Oberfläche gebundenen Liposomen zurück. Da wir annahmen, dass diese zur Maximierung der Zahl attraktiver Ad-CD-Wechselwirkungen parallel zur Kapillarwand ausgerichtet waren<sup>[6]</sup> und die Kapillarwand selbst parallel zu  $B_0$  orientiert war, konnte auch für die an die Oberfläche gebundenen Liposomen eine Orientierung parallel zu  $B_0$  angenommen werden ( $s_{\parallel}$ ). Die positive chemische Verschiebung des in beiden Experimenten beobachteten CEST-Effekts deutete daher darauf hin, dass die Liposomen sowohl an der Oberfläche als auch frei in Lösung parallel zu  $B_0$  ausgerichtet waren.

Wir stellten diese Hypothese auf den Prüfstand, indem wir die Kapillare um 90° drehten ( $B$  in Abbildung 2), wodurch die Hälfte ihrer Oberfläche vorwiegend senkrecht zu  $B_0$  ausgerichtet wurde ( $s_{\parallel} + s_{\perp}$ ). Daraufhin verschwand der im Bereich positiver chemischer Verschiebungen beobachtete CEST-Effekt, und ein kleiner resultierender CEST-Effekt konnte im Gebiet  $\delta < 0$ , ausgedehnt über einen breiten Verschiebungsbereich, beobachtet werden (Abbildung 3, dunkelgraue Dreiecke). Dies wird verständlich, wenn man sich den kreisförmigen Querschnitt der Kapillare vor Augen führt, als Folge dessen Teile der Kapillarwand alle erdenklichen Orientierungen zwischen 0 und 90° relativ zu  $B_0$  einnahmen (Abbildung 2), wodurch sich der Großteil des CEST-Effekts nach Gleichung S1 (Hintergrundinformationen) aufhob.

Im nächsten Schritt wurden Liposomen präpariert, in denen die Lanthanoide Dy ( $\Delta\chi < 0$ ) und Tm ( $\Delta\chi > 0$ ) in **2** und **3** vertauscht waren. Der CEST-Effekt der erhaltenen Lösung dieser **2**(Tm)-**3**(Dy)-Liposomen in einer mit CD modifizierten Kapillare wurde im negativen Bereich der chemischen Verschiebungen beobachtet (Abbildung 3b, schwarze Quadrate), da erwartungsgemäß der Wechsel des Vorzeichens der magnetischen Anisotropie von **2**(Ln) zu einer senkrechten Ausrichtung dieser Liposomen relativ zu den zuvor beschriebenen führte, weshalb die **2**(Tm)-**3**(Dy)-Liposomen senkrecht zu  $B_0$  ausgerichtet sein sollten ( $b_{\perp}$ ). Um dies nachzuweisen, wurden alle ungebundenen Liposomen durch Spülen mit Pufferlösung entfernt, worauf ein stabil verbleibender CEST-Effekt im Gebiet  $\delta > 0$  (hellgraue Punkte und Kreise) in der A-Orientierung beobachtet wurde, wohingegen in der B-Orientierung das CEST-Signal bis auf einen wiederum kleinen CEST-Effekt bei  $\delta < 0$  verschwand (dunkelgraue Dreiecke).

Zusammenfassend konnte also die Orientierung, die durch das Binden asphärischer Liposomen an eine Zieloberfläche hervorgerufen wurde, durch gewöhnliche CEST-MR-Methoden bestimmt werden. In Lösung hatten die abgeflachten (linsenförmigen) **2**(Dy)-**3**(Tm)- und **2**(Tm)-**3**(Dy)-Liposomen eine  $b_{\parallel}$ - bzw.  $b_{\perp}$ -Orientierung relativ zum externen Magnetfeld  $B_0$ . Nach multivalenter Bindung über die Ad-Gruppen richteten sich beide Liposomentypen jedoch gleichermaßen parallel zu der mit CD modifizierten Kapillarwand aus, und sie behielten diese lokale Oberflächenausrichtung unabhängig von der Orientierung der Kapillare im  $B_0$ -Feld bei. In der hier beschriebenen Situation einer starken Bindung dominiert also die mechanische Ausrichtung der LipoCEST-KMs über die bevorzugte magnetische Orientierung und bestimmt somit ihre MR-Eigenschaften.

Asphärische LipoCEST-KMs bieten somit einmalige Möglichkeiten für molekulare MRT-Anwendungen, da an geeignet orientierte Oberflächen gebundene von ungebundenen KMs auf der Basis ihrer unterschiedlichen CEST-Resonanzfrequenzen unterschieden werden können, falls eine multivalente Bindung erfolgt. Es könnte sich in der Praxis jedoch als noch nützlicher erweisen, dass im Falle zielspezifischer, multivalenter Reagentien die chemische Verschiebung des intraliposomalen Wassers ein direktes Maß für deren Orientierung an einer Zieloberfläche bietet. Nach der Entfernung aller ungebundenen LipoCEST-KMs durch natürliche Exkretion sollte das beobachtete CEST-Signal daher empfindlich für die Orientierung der Zielstrukturen, wie Membranen, Gefäßwände oder Nervenfasern, sein und somit womöglich zusätzliche anatomische Informationen liefern können.

## Experimentelles

Glaskapillaren (100 µm Durchmesser; 10 cm lang) wurden mit einer Schicht eines CD-Derivats modifiziert, wie für mikrofluidische Chips bereits beschrieben wurde.<sup>[8]</sup> Experimentelle Details der Modifizierung und Beladung der Glaskapillaren sowie der CEST-MR-Studien mit ihnen und die Syntheseprotokolle sind in den Hintergrundinformationen zusammengefasst.

Eingegangen am 12. Oktober 2009  
Online veröffentlicht am 12. Februar 2010

**Stichwörter:** CEST (chemical exchange saturation transfer) · Kontrastmittel · Liposomen · Multivalenz · NMR-Bildgebung

- [1] a) M. Atri, *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 3299–3308; b) W. J. M. Mulder, G. J. Strijkers, E. Vucic, D. P. Cormode, K. Nicolay, Z. A. Fayad, *Top. Magn. Reson. Imaging* **2007**, *18*, 409–417.  
 [2] a) D. Delli Castelli, E. Gianolio, S. Geninatti Crich, E. Terreno, S. Aime, *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 2424–2443; b) A. D. Sherry, M. Woods, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2008**, *10*, 391–411; c) S. Langereis, J. Keupp, J. L. J. van Velthoven, I. H. C. de Roos, D. Burdinski, J. A. Pikkemaat, H. Grüll, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1380–1381; d) S. Aime, D. Delli Castelli, S. Geninatti Crich, E. Gianolio, E. Terreno, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 822–831; e) S. Aime, D. Delli Castelli, E. Terreno, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5649–5651; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5513–5515.

- [3] a) E. Terreno, C. Cabella, C. Carrera, D. Delli Castelli, R. Mazzon, S. Rollet, J. Stancanello, M. Visigalli, S. Aime, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 984–986; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 966–968; b) E. Terreno, D. Delli Castelli, L. Milone, S. Rollet, J. Stancanello, E. Violante, S. Aime, *Contrast Media Mol. Imaging* **2008**, *3*, 38–43.
- [4] D. Delli Castelli, E. Terreno, C. Carrera, G. B. Giovenzana, R. Mazzon, S. Rollet, M. Visigalli, S. Aime, *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 2928–2930.
- [5] a) E. Terreno, D. Delli Castelli, E. Violante, H. M. H. F. Sanders, N. A. J. M. Sommerdijk, S. Aime, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 1440–1448; b) S. C.-K. Chu, Y. Xu, J. A. Balschi, C. S. Springer, Jr., *Magn. Reson. Med.* **1990**, *13*, 239–262.
- [6] M. J. W. Ludden, D. N. Reinhoudt, J. Huskens, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 1122–1134.
- [7] H<sub>3</sub>hpdo3a = 10-(2-Hydroxypropyl)-1,4,7,10-tetraazacyclodecan-1,4,7-triessigsäure.
- [8] M. J. W. Ludden, X. Y. Ling, T. Gang, W. P. Bula, H. J. G. E. Gardeniers, D. N. Reinhoudt, J. Huskens, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 136–142.