

Click Functionalized Nanoprobes for Target Specific Biomedical Applications

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Shaista Ilyas
aus Lahore, Pakistan



Köln, 2016

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Anorganische Chemie der Universität zu Köln unter der Anleitung von Prof. Dr. Sanjay Mathur angefertigt.

Berichterstatter: Prof. Dr. Sanjay Mathur
Prof. Dr. Klaus Schomäcker

Vorsitzender: Prof. Dr. H. G. Schmalz

Beisitzer: Dr. Lisa Czypiel

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.2015

To My Beloved Grand Father

Parents and Family

Abstract

Engineered superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) are smart materials for advanced biomedical applications because of their appealing physicochemical properties. These properties entail uniform size, shape, good biocompatibility, chemical inertness, physiological stability, phase purity, high values of saturation magnetization and facile surface functionalization. In this thesis α -Fe₂O₃- (hematite) and Fe₃O₄- (magnetite) nanoparticles (NPs) were synthesized using microwave and solvothermal methods. Additionally various reactive organic molecules such as azides and alkynes were attached to the surfaces of particles *via* "Click chemistry" methods. The click-functionalized particles were studied for selective conjugation of proteins derived from the leaf proteome and also explored for labeling with ⁶⁸Ga and ¹⁷⁷Lu. Furthermore, the labeling of particles with ⁶⁸Ga or ¹⁷⁷Lu for the diagnosis and radio-therapeutic use against cancer cells could be demonstrated.

First α -Fe₂O₃ nanocubes were synthesized by thermal decomposition of iron nitrate [Fe(NO₃)₃•9H₂O] in dimethylformamide (DMF) in the presence of polyvinylpyrrolidone (PVP). The results indicated that the reaction time significantly contributed to observe alteration in particle sizes and shapes. This cube shaped α -Fe₂O₃ method was tested with respect to the influence of noble metal cations (Cu²⁺, Ag⁺, and Au³⁺) concentrations on structure, growth behaviour, and magnetism *in situ*. The major findings are; (i) phase transformation from α -Fe₂O₃ to Fe₃O₄ (with Cu²⁺) and α -Fe₂O₃ to γ -Fe₂O₃ (with Ag⁺) without annealing, while Au³⁺ did not induce any phase transition; (ii) alteration of cube shaped morphology of α -Fe₂O₃ to triangles, spheres and flowers shaped NPs as determined by HR-TEM (iii) superparamagnetism with high value for saturation magnetism from 0.20 to 43 Am²kg⁻¹ (Cu²⁺ treated Fe₂O₃) and 0.20 to 36.1 Am²kg⁻¹ (Ag⁺ treated Fe₂O₃) (iv) phase purity of all samples of NPs as determined by Mössbauer spectroscopy. Cell viability studies showed negligible toxic effects of NPs using mouse fibroblast cells making them ideal for various biological assays.

Second, in another approach, magnetite particles (ca. 6 nm diameter) were synthesized by microwave-assisted thermal decomposition of iron acetylacetonate and subsequently functionalized following a click chemistry approach *via* Cu (II) and sodium ascorbate to obtain biotin and E-64 (cys protease inhibitor) labelled particulate systems. Successful surface modification and covalent attachment of functional groups and molecules were confirmed by FT-IR spectroscopy and thermal gravimetric analysis. The ability of the surface-grafted biotin terminal SPIONs groups specifically interacted with streptavidin (either horseradish peroxidase [(HRP)-luminol-H₂O₂] or Rhodamine (Fluorescence)] as systematically determined by chemiluminescence and

fluorescence scanning methods. A quantitative assessment showed a decent capture limit of 0.55–1.65 μg protein/100 μg particles. Furthermore, E-64@SPIONs were successfully used to specifically label papain-like cysteine proteases derived from crude plant extract. Our studies provide an excellent alternative to handle extensive protein work especially when multiple proteins need to be studied.

Third, we extended the click chemistry approach to different biomolecules for target specific therapeutic and diagnostic applications. Stabilized NPs (DOPA-capped Fe_3O_4 , 5 nm \pm 1) were synthesized by reducing homogeneous solution of $\text{Fe}(\text{OH})_3$ with a versatile biomimetic anchor, dopamine (3,4-dihydroxyphenylalanine, DOPA) in a facile hydrothermal method. The functional properties of DOPA-capped Fe_3O_4 particles were enhanced by binding the targeting molecules (mestranol/estradiol) via Cu (II) and sodium ascorbate system of “Click chemistry” to obtain mestranol-DOPA- Fe_3O_4 and estradiol-DOPA- Fe_3O_4 nanoprobos. In addition, NMR spectroscopy was applied on click functionalized silica (SiO_2) particles to prove the immobilisation of various organic molecules at NPs surface. In the investigation of dopamine-capped SiO_2 particles (i) significant signal broadening in visible in the presence of particles in the sample (ii) there are only recognizable signals of functional groups, which are close to the particle surface, as the terminal groups of the dopamine ($-\text{NH}_2$) or undecylbromide (iii) the signal intensity of estradiol on the particle surface is negligibly small.

Finally, iron oxide nanoprobos were conjugated with 4-(2-aminoethyl) benzene-1, 2-diol (DOTA) for the further encapsulation of the radionuclides ^{68}Ga and ^{177}Lu . The major findings are (i) directly proportional relationship between the concentrations of DOTA-capped Fe_3O_4 particles and radiolabeling efficiency (ii) stability of mestranol-DOTA- Fe_3O_4 and estradiol-DOTA- Fe_3O_4 nanoprobos with ^{177}Lu in PBS buffer under physiological conditions (at 37°C, pH 4.5) (iii) excellent radiolabeling retention yield of nearly 100 % as determined by radio-HPLC.

The results of *in vitro* studies suggest that Fe_3O_4 NPs with appropriate surface modification permit as probes for the treatment of breast cancer, an application in clinical nanomedicine.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Herstellung von superparamagnetischen Eisenoxid Nanopartikeln (engl. SPIONs) und deren Eignung für biomedizinische Anwendung untersucht. Prinzipiell weisen SPIONs viele vorteilhafte Eigenschaften wie einheitliche Größe und Form, eine gute Biokompatibilität, chemische Inertheit, Stabilität unter physiologischen Bedingungen, Phasenreinheit, hohe Sättigungsmagnetisierung und die Möglichkeit der Oberflächenmodifikation auf. Die in dieser Arbeit beschriebenen α -Fe₂O₃- (Hämatit) und Fe₃O₄- (Magnetit) Nanopartikel wurden mittels mikrowellenassistierter und Solvothermalsynthese hergestellt. Mithilfe von „Click-Chemie“ wurden organische Azide und Alkine an der Partikeloberfläche immobilisiert und die Partikel wurden für die selektive Konjugation von „proteome“ Proteinen untersucht. Des Weiteren konnte die Markierung der Partikel mit ⁶⁸Ga bzw. ¹⁷⁷Lu für die Diagnose und radiotherapeutische Anwendung gegen Krebszellen gezeigt werden.

In einem ersten Ansatz wurden kubische α -Fe₂O₃-Nanopartikel durch die thermische Zersetzung von Eisen (III) nitrate nonahydrat ([Fe(NO₃)₃•9H₂O]) in Dimethylformamid in Gegenwart von Polyvinylpyrrolidon hergestellt. Dabei wurde festgestellt, dass die Reaktionszeit einen signifikanten Einfluss auf die Partikelgröße und -form hat. Des Weiteren konnte der Einfluss von Münzmetallkationen (Cu²⁺, Ag⁺ und Au³⁺) auf die Struktur, das Wachstumsverhalten und Magnetismus der Partikel *in situ* untersucht werden. Die Ergebnisse zeigen, dass (i) Cu²⁺ zur Phasenumwandlung von α -Fe₂O₃ zu Fe₃O₄ und Ag⁺ von α -Fe₂O₃ zu γ -Fe₂O₃ ohne anschließende Kalzinierung führt, während Au³⁺ aufgrund des Ionenradius keine Veränderung des Phasenverhaltens bewirkt; (ii) die kubische Struktur durch dreieckige, kugel- und blütenförmige Strukturen abgelöst werden, wie mittels hochauflösender Transmissionselektronenmikroskopie nachgewiesen werden konnte; (iii) verstärkter Superparamagnetismus mit Cu²⁺ (43 statt 0.20 AM²kg⁻¹) und Ag⁺ (36.1 statt 0.20 AM²kg⁻¹) auftritt; (iv) alle erhaltenen Partikel phasenrein waren, was mittels Mößbauer-Spektroskopie nachgewiesen wurde. Die physiologische Kompatibilität wurde an Maus Fibroblasten getestet und zeigte eine geringe Toxizität der Partikel, wodurch sie vielversprechende Kandidaten für biomedizinische Anwendungen sind.

In einem weiteren Ansatz wurden Magnetit-NPs mit einem Durchmesser von ca. 6 nm durch die mikrowellenchemische Zersetzung von Eisenacetylacetonat hergestellt, die anschließend mittels Click-Chemie unter Einsatz von Cu (II) und Natriumascorbat für die Markierung mit Biotin bzw. E-64 (cys Protease Inhibitor) verwendet wurden. Die erfolgreiche Oberflächenmodifikation und kovalente Bindung der funktionellen Gruppen und Moleküle wurde mittels Infrarotspektroskopie und

thermogravimetrischen Methoden nachgewiesen. Es konnte außerdem mit Chemolumineszenz- und Fluoreszenzmethoden gezeigt werden, dass das an der Partikeloberfläche immobilisierte Biotin spezifisch mit Streptavidin (Meerrettich Peroxidase (HRP) [(HRP)-luminol-H₂O₂] oder Rhodamin [Fluoreszenz]) interagiert. Dabei wurde ein Aufnahme-limit von 0.55-1.65 µg Protein / 100 µg Partikel bestimmt. E-64-markierte Partikel konnten weiterhin erfolgreich für die spezifische Markierung von Papain-ähnlichen Cystein Proteasen verwendet werden, was für die zukünftige Anwendung bei der Untersuchung von Proteinen vielversprechend ist.

Der dritte Ansatz erweiterte die o.g. click-chemischen Ansätze in Richtung zielspezifische therapeutische und diagnostische Anwendung. Dabei wurden durch Reduktion von Fe(OH)₃ in homogener Lösung in Gegenwart von Dopamin (3,4-Dihydroxyphenylalanin, DOPA) als biomimetischer Anker stabilisierte NPs (DOPA-Fe₃O₄, 5 nm ±1) hergestellt. Durch die Bindung der Zielmoleküle (Mestranol und Estradiol) mittels Cu (II) und Natriumascorbat konnten Mestranol-bzw-Estradiol-Nanosonden mit verbesserten Eigenschaften erhalten werden. Zusätzlich wurde die Immobilisierung verschiedener organischer Moleküle an analog behandelten SiO₂-NPs mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Bei der Untersuchung von DOPA-SiO₂-NPs konnte folgendes gezeigt werden: (i) Durch die Anwesenheit von NPs ist eine deutliche Signalverbreiterung sichtbar. (ii) Es sind nur Signale von funktionellen Gruppen erkennbar, die nahe an der Partikeloberfläche sind, wie die endständigen Gruppen des Dopamins (-NH₂) oder Undecylbromids. (iii) Die Signalintensität von Estradiol an der Partikeloberfläche ist vernachlässigbar klein.

Schließlich wurden Eisenoxid-Nanosonden mit 4-(2-aminoethyl)benzyl-1,2-diol (DOTA) behandelt und für die Markierung mit den Radionukliden ⁶⁸Ga und ¹⁷⁷Lu verwendet. Dabei konnte gezeigt werden: (i) Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Konzentration von DOTA-Fe₃O₄ und der Effizienz der Radiomarkierung; (ii) Sowohl mestranol-DOTA-Fe₃O₄- als auch estradiol-DOTA-Fe₃O₄ sind in Gegenwart von ¹⁷⁷Lu im PBS Puffer unter physiologischen Bedingungen (37°C, pH 4.5) stabil und (iii) Mittels Radio-HPLC wurde eine exzellente Ausbeute bei der Radiomarkierung festgestellt.

Die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen deuten darauf hin, dass Fe₃O₄-NPs mit passender Oberflächenmodifikation als Sonden für die Therapie von Brustkrebs eine Anwendung in der klinischen Nanomedizin erlauben.

