

# Lipid Nanoparticles as MRI Contrast Agents for the Detection of Atherosclerotic Plaques

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

Fracassi, Alessandro

**Publication date:**

2020

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000406587>

**Rights / license:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

Diss. ETH NO. 26497

# **Lipid Nanoparticles as MRI Contrast Agents for the Detection of Atherosclerotic Plaques**

A thesis submitted to attain the degree of

**DOCTOR OF SCIENCES of ETH Zurich**

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

**Alessandro Fracassi**

M. Sc., Sapienza University of Rome

born on 19.04.1988

citizen of Italy

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Yoko Yamakoshi, examiner

Prof. Dr. Jean-Christophe Leroux, co-examiner

Prof. Dr. Peter Johann Walde, co-examiner

2020

## Abstract

Low-density lipoprotein (LDL) has been widely recognized as a useful natural system for the delivery of drugs and imaging probes in cancer and other inflammatory diseases. In particular, natural LDL has been successfully employed as a carrier for magnetic resonance imaging contrast agents (MRI-CA) for the *in vivo* detection of atheroplaques. However, the progress in the use of natural LDL has been hampered by the necessity of isolation from fresh blood plasma of donors, and by the laborious drug loading process often involve, which limits the therapeutic applications of LDL and their use in clinic. The development of completely synthetic LDL (sLDL) may be able to overcome these problems.

The sLDL can be constituted by lipid nanoparticles (LNPs). LNPs have attracted significant attention as biocompatible delivery vehicles of both diagnostic and therapeutic agents. A major challenge in the preparation of sLDL from LNPs is the development of chemical reactions that can efficiently attachment biomolecules and imaging probes onto the LNPs surface, by stable covalent bond formation. This thesis presents the preparation of LNP-based natural LDL mimetic nanoparticles, achieved by efficient covalent functionalization of the LNPs surface with an apolipoprotein-mimetic peptide and imaging probes (MRI-CA and optical probes). The surface functionalization method relies on the use of a chemoselective amide-forming ligation reaction, namely potassium acyltrifluoroborate (KAT) ligation.

As a material for LNPs preparation, a KAT derivative of oleic acid (OA-KAT) was synthesized and added to a mixture of three lipid components (phosphatidylcholine, triolein, cholesteryl oleate). The mixture of lipids was sonicated and extruded in Tris-HCl buffer (pH 8.0), to provide LNPs equipped with KAT functional group (**LNP-KAT**). The obtained **LNP-KAT** particle was characterized by DLS and cryo-TEM, indicating a uniform dispersion with an average diameter of ca. 50 nm. For the preliminary test on the efficiency of the ligation reaction on particles surface, **LNP-KAT** with different amounts of OA-KAT (0, 2.5, 5, 10 mol%) were prepared and subjected to KAT ligation with a hydroxylamine derivative of fluorescein (HA-fluorescein) in phosphate buffer (pH 5.8) at room temperature. The UV-vis and fluorescence spectra of the obtained particles clearly indicated that fluorescein was stably attached onto the nanoparticles surface dependently on the amount of OA-KAT incorporated in the **LNP-KAT**. The quantification of boron (determined by inductively coupled plasma mass spectrometry) and fluorescein (determined by fluorescence)

in the particles, before and after KAT ligation, indicated that the **LNP-KAT** surface functionalization proceeded efficiently in a yield of 40-50%.

Subsequently, the KAT ligation of **LNP-KAT** nanoparticle and HA derivatives was used in the preparation of LDL-mimetic nanoparticles bearing an apolipoprotein-mimetic peptide and imaging probes (a Gd-chelate MRI-CA and optical probes), aiming the selective detection of atheroplaques. Hydroxylamine derivatives of apoB100-mimetic peptide, Gd(DO3A) and fluorescein were synthesized and used in the KAT ligation with **LNP-KAT**. As assessed by MALDI-MS (to detect the ligation products) and ICP-MS (to determine the Gd<sup>3+</sup> amount) analyses, sLDL carrying both an apolipoprotein-mimetic peptide moiety and a Gd-chelate (**sLDL-Gd**) was prepared efficiently by KAT ligation. The conjugation of the Gd(DO3A) derivative onto the **LNP-KAT** nanoparticles provided **sLDL-Gd** with high payload, providing a relaxivity ( $r_1 = 22.0 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$  per Gd<sup>3+</sup>, at 1.5 T, 25 °C) much higher than the small molecules MRI-CA (ProHance,  $r_1 = 4.0 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$  per Gd<sup>3+</sup>, at 1.5 T, 25 °C).

The obtained **sLDL-Gd** nanoparticles were preliminary tested *in vitro* using monocyte and macrophage derived cell lines, and subsequently *in vivo* on an atherosclerosis mouse model (*apoE*<sup>-/-</sup>). A **sLDL-Gd** dispersion was injected intravenously in *apoE*<sup>-/-</sup> mice, and MR images of the aortic arch were acquired pre- and post-injection. The images obtained indicated a clear contrast enhancement of the left common carotid artery wall, observed 48 h post-injection of **sLDL-Gd**. Aorta segments containing atheroma were finally dissected and subjected to ICP-MS analysis, revealing the accumulation of significant amount of Gd<sup>3+</sup> in the targeted atheroplaques.

The use of KAT ligation was further investigated for the surface functionalization of self-assembled monolayers (SAMs) on gold surfaces. A dialkyl thioether molecule, bearing a terminal KAT group, was synthesized and used for the preparation of SAM on gold. Subsequently, the obtained SAMs were subjected to surface KAT ligation with a water soluble hydroxylamine derivative of PEG12 (HA-PEG) in phosphate buffer (pH 5.5). The SAM on gold before and after the ligation was characterized by XPS, contact angle, and ellipsometry, clearly confirming the covalent modification of the surface. The reaction process of KAT ligation for the modification of SAMs was also evaluated by quartz crystal microbalance (QCM), indicating the modification of SAMs at very low concentration. The results suggested that KAT ligation can be potentially used for the modification of surfaces with biomolecules such as proteins and nucleic acids, which often require the use of very low concentrations of reagents.

## Sommario

Le lipoproteine a bassa densità (LDL) sono ampiamente riconosciute come un utile sistema naturale per la somministrazione selettiva di farmaci nei casi di cancro e di altre malattie infiammatorie. In particolare, le LDL naturali sono state impiegate con successo come vettori di agenti di contrasto nell' *imaging* a risonanza magnetica (MRI-CA) per il rilevamento di placche ateromasiche *in vivo*. Tuttavia, i progressi nell'uso delle LDL naturali sono stati ostacolati sia dalla necessità di isolare le LDL dal plasma di donatori che dai complicati processi di funzionalizzazione, che ne limitano le applicazioni terapeutiche sfavorendone l'utilizzo in *trial* clinici. Lo sviluppo di nanoparticelle di origine interamente sintetica può aiutare a superare queste problematiche.

Un buon materiale di partenza per la preparazione di nanoparticelle sintetiche in grado di imitare l'azione delle LDL (sLDL) è costituito da nanoparticelle lipidiche (LNPs), le quali hanno attirato molta attenzione per il loro possibile utilizzo come veicoli biocompatibili per la somministrazione di agenti diagnostici e terapeutici. Una delle maggiori difficoltà nell'uso di LNPs per la preparazione di sLDL è lo sviluppo di reazioni chimiche che possano essere utilizzate per la coniugazione di biomolecole sulla superficie delle LNPs, mediante formazione di un legame covalente stabile. In questa tesi viene presentata la preparazione di LNPs mimetiche delle LDL naturali, ottenute mediante funzionalizzazione covalente della superficie di LNPs con un peptide che mima l'azione di un'apolipoproteina e di sonde di *imaging* (MRI-CA e sonde ottiche). Il metodo di funzionalizzazione della superficie si basa sull'uso di una reazione di legatura che conduce chemoselettivamente alla formazione di un'ammide, la legatura di potassio aciltrifluoroborato (KAT).

Come substrato per la preparazione di LNP, un derivato KAT dell'acido oleico (OA-KAT) è stato sintetizzato e aggiunto a una miscela di tre componenti lipidici (fosfatidilcolina, trioleina, colesterolo oleato). La miscela di lipidi è stata sonicata ed estrusa in tampone Tris-HCl (pH 8.0), per fornire LNPs dotate di KAT (**LNP-KAT**). Le **LNP-KAT** così ottenute sono state caratterizzate con DLS e crio-TEM, indicando la formazione di una dispersione uniforme, con un diametro medio di ca. 50 nm. Per testare l'efficienza della funzionalizzazione delle particelle, **LNP-KAT** con diverse quantità di OA-KAT **1** (0, 2,5, 5, 10 mol%) sono state preparate e sottoposte a legatura KAT con un derivato idrossilaminico della fluoresceina (HA-fluoresceina) in tampone fosfato (pH 5.8) a temperatura ambiente. I risultati delle misurazioni ad UV-vis e a fluorescenza hanno indicato chiaramente che la fluoresceina era legata stabilmente sulla superficie delle nanoparticelle in modo dipendente

dalla quantità di OA-KAT incorporata nel **LNP-KAT**. La quantificazione del boro (determinata mediante spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente) e la fluoresceina (determinata da spettroscopia di fluorescenza) nelle particelle, prima e dopo la legatura KAT, hanno indicato che la funzionalizzazione della superficie **LNP-KAT** è proceduta in modo efficiente, con una resa del 40-50%.

Successivamente, la legatura KAT tra nanoparticelle **LNP-KAT** e derivati HA è stata utilizzata nella preparazione di nanoparticelle mimetiche delle LDL, funzionalizzate con un peptide apolipoproteico e sonde di imaging (MRI-CA e sonde ottiche), mirando alla rilevazione selettiva di atheroplacche. Derivati di idrossilamina di un peptide mimetico della proteina apoB100, di Gd(DO3A) e fluoresceina sono stati sintetizzati e usati come miscela nella legatura KAT con **LNP-KAT**. La reazione è proceduta in modo efficiente, come valutato dalle analisi MALDI-MS (per l'identificazione dei prodotti di reazione) e ICP-MS (per la determinazione di Gd<sup>3+</sup>), fornendo sLDL recanti sia un complesso di Gd che un gruppo peptidico mimetico della proteina apoB100 (**sLDL-Gd**). La coniugazione del derivato Gd(DO3A) sulle LNP-KAT ha prodotto sLDL-Gd con una rilassività ( $r_1 = 22,0 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$  per Gd<sup>3+</sup>, a 1,5 T, 25 °C) molto più elevata degli MRI-CA a basso peso molecolare (ProHance,  $r_1 = 4.0 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$  per Gd<sup>3+</sup>, a 1,5 T, 25 °C).

L'uso della legatura KAT è stato ulteriormente studiato per la funzionalizzazione di superfici di monostrati auto-assemblati (SAMs) su superfici di oro. Una molecola di dialchil tioetere, recante un gruppo KAT terminale, è stata sintetizzata e utilizzata per la preparazione di SAMs su oro. Successivamente, i SAMs ottenuti sono stati sottoposti a legatura KAT superficiale con un derivato idrossilamina solubile in acqua di PEG12 (HA-PEG) in tampone fosfato (pH 5.5). I SAMs su oro così ottenuti sono stati caratterizzati con XPS, angolo di contatto ed ellipsometria prima e dopo la legatura KAT, confermando chiaramente l'avvenuta modifica covalente della superficie. Il processo di reazione della legatura KAT per la modifica dei SAMs è stato studiato anche mediante microbilancia a cristallo di quarzo (QCM), indicando che la modifica covalente dei SAMs può avvenire in condizioni di diluizione elevate. I risultati hanno suggerito che la legatura KAT può essere utilizzata per la modifica di superfici con biomolecole come proteine e acidi nucleici, che spesso richiedono l'uso di concentrazioni molto basse di reagenti.