

Agenti di contrasto Mri per angiografia

di Luciano Lattuada

Da quindici anni ormai i complessi di gadolinio sono utilizzati come agenti di contrasto nell'imaging diagnostico mediante risonanza magnetica (Mri), ricoprendo un ampio spettro di applicazioni. Nonostante esista già sul mercato un discreto numero di tali prodotti, l'esigenza di diagnosi sempre più precoci e meno invasive ha stimolato la continua ricerca di agenti di contrasto per Mri sempre più specifici per determinati organi, in particolare per il sistema cardiovascolare.

L'imaging mediante risonanza magnetica (Mri) è una tecnica diagnostica non invasiva molto efficace e ormai largamente diffusa in medicina. Essa consente di ottenere delle immagini dell'interno del nostro corpo sfruttando la diversa densità protonica dei tessuti o più semplicemente il loro diverso contenuto d'acqua. Per aumentare la varietà e la qualità delle immagini che si ottengono con la tecnica Mri spesso si somministra al paziente un opportuno agente di contrasto.

Attualmente circa il 25% delle indagini Mri si effettua con agenti di contrasto e tra questi i più utilizzati sono complessi di gadolinio (Figura 1) [1, 2]. La risonanza magnetica sfrutta, infatti, il diverso tempo di rilassamento dei protoni dell'acqua e lo ione gadolinio, grazie alle sue favorevoli proprietà magnetiche, è in grado di far rilassare molto velocemente i protoni dell'acqua ad esso coordinata [3]. A causa però della sua tossicità [4] lo ione gadolinio deve essere complessato stabilmente da un opportuno legante ed i leganti più efficaci hanno una struttura poliamminopolicarbossilica [5, 6]. Non è perciò un caso che i prodotti più importanti al momento in commercio (Figura 1) appartengano a questa categoria. Lo ione gadolinio ha nove siti di coordi-

L. Lattuada, Bracco Imaging SpA - Milano. luciano.lattuada@bracco.com

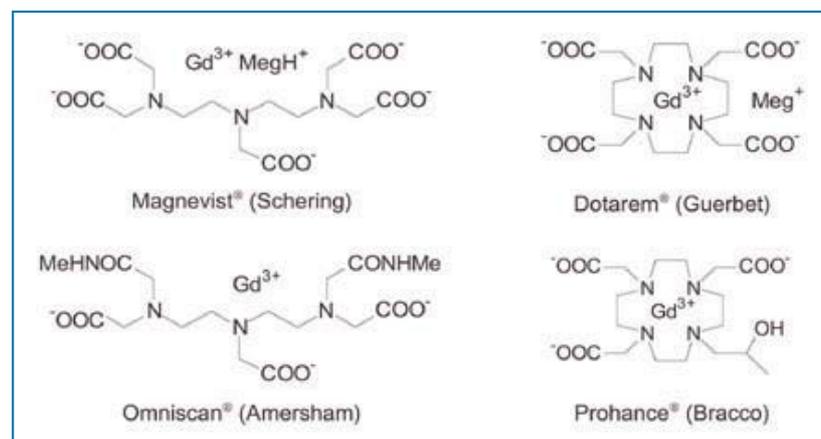
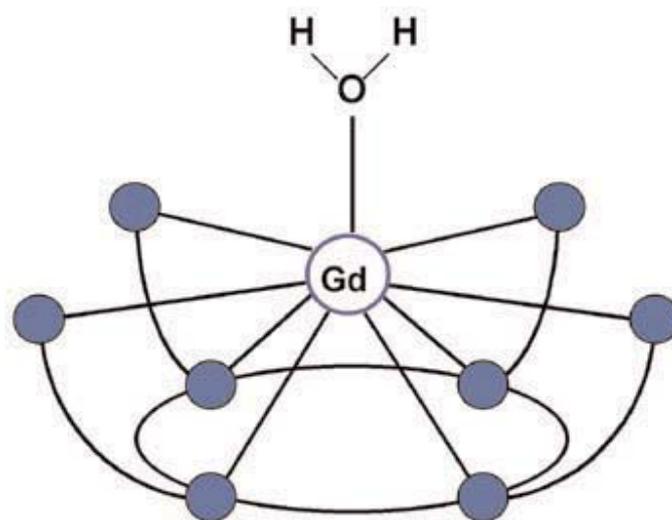


Figura 1 - Struttura chimica dei complessi di gadolinio più utilizzati in diagnostica



nazione ma qualunque sia il legante utilizzato esso deve lasciare almeno un sito libero in modo da coordinare una molecola d'acqua. L'efficienza di un complesso di gadolinio è valutata attraverso la misura della rilassività (r_1) che rappresenta l'incremento della velocità di rilassamento dei protoni dell'acqua in presenza del complesso stesso. I complessi al momento in commercio (Figura 1) hanno valori di rilassività di 3-4 $mM^{-1}s^{-1}$ alla frequenza di 20 MHz e a 39 °C. Subito dopo essere stati iniettati nel paziente, tali prodotti permeano attraverso la membrana dei vasi e dei capillari e si distribuiscono molto velocemente nel fluido extracellulare (Figura 2).

Essi trovano una vasta applicazione ad esempio nel diagnosticare le lesioni della barriera ematoencefalica, ma non sono altrettanto efficaci per l'imaging del sistema cardiovascolare. I disturbi occlusivi a carico di tale sistema, come ad esempio embolismo e arteriosclerosi, rappresentano una delle principali cause di mortalità nel mondo occidentale e l'angiografia Mri costituirebbe pertanto un'alternativa valida e molto meno invasiva della tradizionale angiografia mediante raggi X. Per la visualizzazione del sistema cardiovascolare è necessario però che il mezzo di contrasto rimanga in circolo un tempo sufficientemente lungo: serve cioè un cosiddetto agente di contrasto "blood

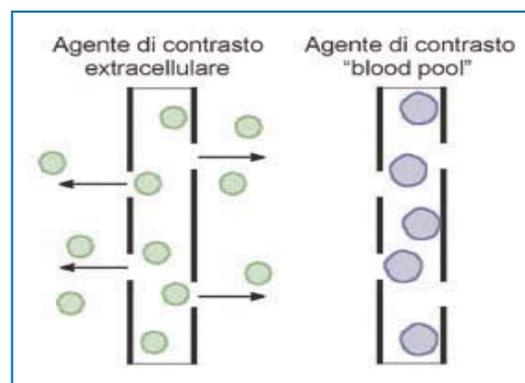


Figura 2 - Comportamento schematico all'interno dei vasi sanguigni di un agente di contrasto extracellulare e di un "blood pool"

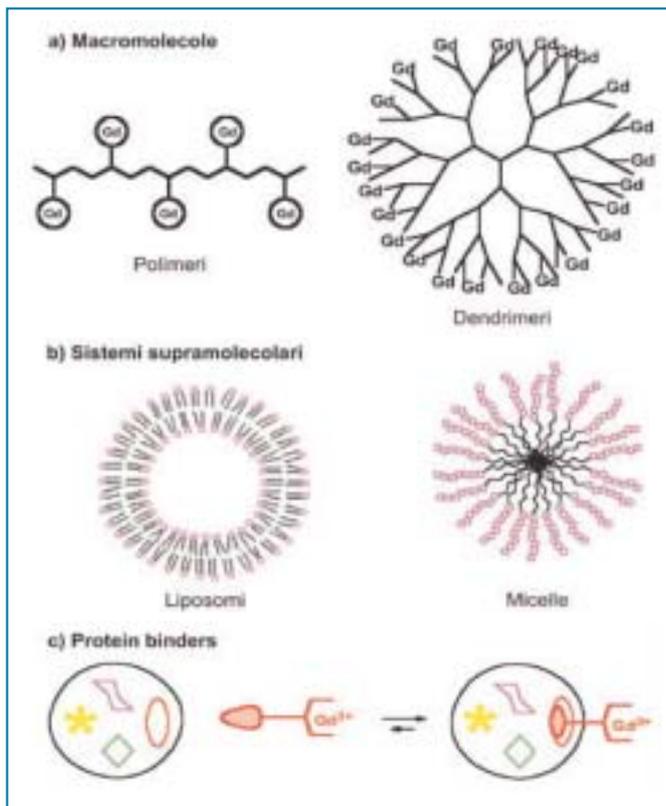


Figura 3 - Principali approcci per l'ottenimento di un agente di contrasto "blood pool"

pool" (Figura 2). L'approccio più immediato e più semplice è quello di utilizzare delle macromolecole che, a causa delle loro notevoli dimensioni, non possono extravasare (Figura 3a) [7]. Esempi in tal senso sono l'albumina [8], il destrano [9], la polilisina [10], i polimeri [11] e i dendrimeri [12] sintetici, tutti funzionalizzati covalentemente con un gran numero di complessi di gadolinio. Dal punto di vista delle immagini ottenute su animali tutti questi prodotti sono eccellenti.

Sfortunatamente però essi vengono eliminati dall'animale in tempi troppo lunghi, con conseguente degradazione in vivo e rilascio di gadolinio. Questo è ovviamente inaccettabile per un agente di contrasto che, per essere considerato sicuro e quindi approvato dalle autorità sanitarie, deve essere eliminato al

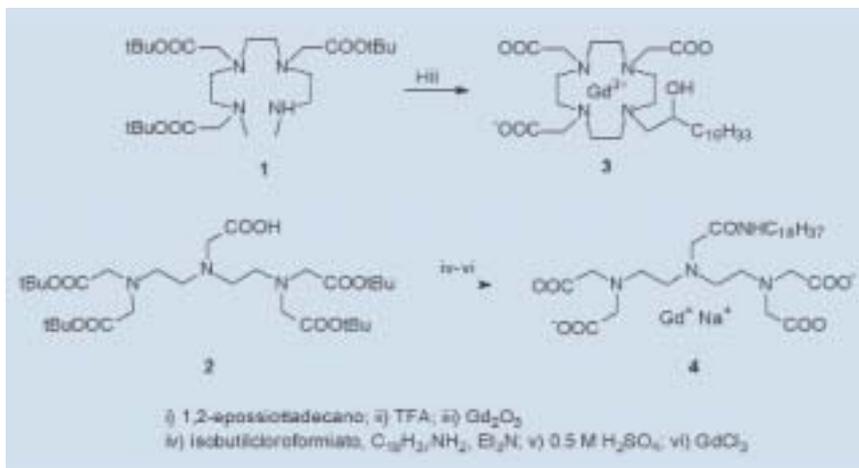


Figura 4 - Rappresentazione schematica e composizione di una micella mista

100% dall'organismo in un tempo breve e senza subire degradazione. Il secondo approccio (Figura 3b) prevede l'impiego di aggregati supramolecolari come i liposomi [13] e le micelle [14] che rimangono nei vasi grazie alla loro dimensione ma vengono con il tempo degradati nei singoli componenti, di più facile eliminazione. Il terzo approccio (Figura 3c) utilizza dei complessi di gadolinio in grado di legarsi reversibilmente alle proteine del sangue, principalmente all'albumina [15]. Dato che tali proteine non extravasano, altrettanto fa il complesso ad esse legato mentre la frazione di complesso non legata alle proteine è immediatamente e facilmente eliminata.

Sistemi supramolecolari

Per questo tipo di approccio ci siamo focalizzati sull'impiego di micelle miste [16, 17] che sono delle micelle costituite da più di un tipo di componente, in particolare: un agente micellizzante, un fosfolipide e un complesso lipofilo di gadolinio (Figura 4). Come agente micellizzante si è utilizzato il Synperonic F108, un tensioattivo non ionico biocompatibile. Si tratta di un copolimero a blocchi di polioossietilene-poliossipropilene-poliossietilene (PEO-PPO-PEO) per l'80% idrofilo e avente un peso molecolare medio di 14.000 Da. Il Synperonic F108 in acqua micellizza spontaneamente e, in opportune condizioni, è in grado di inglobare altre sostanze come appunto dei complessi lipofili di gadolinio. Per aumentare la lipofilia dei comuni complessi di gadolinio si è inizialmente pensato di legare covalentemente una catena alifatica di 16 o 18 atomi di carbonio. Per la sintesi di tali derivati (Schema 1) si sono utilizzati dei pro-chelanti di facile ottenimento, come il DO3A triestere *t*-butilico **1** [18] e il DTPA tetraestere *t*-butilico **2** [19]. Questi sintoni sono stati fatti reagire rispettivamente con 1,2-epossiottadecano e

Schema 1 - Sintesi di complessi di gadolinio lipofili di prima generazione

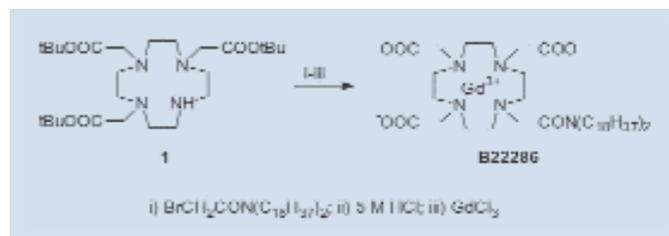
con ottadecilammina, successivamente deprotetti in condizioni acide ed infine complessati con gadolinio ossido o gadolinio tricoloruro a dare i complessi lipofili **3** e **4**. Questi composti, cosiddetti di prima generazione, hanno fornito delle micelle miste ad alta rilassività, ma sono stati ben presto abbandonati a causa del loro elevato effetto emolitico. Si è così passati alla sintesi di prodotti di seconda generazione, contenenti due catene alifatiche, come ad esempio B22286 (Schema 2).

In particolare le micelle miste ottenute utilizzando il complesso B22286 possiedono un'elevata rilassività ($25 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, circa 5/6 volte quella dei prodotti attualmente in commercio) e hanno mostrato una buona permanenza nel sangue e nessun effetto emolitico. Sfortunatamente, da prove effettuate su animali, la loro eliminazione è risultata essere troppo lenta ed incompleta e in conclusione da questo approccio non si è riusciti ad identificare un "lead candidate" da proporre allo sviluppo.

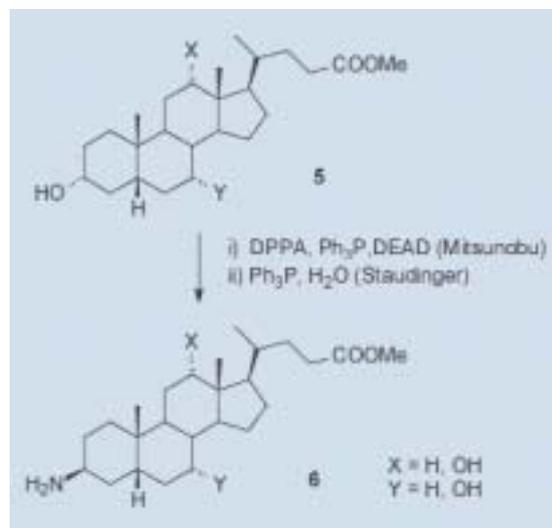
Protein binders

Per questo approccio si utilizzano dei complessi di gadolinio coniugati a molecole che sono in grado di legarsi fortemente ma reversibilmente con le proteine presenti nel sangue, in particolare con l'albumina che è la più abbondante.

L'osservazione che gli acidi biliari si legano all'albumina umana [20] e il fatto che in passato ci eravamo già impegnati nella sintesi di complessi di gadolinio coniugati all'acido colico per l'imaging Mri del fegato [21], ci ha spronato a proseguire le ricerche in questa direzione, con l'intento appunto di ottenere un agente di contrasto Mri "blood pool". Il metodo più semplice per coniu-



Schema 2 - Sintesi di un complesso di gadolinio lipofilo di seconda generazione



Schema 3 - Sintesi regioselettiva e stereoselettiva di derivati 3β-aminocolanici

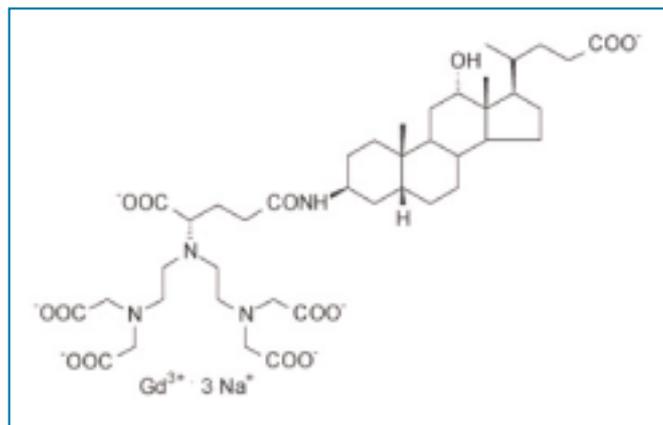
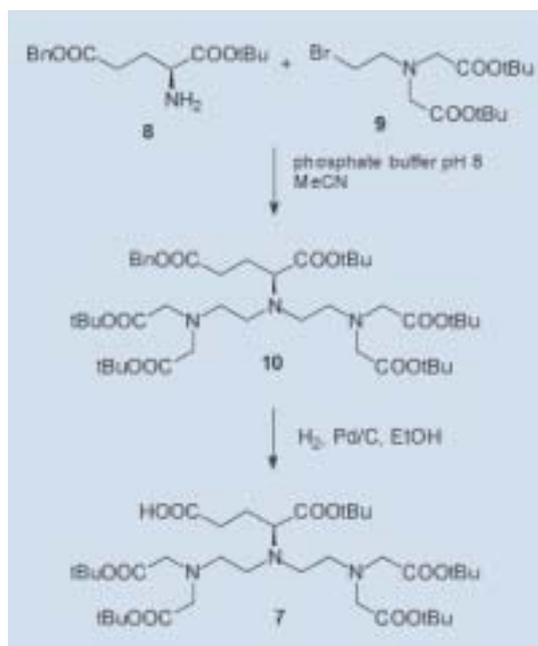


Figura 5 - Struttura di B22956/1, un agente di contrasto Mri "blood pool" derivato dall'acido desossicolico

gare stabilmente un legante poliamminopolicarbossilico ad una biomolecola è mediante un legame di tipo ammidico. Abbiamo perciò messo a punto una sintesi one-pot regioselettiva e stereoselettiva per trasformare l'ossidrilico in posizione 3 degli acidi biliari **5** in un gruppo amminico (Schema 3) [22]. La sintesi prevede l'iniziale trasformazione dell'OH in azide 3β mediante una reazione di Mitsunobu [23, 24] con difenilfosforilazide (DPPA), trifenilfosfina (Ph_3P) e dietilazodicarbossilato (DEAD) in tetraidrofurano. L'azide intermedia così ottenuta può essere isolata per cromatografia oppure, più convenientemente, ridotta *in situ* mediante Ph_3P e H_2O (reazione di Staudinger) [25] a dare i corrispondenti derivati 3β-amminocolanici **6**.

A questo punto abbiamo sintetizzato il pro-chelante **7** (Schema 4) [19] applicando all'acido glutammico la metodologia di bisalchilazione di amminoacidi riportata da Rapoport [26]. In particolare l'estere α-*t*-butilicoγ-benzilico dell'acido L-glutammico è stato bisalchilato con il bromoderivato **9**, a sua volta facilmente

Schema 4 - Sintesi del DTPA pro-chelante funzionalizzato **7** mediante bisalchilazione i Rapoport



ottenibile per alchilazione dell'etanollamina con bromoacetato di *t*-butile e successiva bromurazione con *N*-bromosuccinimide e Ph_3P . L'esaestere **10** è stato poi deproteggato mediante idrogenazione catalitica a dare il pro-chelante **7** che costituisce un sintone estremamente versatile per l'inserimento dell'acido dietilenti-triamminopentaacetico (DTPA) su una qualunque molecola avente un ammino gruppo. In tal senso **7** è stato coniugato, utilizzando i classici agenti di coupling per la sintesi peptidica, con i derivati 3β-amminocolanici **6** otte-

nendo, dopo deprotezione con LiOH di tutti gli esteri presenti e complessazione con $GdCl_3$, una serie di complessi di gadolinio in grado di interagire con l'albumina [27]. Dalla valutazione delle proprietà di tutti questi prodotti B22956/1 (Figura 5) è risultato essere il migliore in termini di interazione con l'albumina ($K_a = 4,5 \cdot 10^4 M^{-1}$), relassività (r_1 in siero umano: $27 mM^{-1}s^{-1}$) e tossicità (LD_{50} : $3,6 mmol kg^{-1}$) ed è attualmente in fase IIA di sviluppo clinico come agente di contrasto Mri "blood pool".

Conclusioni

L'impiego di complessi di gadolinio per così dire "generici", come quelli di Figura 1, è ormai una pratica consolidata, largamente diffusa e in continua crescita nella diagnostica clinica. D'altra parte la necessità di diagnosi sempre più specifiche per determinati organi, in particolare per il sistema cardiovascolare, ha già portato oggi giorno alla selezione di prodotti estremamente interessanti, che potrebbero essere a disposizione tra qualche anno. La sfida di domani, cioè l'ottenimento di complessi di gadolinio per l'imaging cellulare, rimane invece, per il momento, aperta.

Bibliografia

- [1] L. Thunus, R. Lejeune, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, **184**, 125.
 [2] D.E. Reichert *et al.*, *ibid.*, 1999, **184**, 3.
 [3] A.E. Merbach, É. Tóth, *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, John Wiley & Sons, Chichester (UK), 2001.
 [4] R.B. Lauffer, *Chem. Rev.*, 1987, **87**, 901.
 [5] P. Caravan *et al.*, *ibid.*, 1999, **99**, 2293.
 [6] A. Bianchi *et al.*, *Coord. Chem. Rev.*, 2000, **204**, 309.
 [7] R.C. Brasch, *Magn. Reson. Med.*, 1991, **22**, 282.
 [8] M.D. Ogan *et al.*, *Invest. Radiol.*, 1987, **22**, 665.
 [9] S. Wang *et al.*, *Radiology*, 1990, **175**, 483.
 [10] G. Schuhmann-Giampieri *et al.*, *Invest. Radiol.*, 1991, **26**, 969.
 [11] D.L. Ladd *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 1999, **10**, 361.
 [12] E.C. Wiener *et al.*, *Magn. Reson. Med.*, 1994, **31**, 1.
 [13] E.C. Unger *et al.*, *J. Magn. Reson. Imag.*, 1993, **3**, 195.
 [14] H. Tournier *et al.*, *Acad. Radiol.*, 2002, **9**(suppl 1), S20.
 [15] P. Caravan *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 3152.
 [16] P.L. Anelli *et al.*, *PCT Int Appl WO 00/30688*, 2000.
 [17] P.L. Anelli *et al.*, *MAGMA* 2001, **12**, 114.
 [18] R.S. Ranganathan *et al.*, *PCT Int Appl WO 95/27705*, 1995.
 [19] P.L. Anelli *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 1999, **10**, 137.
 [20] A. Roda *et al.*, *J. Lipid Res.*, 1982, **23**, 490.
 [21] P.L. Anelli *et al.*, *Acta Radiol.*, 1997, **38**(suppl. 412), 125.
 [22] P.L. Anelli *et al.*, *Synth. Commun.*, 1998, **28**, 109.
 [23] O. Mitsunobu, *Synthesis*, 1981, 1.
 [24] D.L. Hughes, *Org. Prep. Proced. Int.*, 1996, **28**, 127.
 [25] N. Knouzi *et al.*, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1985, 815.
 [26] M.A. Williams, H. Rapoport, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 1151.
 [27] P.L. Anelli *et al.*, *PCT Int. Appl. WO 00 38738*; 2000.