



Luciano Lattuada
Bracco Research Center
Bracco Imaging SpA
luciano.lattuada@bracco.com



VENT'ANNI DI R&D IN BRACCO IMAGING

Bracco Imaging è un'azienda italiana leader mondiale nella produzione e commercializzazione di mezzi di contrasto per imaging diagnostico *in vivo*. Questa piattaforma tecnologica permette di ottenere in breve tempo delle immagini dell'interno di un corpo umano, consentendo al medico di formulare una diagnosi tempestiva ed accurata. Attraverso questo articolo si cercherà di dare, mediante alcuni esempi, una visione dei recenti risultati ottenuti dalla ricerca e sviluppo in ambito chimico in Bracco Imaging.

Introduzione

Con imaging diagnostico *in vivo* si definisce un insieme di tecnologie per ottenere delle immagini degli organi interni di un paziente e dall'analisi di queste fotografie un medico può facilmente formulare in breve tempo un'accurata diagnosi. Le principali tecniche di imaging diagnostico *in vivo* si basano sull'utilizzo dei raggi X (per radiologia tradizionale e tomografia computerizzata), della risonanza magnetica, degli ultrasuoni e delle radiazioni ionizzanti (per la scintigrafia e le tecniche di medicina nucleare) (Fig. 1).



Fig. 1 - Principali tecniche utilizzate per l'imaging diagnostico *in vivo*

Per ampliare la potenzialità di queste tecniche e per migliorare la qualità e la risoluzione delle immagini che si intendono ottenere, spesso si ricorre alla somministrazione al paziente di un composto esogeno comunemente chiamato agente di contrasto. Tale composto è

in grado di interagire alle sollecitazioni fisiche imposte dalla tecnica diagnostica in modo diverso da quanto non facciano gli organi ed i tessuti biologici costituenti il corpo umano, generando, per contrasto, un'immagine dettagliata. Gli agenti di contrasto più comunemente usati sono: il solfato di bario e i composti aromatici triiodurati per i raggi X, i complessi di gadolinio per la risonanza magnetica, le microbolle di gas per gli ultrasuoni e opportuni radioisotopi per la scintigrafia e le tecniche di medicina nucleare (Fig. 1) [1, 2]. Per convenzione si dicono agenti di contrasto le molecole che producono l'effetto contrastografico, mentre i mezzi di contrasto sono le loro soluzioni e formulazioni per uso clinico.

Da più di trent'anni Bracco Imaging produce e commercializza in tutto il mondo mezzi di contrasto per l'imaging diagnostico *in vivo*, come ad esempio Iopamidolo (Schema 1) e Iomeprolo (Schema 2) per i raggi X, Gadoteridolo e Gadobenato dimeglumina per la risonanza magnetica MRI (Fig. 2).

Da un punto di vista storico, la nascita dell'imaging diagnostico *in vivo* coincide con la scoperta dei raggi X da parte di Wilhelm Conrad Röntgen nel 1895, che gli frutterà successivamente il premio Nobel. Immediatamente dopo tale scoperta un nutrito numero di composti inorganici e organici verranno sperimentati come mezzi di contrasto per raggi X ma bisogna aspettare la fine degli anni Settanta per avere

per raggi X ma bisogna aspettare la fine degli anni Settanta per avere

Questo contributo è stato presentato al XXXIV Convegno della Divisione di Chimica Organica della SCI, Pavia, 10-14 settembre 2012.

dei prodotti di seconda generazione veramente sicuri per il paziente: gli agenti di contrasto iodurati non-ionici [3] come, ad esempio, lopamidolo e lomeprolo. Questi agenti di contrasto sono caratterizzati da un'elevatissima solubilità in acqua, da una bassa osmolarità e da un'elevata tollerabilità dovuta anche al fatto che non sono metabolizzati e che sono completamente eliminati per via renale in breve tempo [1, 4]. È stato stimato che nel mondo ogni anno vengono eseguite più di 80 milioni di procedure a raggi X con mezzi di contrasto iodurati, equivalenti ad una produzione annua di circa 5.000 tonnellate [5]. Questi prodotti devono essere inoltre caratterizzati da un'elevata purezza, dato che si arriva ad iniettarne fino a 200 grammi per paziente. In Fig. 3 è riportato un esempio dell'efficacia contrastografica dei mezzi di contrasto iodurati non-ionici: a sinistra abbiamo una foto storica, cioè l'immagine ai raggi X della mano della signora Röntgen, mentre a destra è riportata un'angiografia di una mano ottenuta con mezzo di contrasto. Anche un occhio meno esperto di quello di un radiologo può chiaramente vedere in quest'ultimo caso, oltre alle falangi, anche i vasi sanguigni della mano, molto ben delineati in nero proprio perché il mezzo di contrasto scherma la radiazione X.

Oltre ai raggi X, un'altra tecnica di imaging diagnostico molto importante è la risonanza magnetica (MRI), che negli ultimi anni ha conosciuto una forte espansione, dovuta anche al fatto che è ritenuta una tecnica meno invasiva dal momento che non utilizza radiazioni ionizzanti, bensì un campo magnetico e onde elettromagnetiche di energia pari a quella delle onde radio. Il paziente è infatti posizionato all'interno di un campo magnetico e irradiato con radiofrequenze e le immagini sono ottenute grazie al fenomeno di eccitazione e rilassamento dei protoni dell'acqua, presente in modo pressoché ubiquitario nel nostro corpo. Anche in questo caso la somministrazione di un mezzo di contrasto consente di migliorare la qualità delle immagini e di ampliare lo spettro di applicazione della tecnica diagnostica.

La quasi totalità dei mezzi di contrasto oggi impiegati per risonanza magnetica è costituita da complessi di gadolinio. Questo metallo poco conosciuto, appartenente al gruppo dei lantanidi, possiede sette elettroni spaiati e grazie all'interazione di questi ultimi con i protoni dell'acqua con cui viene a contatto è in grado di farli rilassare molto velocemente migliorando il contrasto nelle immagini di organi e tessuti

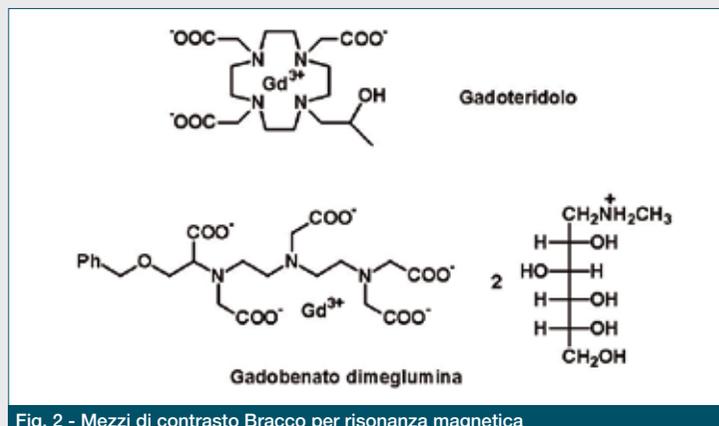
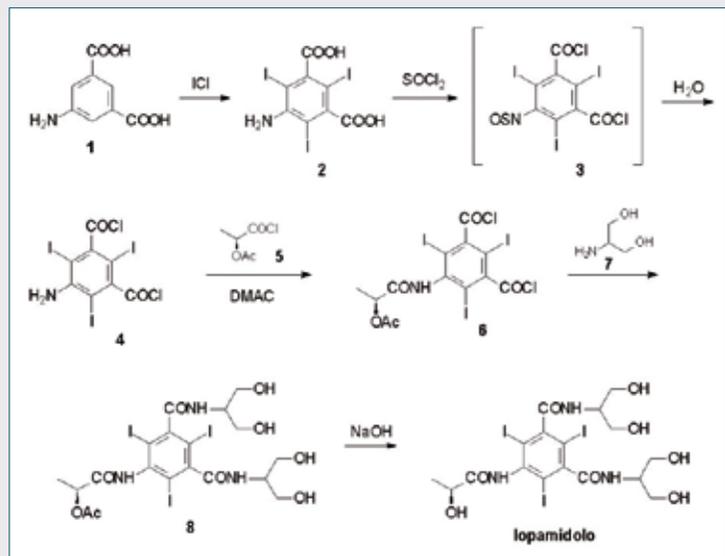
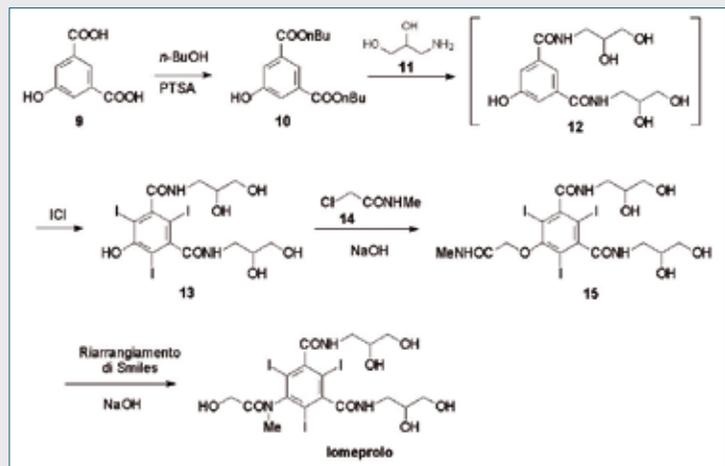


Fig. 2 - Mezzi di contrasto Bracco per risonanza magnetica



Schema 1 - Sintesi industriale di lopamidolo



Schema 2 - Sintesi industriale di lomeprolo

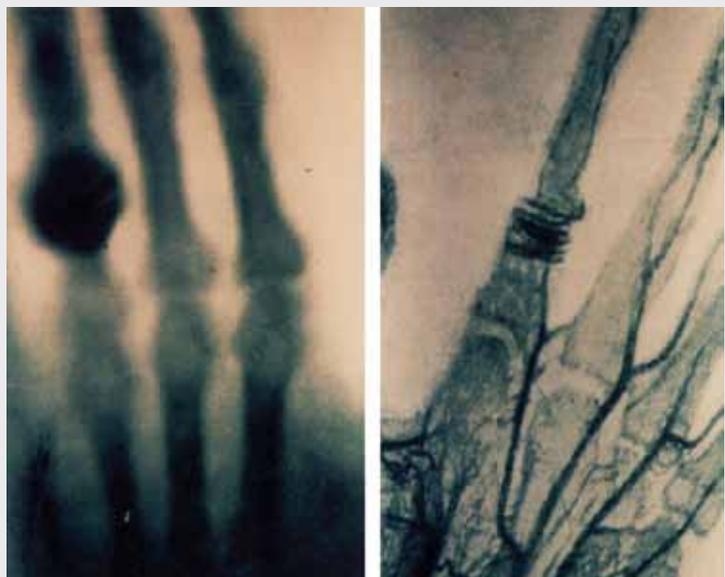


Fig. 3 - A sinistra l'immagine ai raggi X della mano della signora Röntgen; a destra un'angiografia di una mano

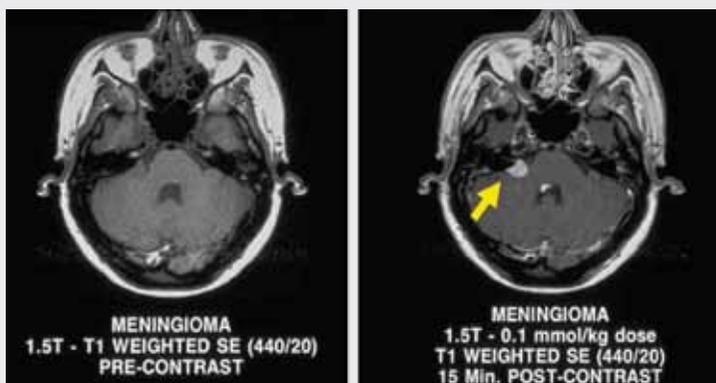
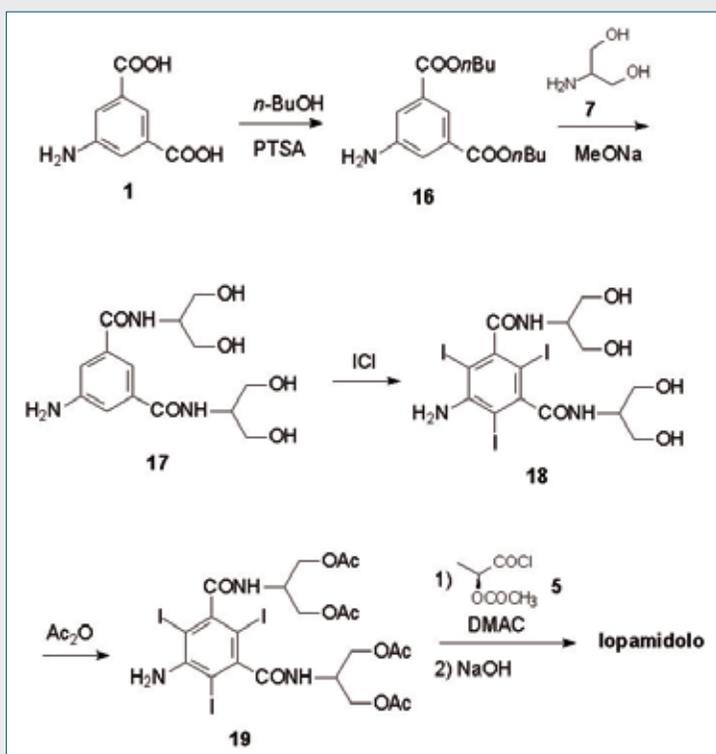
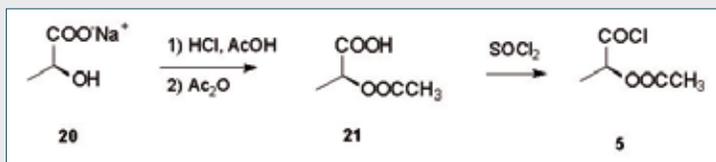


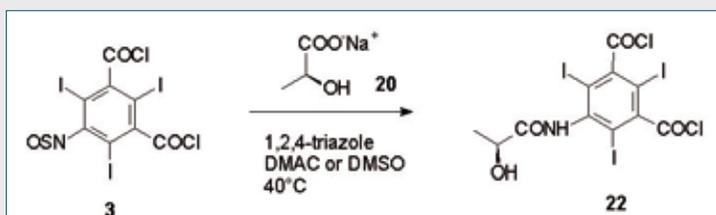
Fig. 4 - A sinistra un'immagine di un cervello umano ottenuta mediante risonanza magnetica senza mezzo di contrasto; a destra l'immagine del medesimo cervello ottenuta 15 minuti dopo la somministrazione di Gadoteridolo che ha permesso di evidenziare la presenza di un tumore cerebrale (freccia gialla)



Schema 3 - Nuova sintesi di lopamidolo



Schema 4 - Sintesi dell'intermedio 5



Schema 5 - Diretto impiego del sulfonil derivato 3 nella sintesi della lattammide 22

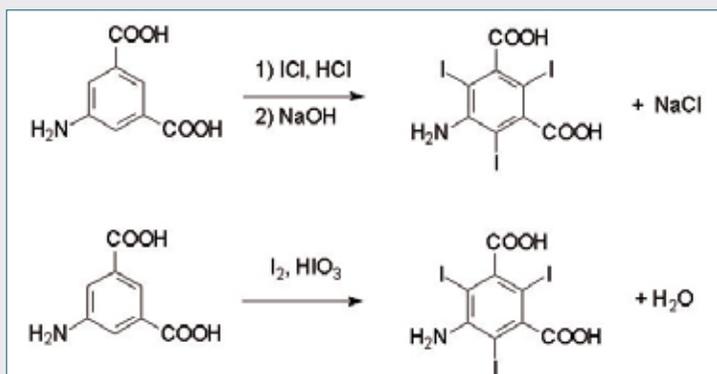
in cui si distribuisce. Lo ione gadolinio è però piuttosto tossico (LD_{50} i.v.=0,26 mmol kg⁻¹ nel ratto per GdCl₃) e per una somministrazione *in vivo* deve essere complessato stabilmente con un opportuno chelante [6]. Il complesso di gadolinio con l'acido dietilentriamminopentaacetico (DTPA) è stato il primo agente di contrasto di questo tipo ad essere approvato, nel 1988, per uso clinico.

Da allora altri prodotti della stessa classe, come appunto Gadoteridolo e Gadobenato dimeglumina, sono stati sviluppati e si contendono un mercato costituito da circa il 30% di tutte le procedure MRI, stimate ad oggi in 50 milioni annue [1, 7]. Un esempio delle prestazioni che si possono ottenere con questi prodotti è mostrato in Fig. 4, dove a sinistra abbiamo un'immagine di una sezione di cervello umano ottenuta senza mezzo di contrasto mentre a destra la medesima immagine registrata 15 minuti dopo la somministrazione di Gadoteridolo (Prohance®): è immediatamente percepibile la presenza di una lesione tumorale in cui l'agente di contrasto, si è distribuito (freccia gialla). Anche i mezzi di contrasto contenenti gadolinio, come i precedenti composti iodurati, non vengono metabolizzati dal corpo umano e sono velocemente eliminati principalmente per via renale.

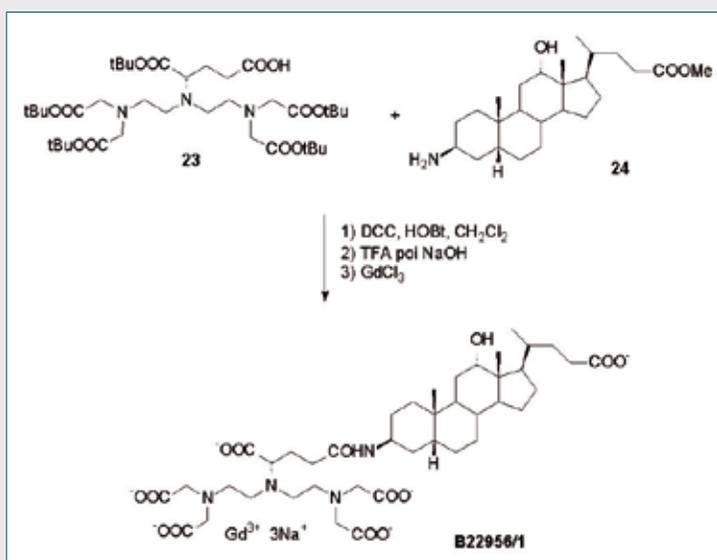
Sviluppo di nuovi processi

Nel settore dei mezzi di contrasto per raggi X negli ultimi vent'anni non ci sono state grandi novità in termini di nuovi prodotti lanciati sul mercato, forse perché con i mezzi di contrasto non-ionici sono state già ottenute le migliori prestazioni che si possano acquisire. L'attività di ricerca svolta recentemente in questo ambito in Bracco Imaging riguarda pertanto principalmente l'ottimizzazione e l'intensificazione degli attuali processi produttivi e lo sviluppo di nuovi processi nell'ottica di una sempre maggiore sicurezza, sostenibilità e minor impatto ambientale.

Il processo industriale di lopamidolo (Schema 1) prevede delle classiche reazioni di chimica organica, tutte con rese superiori all'85%, ma nonostante ciò esso risulta essere piuttosto oneroso, a causa dei numerosi passaggi ed isolamenti degli intermedi. Il processo di lomeprolo (Schema 2) è decisamente più compatto e semplice anche perché in esso sono stati applicati alcuni dei principi di green chemistry [8] ancor prima che diventassero famosi tra la comunità scientifica. Come punti di forza di questo processo basti ricordare che l'unico intermedio isolato è il composto 15 e che i solventi di tutto il processo sono 1-butano, etanolo e acqua, ovvero dei solventi decisamente "green". Applicando una strategia sintetica analoga a quella utilizzata per lomeprolo si è recentemente sviluppato un nuovo processo di sintesi di lopamidolo (Schema 3) [9]. Il principale vantaggio ottenuto è stata la sensibile riduzione, superiore al 70%, dell'impiego di cloruro di tionile, un reagente tossico e corrosivo [10]. Altri vantaggi sono stati la completa eliminazione di solventi costosi (*n*-dodecano) o pericolosi (diglyme) e un più razionale utilizzo dello iodio, che è una materia prima costosa, in quanto la iodurazione è effettuata più a valle nella sintesi. I principali svantaggi sono stati l'introduzione di un ulteriore passaggio sintetico (protezione degli ossidrilici mediante acetilazione) e la non completa eliminazione del cloruro di tionile in quanto esso risulta ancora necessario



Schema 6 - Iodurazione dell'acido 5-amminoisoftalico: metodo classico con ICl (sopra) e nuova iodurazione "green" con iodio e acido iodico (sotto)



Schema 7 - Sintesi di laboratorio di B22956/1

per la sintesi dell'intermedio **5** (Schema 4). Dall'osservazione riportata in letteratura che gli α -idrossiacidi enantiomericamente puri reagiscono con i sulfonil derivati di anilina disattivate [11], è nata l'idea di applicare tale reazione all'intermedio **3**, che di norma non viene mai isolato durante la reazione industriale di lopamidolo. Lo scopo di tale studio era di trovare un'alternativa all'intermedio **5** per l'introduzione dell'acido lattico nella struttura di lopamidolo. Per reazione in dimetilacetammide o dimetilsolfossido di **3** con il sale sodico dell'acido lattico **20** e in presenza di 1,2,4-triazolo si ottiene effettivamente la lattammide corrispondente **22** enantiomericamente pura con rese discrete (40-60%) (Schema 5) [12].

Un altro interessante esempio di sviluppo di processo riguarda la messa a punto di un sistema di iodurazione alternativo al cloruro di iodio. Questo reagente si ottiene in modo estremamente semplice per reazione diretta di iodio con cloro in soluzione di acido cloridrico concentrato. È una reazione ideale, di quelle che tutti i chimici sognano, in quanto avviene con resa quantitativa ed economia atomica completa, dato che i reagenti si convertono a dare il prodotto desiderato senza generare sottoprodotti. Purtroppo il principale problema è legato al cloro che è un gas tossico e la cui produzione, trasporto, stoccaggio e

impiego sono rigidamente regolamentati [13]. Con l'obiettivo di trovare una valida alternativa all'ICl è stato recentemente messo a punto, in collaborazione con il gruppo di ricerca del prof. Citterio del Politecnico di Milano, un processo che utilizza la coppia iodio/acido iodico [14]. Questo nuovo processo di iodurazione è decisamente "green" in quanto non utilizza più cloro, tutto lo iodio impiegato va a iodurare l'anello aromatico e l'unico sottoprodotto che si genera è acqua (Schema 6).

Ricerca di prodotto

Un esempio di ricerca di prodotto è costituito dalla sintesi di **B22956/1** (Schema 7), un mezzo di contrasto per risonanza magnetica specifico per il sistema cardiovascolare. **B22956/1** è un complesso di gadolinio in grado di legarsi fortemente ma reversibilmente all'albumina umana [15] e in tal modo rimane in circolo nel sangue un tempo sufficientemente lungo da poter consentire un'angiografia MRI ovvero l'imaging mediante risonanza magnetica dei vasi sanguigni, in particolare delle coronarie del cuore (Fig. 5).

Tale prodotto è stato pensato e disegnato sulla base dell'osservazione riportata in letteratura che gli acidi biliari sono in grado di interagire fortemente con l'albumina del siero umano [16]. Si è pertanto sintetizzata una serie di acidi 3β -amminocolanoici (ad esempio il derivato dall'acido desossicolico **24**) [17] che sono stati poi coniugati stabilmente mediante un legame ammidico con il legante bifunzionale **23** (Schema 7) [18]. Dallo screening dei prodotti così ottenuti, **B22956/1** è risultato possedere il miglior compromesso tra caratteristiche quali: un elevato binding all'albumina ($K_a=4,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$), bassa tossicità ($LD_{50}=3,6 \text{ mmol kg}^{-1}$) ed elevata relassività (r_1 in siero umano = $27 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$). Come quasi sempre succede con l'ottimizzazione di un pro-

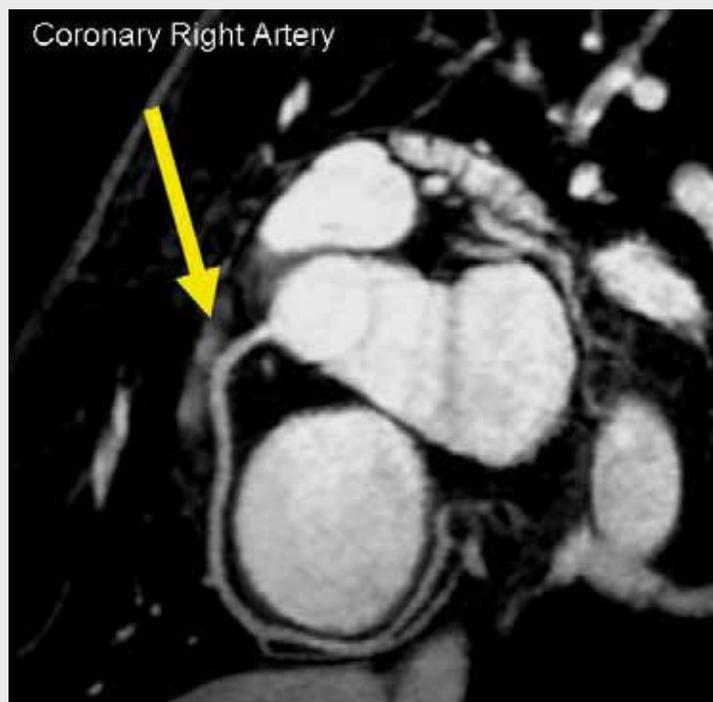
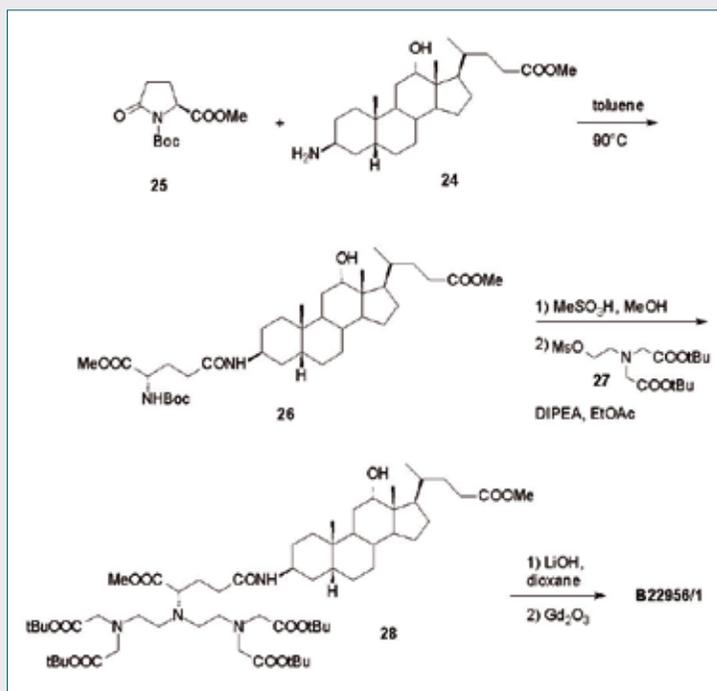


Fig. 5 - Angiografia MRI di un cuore umano ottenuta 25 minuti dopo la somministrazione di B22956/1: è molto ben visibile la coronaria destra (freccia gialla)



Schema 8 - Sintesi ottimizzata di B22956/1

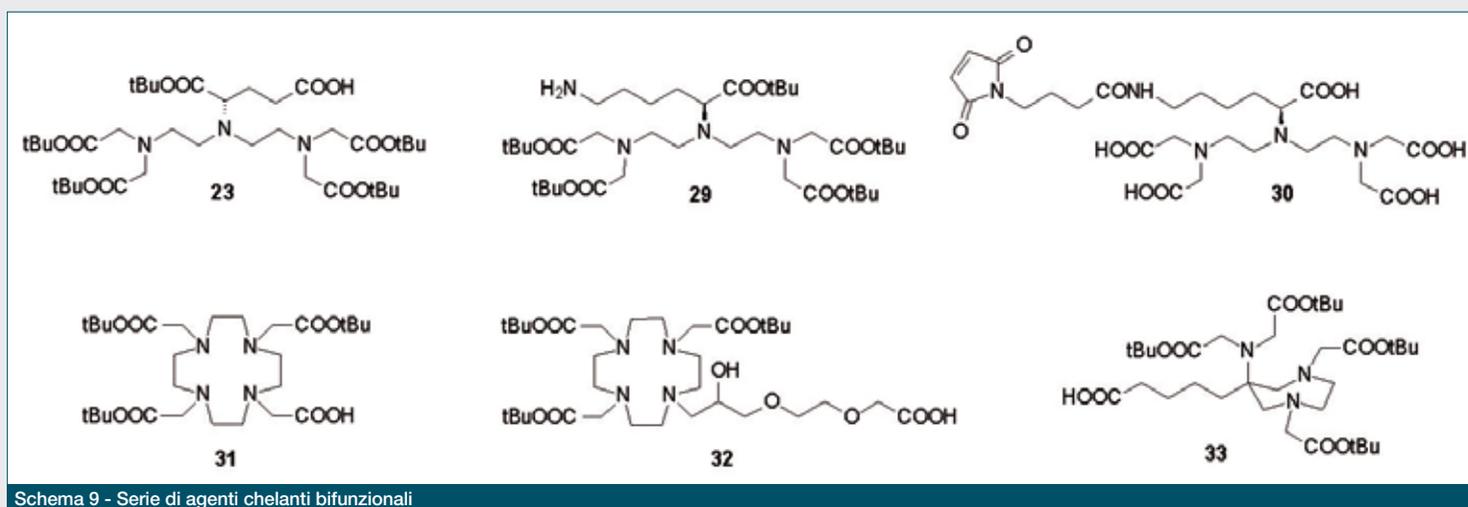
cesso, lo scale-up di **B22956/1** (Schema 8) ha portato ad un completo stravolgimento della sintesi iniziale con l'obiettivo di massimizzare le rese, eliminare reagenti e solventi tossici e razionalizzare i costi [19]. Sebbene l'intermedio **23** non sia stato utilizzato nella sintesi ottimizzata di **B22956/1**, esso si è rivelato estremamente utile e versatile in quanto può essere facilmente coniugato ad un qualsiasi altro tipo di molecola che possa conferire una particolare caratteristica chimico-fisica. Ad esempio, **23** è stato coniugato anche a derivati dell'acido colico e taurocolico ottenendo dei mezzi di contrasto MRI epatospecifici [20].

Seguendo questa strategia, oltre all'intermedio **23**, è stata sintetizzata tutta una serie di prodotti analoghi (Schema 9) che vengono definiti come agenti chelanti bifunzionali [21]. Gli agenti chelanti bifunzionali sono dei composti che possiedono, appunto, due funzioni: un legante

in grado di coordinare uno ione metallico e un gruppo reattivo capace di formare un legame stabile con un'altra molecola. Dalla scelta opportuna di tale molecola, ad esempio un peptide o un anticorpo monoclonale, si può realizzare un prodotto molto affine e specifico per determinati tipi di cellule tumorali mentre al variare dello ione metallico si può ottenere un prodotto per diagnosi o per terapia. Abbiamo già visto che coordinando lo ione Gd^{3+} si ottengono degli agenti di contrasto per risonanza magnetica, mentre coordinando un metallo che emette radiazioni gamma, come ad esempio ^{111}In , o un emettitore di positroni, come ad esempio ^{68}Ga , si può ottenere rispettivamente un mezzo di contrasto per scintigrafia SPECT (single photon emission computed tomography) o per PET (positron emission tomography) [22]. Coordinando invece uno ione emettitore di particelle β (ad esempio ^{90}Y o ^{177}Lu) o particelle α (^{212}Bi , ^{225}Ac) è possibile sintetizzare dei radiofarmaci utilizzabili nella terapia dei tumori [23].

La reazione di coniugazione di un agente chelante bifunzionale ad un'altra molecola può essere condotta classicamente in fase omogenea, come nel caso del composto **29**, che è stato fatto reagire con colesteril cloroformiato a dare un complesso di gadolinio lipofilo in grado di essere incorporato stabilmente in sistemi supramolecolari di tipo micellare [24]. Sempre in fase omogenea i derivati **23**, **32** e **33** sono stati coniugati ad un peptidomimetico ciclico contenente la sequenza RGD (Arg-Gly-Asp), ottenendo, dopo rispettiva complessazione con Gd^{3+} e $^{68}Ga^{3+}$, dei potenziali mezzi di contrasto MRI/PET selettivi per visualizzare le cellule endoteliali che sovraesprimono le integrine $\alpha_v\beta_3$ [25], coinvolte nei processi di angiogenesi correlati alla crescita tumorale.

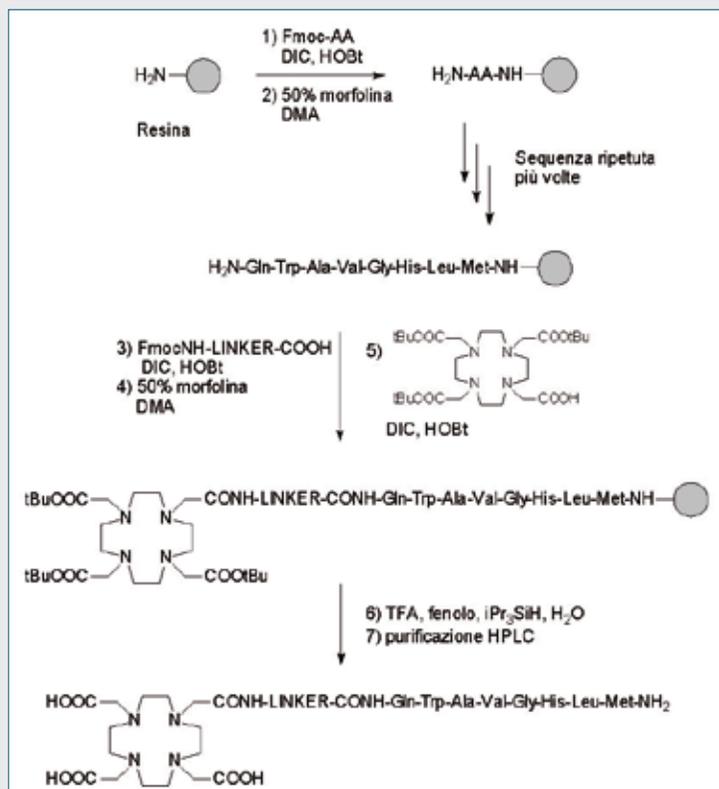
Nel caso di coniugazione a peptidi una strategia molto più vantaggiosa è quella di costruire su fase solida il peptide e, sempre su fase solida, coniugare il chelante bifunzionale di scelta all'ammino gruppo terminale o a quello di una lisina laterale (Schema 10) [26]. Questa tecnica è stata sperimentata con successo per la coniugazione di **23** con il peptide CCK8 [27], di **31** con un derivato della bombesina [28] e di **23** e **31** con un analogo dell'ossitocina [29]. Tutti questi derivati, una volta complessati con un opportuno radiometallo, sono stati stu-



Schema 9 - Serie di agenti chelanti bifunzionali

diati come prodotti per l'imaging diagnostico o per la terapia mirata e selettiva di tumori e metastasi.

Ringraziamenti: Un doveroso ringraziamento va a tutti i colleghi e i collaboratori che hanno contribuito al raggiungimento dei risultati qui riportati e di molti altri (Fig. 6).



Schema 10 - Sintesi peptidica su fase solida di un DOTA coniugato ad un derivato della bombesina mediante strategia Fmoc



Fig. 6

Bibliografia

- [1] P. Dawson, D.O. Cosgrove, R.G. Grainger, Textbook of Contrast Media, Isis Medical Media Ltd., Oxford, 1999.
- [2] M. Braddock, Biomedical Imaging. The Chemistry of Labels, Probes and Contrast Agents, RSC Publishing, Cambridge, 2012.
- [3] M. Sovak, *Eur. Radiol.*, 1995, **5**, S3.
- [4] M. Sovak, Radiocontrast agents, Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 73, Springer-Verlag, Berlin, 1984.
- [5] R. Dusaj *et al.*, *Interventional Cardiol.*, 2009, **4**, 22.
- [6] R.B. Lauffer, *Chem. Rev.*, 1987, **87**, 901
- [7] a) A.E. Merbach *et al.*, The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging, John Wiley & Sons, Chichester, 2001; b) P. Caravan *et al.*, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2293.
- [8] P. Anastas *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 301.
- [9] P.L. Anelli *et al.*, *Pure Appl. Chem.*, 2012, **84**, 485.
- [10] E.D. Weil *et al.*, Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Vol. 23, pp. 25-28, John Wiley, 2006.
- [11] a) R. Chidambaram *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 2000, **41**, 6017; b) R. Chidambaram *et al.*, *Org. Process Res. Dev.* 2002, **6**, 632.
- [12] P.L. Anelli *et al.*, *PCT Int. Appl.* WO2010/105983.
- [13] a) P. Schmittinger *et al.*, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. 8, pp. 532-621, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2012; b) T.V. Bommaraju *et al.*, Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Vol. 6, pp.130-211, John Wiley, 2002.
- [14] A. Citterio *et al.*, *PCT Int. Appl.* WO2010/121904.
- [15] C. de Haën *et al.*, *Invest. Radiol.*, 2006, **41**, 279.
- [16] A. Roda *et al.*, *J. Lipid Res.*, 1982, **23**, 490.
- [17] P.L. Anelli *et al.*, *Synth. Commun.*, 1998, **28**, 109.
- [18] P.L. Anelli *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 1999, **10**, 137.
- [19] P.L. Anelli *et al.*, *Org. Process Res. Dev.*, 2009, **13**, 739.
- [20] P.L. Anelli *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 3629.
- [21] L. Lattuada *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 3019.
- [22] a) S. Liu, *Adv. Drug Del. Rev.*, 2008, **60**, 1347; b) S. Liu, *Chem. Soc. Rev.*, 2004, **33**, 445.
- [23] W.A. Volkert *et al.*, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2269.
- [24] L. Lattuada *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 3893.
- [25] L. Manzoni *et al.*, *ChemMedChem*, 2012, **7**, 1084.
- [26] G. Dirscherl *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.*, 2008, 597.
- [27] L. Aloj *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 2004, **45**, 485.
- [28] L.E. Lantry *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 2006, **47**, 1144.
- [29] L. Lattuada *et al.*, *Lett. Org. Chem.*, 2009, **6**, 624.

ABSTRACT

R&D in Bracco Imaging: Recent Achievements

Bracco Imaging, a private-capital Italian company, is a worldwide leader in the production and marketing of contrast media for *in vivo* diagnostic imaging. The use of contrast agents in combination with the suitable diagnostic technique allows to generate images of the inside of a human body that lead to a fast and accurate diagnosis. In this article, several examples of chemical research and development performed recently in Bracco Imaging will be presented.