

Communication brève

# Synthèse et caractérisation du Gd-C<sub>4</sub>-thyroxin-DTPA, un nouvel agent de contraste potentiel pour l'IRM. Étude de son interaction non covalente avec l'albumine sérique humaine

## *Synthesis and characterization of Gd-C<sub>4</sub>-thyroxin-DTPA, a potential new MRI contrast agent. Study of its non covalent interaction with human serum albumin*

C. Henoumont, L. Vander Elst, S. Laurent, R.N. Muller\*

Laboratoire de RMN et d'imagerie moléculaire, département de chimie générale, organique et biomédicale, université de Mons,  
24, avenue du Champ-de-Mars, 7000 Mons, Belgique

Reçu le 15 avril 2009 ; accepté le 19 mai 2009  
Disponible sur Internet le 3 septembre 2009

---

### Résumé

La synthèse et la caractérisation physicochimique d'un nouvel agent de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM), le Gd-C<sub>4</sub>-thyroxin-DTPA, présentant une affinité élevée pour l'albumine sérique humaine (HSA) sont rapportées. Les résultats montrent que ce chélate de gadolinium est caractérisé par une relaxivité assez élevée, qui de plus augmente avec la concentration, cela reflétant une agrégation des molécules en solution. Il est également caractérisé par une meilleure stabilité vis-à-vis de la transmétallation avec le zinc que le dérivé parent, le Gd-DTPA (Magnevist®, Bayer Schering Pharma). L'étude de son interaction avec la HSA a été réalisée par la technique de relaxométrie protonique, qui a révélé une affinité assez élevée ( $K_a$  de l'ordre de  $10\,000\text{ M}^{-1}$ , avec deux sites de liaison). Enfin, des expériences de compétition avec l'ibuprofène et le salicylate, dont les sites de liaison sur la HSA sont connus, ont été réalisées par diffusométrie résonance magnétique nucléaire (RMN). Les résultats suggèrent que ce chélate partage un des sites de liaison de l'ibuprofène.

© 2009 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

*Mots clés* : Agent de contraste ; Albumine sérique humaine ; Résonance magnétique nucléaire

### Abstract

The synthesis and the physicochemical characterization of a new contrast agent for magnetic resonance imaging (MRI), Gd-C<sub>4</sub>-thyroxin-DTPA, which has a high affinity for human serum albumin (HSA), are reported. The results show that this chelate is characterized by a relatively high relaxivity, which increases moreover with the concentration. This reflects an aggregation of the molecules in solution. It is also characterized by a better stability versus the transmetallation with the zinc ion than the parent compound, the Gd-DTPA (Magnevist®, Bayer Schering Pharma). The study of its interaction with human serum albumin was performed by the proton relaxometry technique, which has revealed a relatively high affinity ( $K_a$  of the order of  $10,000\text{ M}^{-1}$ , with two binding sites). Finally, competition experiments with ibuprofen and salicylate, of which the binding sites on HSA are known, were performed by the NMR diffusometry method. The results suggest that the chelate shares one of the binding sites of ibuprofen.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

*Keywords*: Contrast agent; Human serum albumin; Nuclear magnetic resonance

---

## 1. Introduction

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est un outil de diagnostic important dans le milieu médical grâce à sa résolution spatiale et temporelle élevée. Cependant, le contraste intrinsèque d'une image IRM ne suffit pas pour la détection de certaines

---

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : robert.muller@umons.ac.be (R.N. Muller).

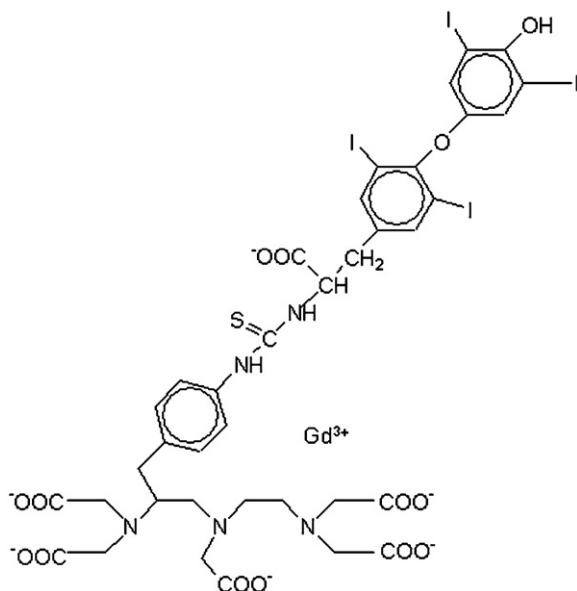


Fig. 1. Structure chimique du Gd-C<sub>4</sub>-thyroxin-DTPA.

pathologies, ce qui contraint les radiologues à utiliser des agents de contraste dans ~35 % des examens réalisés. Ceux-ci sont principalement des complexes de gadolinium, caractérisés par une efficacité assez moyenne. Leur relaxivité ( $r_1$ ), qui peut être définie comme l'augmentation de la vitesse de relaxation longitudinale des protons de l'eau induite par une millimole par litre d'agent de contraste, est en effet de l'ordre de  $4 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  à  $37^\circ \text{C}$  et  $0,47 \text{ T}$ . Le challenge des chimistes consiste donc à élaborer des molécules plus efficaces, c'est-à-dire présentant une relaxivité plus élevée, en synthétisant par exemple des molécules présentant une affinité élevée pour une macromolécule endogène comme l'albumine sérique humaine (HSA).

La synthèse et la caractérisation physicochimique d'un nouvel agent de contraste (Fig. 1) présentant une affinité élevée pour la HSA sont rapportées. L'étude de son interaction avec la HSA est réalisée par les techniques de relaxométrie protonique [1] et diffusométrie résonance magnétique nucléaire (RMN) [2].

## 2. Matériels et méthodes

Le C<sub>4</sub>-thyroxin-DTPA est synthétisé par réaction entre le DTPA-isothiocyanate (Macrocylics, Dallas, États-Unis) et la fonction amine de la thyroxine (Sigma, Bornem, Belgique) (Fig. 2). Le ligand est ensuite complexé avec du gadolinium pour

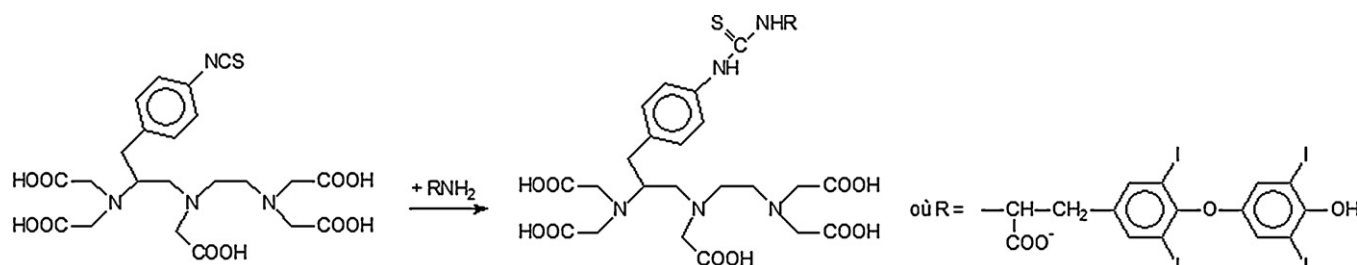


Fig. 2. Synthèse du C<sub>4</sub>-thyroxin-DTPA.

les mesures par relaxométrie protonique et avec de l'euporium pour les mesures par diffusométrie RMN [3].

Les profils de dispersion relaxométrique (profils NMRD) sont enregistrés sur un relaxomètre à champ cyclé (Stelar, Mede, Italie) travaillant entre  $0,24 \text{ mT}$  et  $0,24 \text{ T}$ . Les vitesses de relaxation à  $0,47 \text{ T}$ ;  $1,41 \text{ T}$ ;  $7,05 \text{ T}$  et  $11,75 \text{ T}$  sont mesurées sur des Minispec mq-20 et mq-60 (Bruker, Karlsruhe, Allemagne) et sur des spectromètres haute résolution AMX300 et AvanceII-500 (Bruker). Les fréquences de Larmor correspondantes pour le proton s'obtiennent suivant l'équation 1 :

$$\nu(\text{MHz}) = 42,57 \times B_0(T) \quad (1)$$

Ces mesures ont été réalisées sur des solutions du complexe de gadolinium de différentes concentrations :  $0,5 \text{ mM}$ ;  $0,8 \text{ mM}$ ;  $1,2 \text{ mM}$  et  $1,65 \text{ mM}$ .

Les mesures de transmétallation avec le zinc ont été réalisées à  $310 \text{ K}$  et  $0,47 \text{ T}$  sur un Minispec mq-20 (Bruker). La concentration en complexe de gadolinium et en ions  $\text{Zn}^{2+}$  est de  $2,5 \text{ mM}$ , dans un tampon phosphate ( $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 0,026 \text{ mol/L}$  et  $[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 0,041 \text{ mol/L}$ ). Cette expérience est réalisée en présence d'ions phosphates car ils forment un sel insoluble avec les ions gadolinium. Pendant le processus de transmétallation avec le zinc, le gadolinium ainsi relâché précipite avec les ions phosphates et ne participe de ce fait plus à la vitesse de relaxation des protons de l'eau. La vitesse de relaxation des protons de l'eau diminue donc au cours du temps [4].

Les mesures par la technique de relaxométrie protonique sont réalisées à  $0,47 \text{ T}$  sur un Minispec mq-20, à une température de  $310 \text{ K}$ . Cette méthode consiste à mesurer la vitesse de relaxation des protons de l'eau dans différentes solutions contenant des concentrations croissantes en agent de contraste et une concentration fixe et égale à 4 % en HSA. L'utilisation d'un modèle où tous les sites sont considérés comme étant indépendants et équivalents permet d'estimer la constante d'association et le nombre de sites de liaison [1,5,6].

Les expériences de compétition avec l'ibuprofène et avec le salicylate ont été réalisées par diffusométrie RMN. Dans ces expériences, le coefficient de diffusion de l'ibuprofène ( $10 \text{ mM}$ ) et du salicylate ( $10 \text{ mM}$ ) est mesuré en présence du complexe d'euporium ( $2 \text{ mM}$ ) et de HSA 4 %. Ces mesures sont réalisées sur un spectromètre Avance-200 (Bruker) opérant à  $200 \text{ MHz}$ . La séquence utilisée est la séquence spin-écho à gradients de champ magnétique pulsés (PGSE) avec des valeurs de  $\delta$  et  $\Delta$  de  $1$  et  $4 \text{ ms}$  respectivement. La température est maintenue à  $310 \text{ K}$

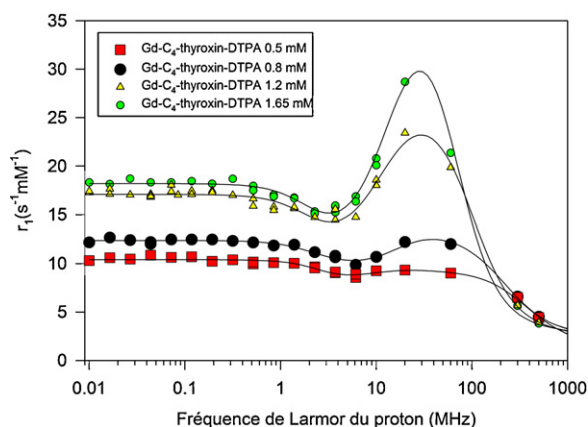


Fig. 3. Profils NMRD du Gd-C<sub>4</sub>-thyroxin-DTPA à différentes concentrations (T = 310 K).  $r_1$  est la relaxivité longitudinale, qui correspond à l'augmentation de la vitesse de relaxation des protons de l'eau induite par 1 mmol par litre de complexe de gadolinium.

par circulation d'eau dans les bobines de gradient (bain d'eau HAAKE UWK 45).

### 3. Résultats

Le Gd-C<sub>4</sub>-thyroxin-DTPA a tout d'abord été caractérisé en solution aqueuse par le relevé de son profil NMRD sur des solutions de concentrations différentes. Ceux-ci présentent un maximum de plus en plus marqué entre 20 et 60 MHz (c'est-à-dire entre 0,47 et 1,41 T) lorsque la concentration en agent de contraste augmente (Fig. 3).

Sa stabilité cinétique a également été vérifiée par une mesure de la transmétallation avec le zinc. L'ion zinc (II) est en effet l'ion sanguin le plus susceptible de s'échanger avec l'ion gadolinium du fait de la similarité de leur rayon ionique. Les résultats obtenus montrent une stabilité accrue par rapport au composé parent, le Gd-DTPA : après 100 heures, une diminution de 30 % de la vitesse de relaxation des protons de l'eau est observée, alors qu'une diminution de près de 45 % de la vitesse de relaxation des protons de l'eau a été préalablement observée dans le cas du Gd-DTPA.

L'affinité pour la HSA du Gd-C<sub>4</sub>-thyroxin-DTPA a été évaluée par la technique de relaxométrie protonique (Fig. 4). Une constante d'association de l'ordre de 10 000 M<sup>-1</sup> avec deux sites de liaison a été obtenue.

Des expériences de compétition avec l'ibuprofène (dont le site de liaison principal sur la HSA est le site Suddlow II) et avec le salicylate (dont le site de liaison principal est le site Suddlow I) ont été réalisées par diffusométrie RMN afin d'évaluer le site de liaison du Gd-C<sub>4</sub>-thyroxin-DTPA sur la HSA (Fig. 5). Les résultats montrent que la présence du chélate d'europium augmente fortement le coefficient de diffusion de l'ibuprofène mais n'a pas d'effet sur le coefficient de diffusion du salicylate.

### 4. Discussion et conclusion

Les profils NMRD relevés en solution aqueuse montrent un maximum à haut champ qui est d'autant plus prononcé que la

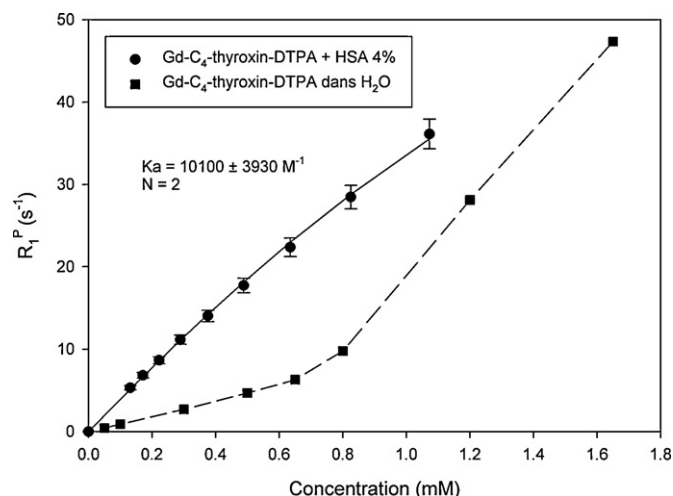


Fig. 4. Évolution de la vitesse de relaxation des protons de l'eau en présence de concentrations variables en agent de contraste et d'une concentration de 0,6 mM en HSA (T = 310 K, B<sub>0</sub> = 0,47 T).

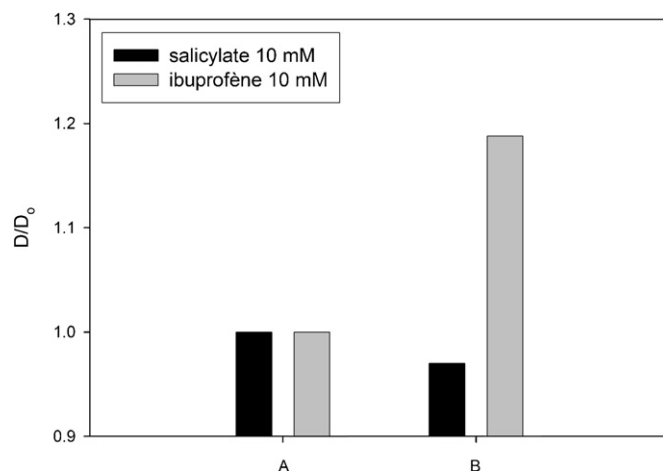


Fig. 5. Expériences de compétition avec l'ibuprofène et le salicylate. A correspond aux coefficients de diffusion de chaque compétiteur dans une solution de HSA 4 %, normalisés à 1. B correspond aux coefficients de diffusion des compétiteurs en présence de HSA 4 % et d'Eu-C<sub>4</sub>-thyroxin-DTPA 2 mM.

concentration en chélate de gadolinium est élevée. Cela reflète une agrégation des molécules en solution lorsque la concentration augmente (probablement par  $\pi$ -stacking entre les parties aromatiques).

Les données obtenues par relaxométrie protonique ( $K_a = 10\,000\text{ M}^{-1}$ ,  $N = 2$ ) reflètent une affinité relativement élevée du chélate pour la HSA et les expériences de compétition suggèrent qu'il partage un des sites de liaison de l'ibuprofène.

Le Gd-C<sub>4</sub>-thyroxin-DTPA est caractérisé par une relaxivité élevée et par une affinité assez élevée pour la HSA. Il apparaît donc comme un nouvel agent de contraste potentiel pour l'IRM, particulièrement aux champs magnétiques compris entre 0,47 et 1,41 T où l'effet de la liaison à la HSA est le plus marqué. Les séquences utilisées en IRM devront être des séquences pondérées en T<sub>1</sub> étant donné l'effet plus marqué des chélate de gadolinium sur le temps de relaxation longitudinale des protons de l'eau. Cependant, aux champs magnétiques supérieurs

à 1 T, des séquences pondérées en  $T_2$  pourront également être appliquées.

En outre, le Gd-C<sub>4</sub>-thyroxin-DTPA est caractérisé par une bonne stabilité vis-à-vis de la transmétallation avec le zinc, ce qui devrait se traduire par l'absence de toxicité de ce chélateur lors de son utilisation in vivo. Des études plus approfondies de toxicité sont envisagées.

## 5. Conflits d'intérêts

Aucun.

## Références

- [1] Muller RN, Radüchel B, Laurent S, Platzek J, Piérart C, Mareski P, et al. Physicochemical characterization of MS-325, a new gadolinium complex, by multinuclear relaxometry. *Eur J Inorg Chem* 1999;1949–55.
- [2] Lucas LH, Larive CK. Measuring ligand-protein binding using NMR diffusion experiments. *Concepts Magn Res* 2004;20A(1):24–41 [Part A].
- [3] Henoumont C, Vander Elst L, Laurent S, Muller RN. Study of non-covalent interactions between MRI contrast agents and human serum albumin by NMR diffusometry. *J Biol Inorg Chem* 2009;14:683–691.
- [4] Laurent S, Vander Elst L, Copoix F, Muller RN. Stability of MRI paramagnetic contrast media: a proton relaxometric protocol for transmetallation assessment. *Invest Radiol* 2001;36:115–22.
- [5] Vander Elst L, Chapelle F, Laurent S, Muller RN. Stereospecific binding of MRI contrast agents to human serum albumin: the case of Gd-(S)-EOB-DTPA (Eovist) and its (R) isomer. *J Biol Inorg Chem* 2001;6:196–200.
- [6] Henoumont C, Henrotte V, Laurent S, Vander Elst L, Muller RN. Synthesis of a new gadolinium complex with a high affinity for human serum albumin and its manifold physicochemical characterization by proton relaxation rate analysis. NMR diffusometry and electrospray mass spectrometry. *J Inorg Biochem* 2008;102:721–30.