



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Scienze Chimiche
Corso di Laurea Magistrale in Chimica

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

Nanostrutture per tecniche di imaging multiple: sintesi di strutture per MRI e SERS

Relatore: *Prof. Moreno Meneghetti*
Correlatore: *Prof.ssa Marina Gobbo*
Controrelatore: *Prof. Maurizio Casarin*

Laureando: *Niccolò Rivato*

ANNO ACCADEMICO 2014 - 2015

“Beh, la verità ha un suo modo di cambiare ogni giorno, ogni secondo. Si resta attaccati al proprio stile e la verità cambia intorno a noi. Se hai stile hai il tuo metodo che continua mentre tutte le cose vacillano. Mi segui? ”

Charles Bukowski

Indice

Abbreviazioni	vi
1 Imaging	1
1.1 Principali tecniche di imaging	2
1.2 Magnetic Resonance Imaging	5
1.2.1 MRI con agenti di contrasto	5
1.2.1.1 Agenti di contrasto T_1	7
1.2.1.2 Agenti di contrasto T_2	9
1.2.1.3 Struttura e biocompatibilità di complessi DOTA-Gd	11
1.2.2 Coniugazione di agenti di contrasto a macrostrutture	13
1.2.2.1 Coniugazione via click-chemistry	16
1.2.3 Targeting con agenti di contrasto	20
2 Imaging con nanoparticelle	23
2.1 Funzionalizzazione di NPs con PEG	24
2.2 Nanoparticelle di oro	25
2.2.1 Sintesi di AuNPs	25
2.2.2 Risonanza plasmonica di superficie localizzata	27
2.2.3 Raman scattering e SERS	29
2.2.4 AuNPs per MRI	30
3 Scopo della tesi	34
4 Risultati e Discussioni	37
4.1 Sintesi su fase solida del polimero funzionalizzato	41
4.1.1 Analisi NMR del polimero sintetizzato	44
4.2 Sintesi di DOTA-DBCO	48
4.3 Complessazione del macrociclo DOTA con Gd^{3+}	49
4.4 Attacco del complesso di Gd^{3+} al polimero tramite cicloadizione di Huisgen	55
4.5 Analisi MRI	57
5 Conclusioni	59
6 Protocolli sperimentali	61
6.1 Strumenti e tecniche di caratterizzazione	61

Indice

6.2	Sintesi e aggregazione di AuNPs	63
6.3	Sintesi del polimero 7c	65
6.4	Sintesi di DOTA-DBCO	70
6.5	Complessazione del DOTA-DBCO con Gd ³⁺	72
6.6	Attacco del complesso di Gd ³⁺ al polimero tramite cicloadizione di Huisgen	73
6.6.1	Prova di funzionalizzazione del polimero 7c con DOTA-DBCO . . .	74
6.7	Analisi MRI del sistema SuperDOTA	75
6.8	Analisi MRI del sistema AuNPs-SuperDOTA	76
Appendice A. Principali tecniche di imaging		77
Appendice B. Teoria dell'MRI		80
Appendice C. Spettri e cromatogrammi		88
 Bibliografia		 113

Abbreviazioni

AuNPs	Gold Nanoparticles
COSY	Correlation Spectroscopy
CT	Computed Tomography
DBCO	Dibenzocyclooctyne-N-hydroxysuccinimidyl ester
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamine
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-Tetraacetic Acid
DTPA	Diethylene Triamine Pentaacetic Acid
EG	Ethylene Glycol
ESI-MS	Electron Spray Ionization Mass Spectrometry
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation Spectroscopy
HOBt	N-Hydroxybenzotriazole
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation Spectroscopy
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
LASIS	Laser Ablation Synthesis In Solvents
LSP	Localized Surface Plasmon
LSPR	Localized Surface Plasmon Resonance
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MRI	Magnetic Resonance Imaging
NHS	N-Hydroxysuccinimide
NIR	Near InfraRed
NIRF	Near Infrared Fluorescence
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NPs	Nanoparticles
PEG	Poly Ethylene Glycol
scFv	Single-Chain Variable Fragment
PET	Positron Emission Tomography
SERS	Surface Enhanced Raman Scattering
SERRS	Surface Enhanced Resonance Raman Scattering

SPECT	Single Photon Emission Tomography
TFA	Trifluoroacetic Acid
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
US	Ultrasound

1. Imaging

Lo scopo principale di una tecnica di *imaging*, nel campo biomedico, è di fornire una mappa per visualizzare gli organi interni di un corpo per identificare irregolarità anatomiche e fisiologiche. Per raggiungere questo obiettivo è necessario creare delle differenze di contrasto. Ci sono diverse modalità per creare questo contrasto, ed esistono quindi diverse tecniche, ognuna indirizzata all'analisi di determinate strutture. La possibilità di identificare nelle immagini un numero sempre maggiore di particolari consente di migliorare le diagnosi. Si capisce quindi l'importanza di ottenere delle immagini che consentano non solo di visualizzare delle anomalie, ma che possibilmente siano anche, sicure ed affidabili.^[1] L'*imaging* consente diagnosi precoci, e quindi maggiori possibilità di trattamento delle patologie. Sviluppi futuri di queste tecniche sono il trattamento pre-sintomatico, la terapia mirata mediante *targeting* e la riduzione di invasività.^[2] Le tecniche di *imaging*, descritte brevemente nel seguito, richiedono molte volte degli agenti di contrasto e il presente lavoro di tesi è rivolto alla sintesi di un sistema nanostrutturato per *multiimaging*, cioè utile per più tecniche di *imaging* diverse e complementari. La tecnica già sviluppata nel laboratorio ospitante è quella che usa segnali SERS (*Surface Enhanced Raman Scattering*) sfruttando le proprietà di particelle plasmoniche. Queste nanostrutture sono poi usualmente funzionalizzate con agenti per *targeting* come gli anticorpi o le loro parti attive (scFv). Il progetto qui sviluppato è quello di sintetizzare molecole per altre funzionalizzazioni del sistema plasmonico che così acquisirà funzioni di contrasto anche per un'altra tecnica come l'MRI (*Magnetic Resonance Imaging*), ma che potrebbero essere utili anche per altre tecniche basate sull'emissione di particelle come per esempio la PET (*Positron Emission Tomography*).

1. *Imaging*

1.1 Principali tecniche di imaging

La maggior parte delle tecniche di *imaging* sono basate sull'interazione di radiazione elettromagnetica con tessuti e fluidi del corpo. Gli ultrasuoni sono un'eccezione, poiché basati su riflessione, *scattering* e *shift* della frequenza di onde acustiche. Le frequenze associate alle radiazioni elettromagnetiche delle principali tecniche sono mostrate in Figura 1.1. Le radiazioni ad elevata frequenza (raggi γ , raggi-X o luce ultravioletta), sono definite ionizzanti e possono quindi causare danni all'organismo. Particolari attenzioni all'esposizione di queste radiazioni ionizzanti sono poste nel caso di *imaging* pediatrico. Al lato opposto dello spettro ci sono invece tecniche che utilizzano radiazioni a basse frequenze (non ionizzanti), come la tecnica MRI, che non comportano rischi dovuti all'esposizione.^[3]

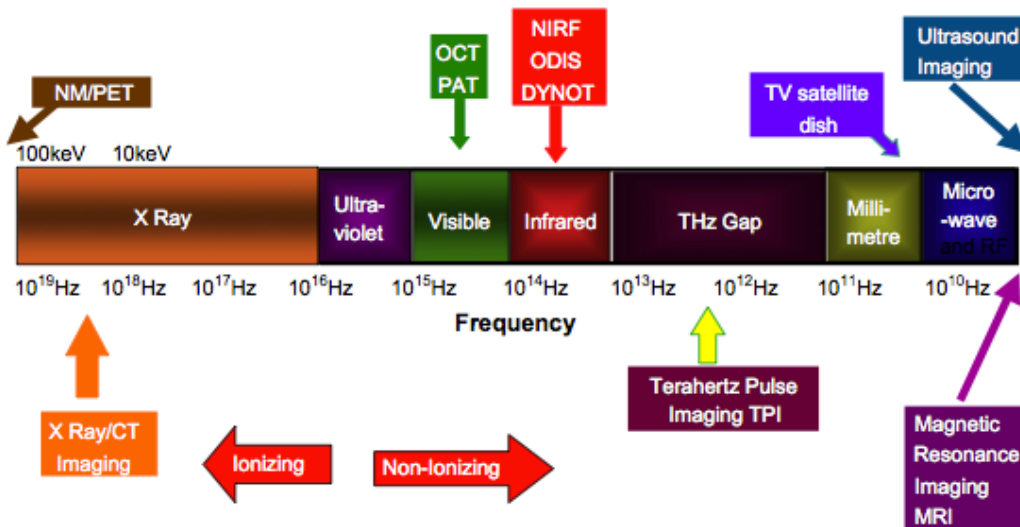


Figura 1.1: Frequenze delle radiazioni elettromagnetiche utilizzate nelle principali tecniche di imaging. PET: Positron Emission Tomography, NIRF: Near Infrared Fluorescence, OCT: Optical Coherence Tomography, PAT: Photoacoustic Tomography, DYNOT: Dynamic Optical Tomography, CT: Computed Tomography.

La specificità, la sensibilità e altre caratteristiche dei vari strumenti impiegati per le diverse tecniche, sono determinate da come operano. Tuttavia, esse hanno in comune l'obiettivo di registrare segnali che attraversano o vengono riflessi oppure di raccogliere segnali emessi da sonde introdotte con questo fine.^[1] Ogni tecnica ha i suoi vantaggi e svantaggi (Tabella 1.1 - 1.2). I raggi-X sono economici, veloci e di facile utilizzo, ma presentano bassa risoluzione e sensibilità. La CT (*Computed Tomography*) ha una risoluzione migliore ma non sempre sufficiente (soprattutto nel caso di tessuti molli) e mantiene una bassa sensibilità. La fluorescenza nel vicino infrarosso ha una sensibilità molto elevata, ma scarsa risoluzione e profondità di penetrazione.^[3] PET (*Positron*

1. *Imaging*

Emission Tomography) e SPECT (*Single-photon Positron Emission Tomography*) hanno una sensibilità eccezionale, ma presentano una risoluzione spesso troppo bassa. Inoltre, queste ultime tecniche richiedono l'iniezione di radionuclidi nell'organismo, con a volte problemi di reazioni all'agente introdotto. Gli US (*UltraSounds*), come i raggi-X, condividono economicità e praticità, ma soffrono di bassa sensibilità e profondità di penetrazione. I principali difetti di queste tecniche, sono in generale assenti nella risonanza magnetica ad immagini. I suoi punti di forza sono un'ottima risoluzione delle immagini, una profondità di campo virtualmente illimitata e un segnale raccolto che non sempre dipende dall'utilizzo di agenti esterni come nel caso dell'*imaging* con radionuclidi. La sensibilità è relativamente bassa, ma è comunque più elevata rispetto a CT e US. Il problema della bassa sensibilità può essere superato mediante l'utilizzo di agenti che consentono di aumentare notevolmente il contrasto nelle immagini.^{[4] [5]}

In appendice A sono descritte, per il lettore interessato, alcune delle principali tecniche di *imaging*, tralasciando la tecnica MRI che verrà descritta nei paragrafi successivi essendo di particolare interesse per questo lavoro di tesi.

Tabella 1.1: Comparazione delle principali tecniche di imaging. Near Infrared Fluorescence (NIRF), Magnetic resonance imaging (MRI) Positron Emission Tomography (PET) Single Photon Emission Tomography (SPECT) Computed Tomography (CT) Ultrasound (US).^{[5] [6]}

Tecnica	Segnale misurato	Risoluzione	Profondità	Sensibilità *	Principali limitazioni
NIRF	luce (NIR)	1-3 mm	< 1cm	10^{-12}	scarsa profondità di penetrazione
MRI	NMR	4-50 μm	illimitata	10^{-9}	bassa sensibilità
PET	positroni	1-2 mm	illimitata	10^{-15}	richiede radioattività
SPECT	raggi- γ	1-2 mm	illimitata	10^{-14}	richiede radioattività
CT	raggi-X	50 μm	illimitata	10^{-6}	bassa risoluzione di tessuti molli
US	onde sonore	50 μm	alcuni cm	10^{-8}	contrasto spesso insufficiente

* moli rilevabili

1. Imaging

Tabella 1.2: Sono riportate in tabella alcune caratteristiche delle principali tecniche di imaging. [5] [6]

	Raggi-X	CT ¹	Ultrasuoni	PET ²	MRI ³
Esposizione a radiazioni ionizzanti pericolose per la salute del paziente	Elevata	Elevata	Nulla	Media, più moderata rispetto a CT e X-ray	Nulla
Costi medi per analisi	70 \$	1200-3200 \$	100-1000 \$	3000-6000 \$	1200-4000 \$
Tempo di scansione	Alcuni secondi	t < 5 minuti	10 - 15 minuti	2 - 4h	10minuti - 2h
Applicazioni	Sono ampiamente utilizzati per l'identificazione di fratture di varia tipologia nelle ossa	Lesioni di ossa, polmoni e torace, screening di malattie, possibilità di vedere tumori	Screening per tumore alla mammella, patologie tiroidee, monitoraggio del feto in gravidanza	Ampio utilizzo in oncologia per la ricerca di metastasi, patologie cardiache e neurologiche	Ricerca di tumori e malattie di varia natura, valutazione dei tessuti molli come cervello e tendini
Dettaglio dei tessuti molli	Molto basso	Buono	Scarso	Discreto	Ottimo

¹ Computed Tomography

² Positron Emission Tomography

³ Magnetic Resonance Imaging

1.2 Magnetic Resonance Imaging

La tecnica MRI è sicuramente una delle tecniche più importanti tra le varie modalità di *imaging* descritte. Essa può mostrare, con elevata qualità, porzioni o immagini 3D dell'anatomia e fisiologia di tessuti, organi e vasi, con una risoluzione in piano anche inferiore ad 1 mm. Per esempio, può dare contrasto tra tessuti molli radiologicamente simili (Figura 1.2), il tutto senza esporre il paziente a radiazioni ionizzanti.

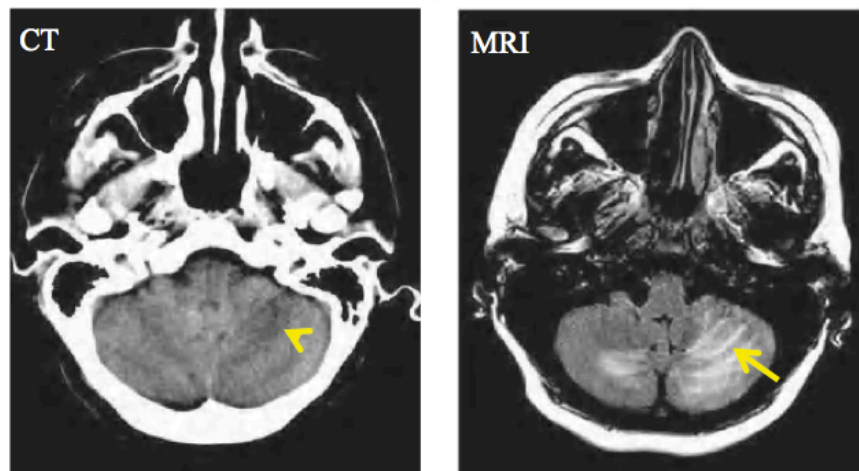


Figura 1.2: Vediamo qui due porzioni trasversali di emisfero di un paziente che soffre di sindrome encefalopatica posteriore reversibile, che si presenta come cambiamenti edematici nella materia bianca. Come si vede la tecnica MRI mostra l'edema con una risoluzione molto maggiore rispetto alla tecnica CT.^[1]

La tecnica MRI è estremamente flessibile sulle modalità con cui genera il contrasto. L'*imaging* usufruisce dei tempi di rilassamento degli spin protonici T_1 e T_2 e in particolare di quelli delle molecole di acqua presenti nei tessuti. Questi sono influenzati dalla rotazione e dal movimento delle molecole coinvolte e nel modo in cui queste interagiscono con l'intorno bio-fisico, che dipende a sua volta dal tipo di tessuto e dal suo stato di salute. La tecnica MRI crea perciò mappe spaziali dell'intorno dei nuclei di idrogeno di acqua nei tessuti. Differenze in questo intorno possono essere clinicamente correlate con differenze nelle proprietà biofisiche, biochimiche, e fisiologiche dei tessuti.^[1]

In appendice B sono riportati, per il lettore interessato, dei cenni teorici sulla tecnica di risonanza magnetica.

1.2.1 MRI con agenti di contrasto

Il naturale contrasto nelle immagini di risonanza magnetica dipende principalmente dalla densità di spin protonica e dai tempi di rilassamento longitudinale T_1 e trasversale T_2

1. *Imaging*

(alcuni cenni teorici sui tempi di rilassamento T_1 e T_2 sono riportati in Appendice B). Nei tessuti molli sani, le differenze nei tempi di rilassamento locali sono spesso abbastanza marcate per produrre un contrasto significativo nelle immagini T_1 e T_2 . Anche tessuti patologici possono essere distinti da tessuti sani grazie alle differenze intrinseche nei valori di T_1 e T_2 nei due casi. Tuttavia, ci sono molte condizioni patologiche che non portano a significativi cambiamenti morfologici, e non mostrano quindi sufficienti differenze nei tempi di rilassamento. In queste circostanze, la patologia può essere rivelata utilizzando un agente di contrasto per MRI, con cui si modificano localmente i tempi di rilassamento dei tessuti. La combinazione di MRI e agenti di contrasto può notevolmente incrementare la sensibilità della tecnica. [7] [8]

Lo sviluppo in anni recenti nel campo dell'*imaging* cellulare e molecolare, ha incrementato l'attività di ricerca per nuovi e migliori agenti di contrasto, con l'obiettivo di creare dei sistemi che possano guidare un agente di contrasto fino al luogo d'interesse. I *target* utilizzati includono recettori su membrane cellulari, attività enzimatica ed espressione genica, consentendo di distinguere una più vasta gamma di processi biologici e fisiologici a livello cellulare e molecolare, collegati per esempio al cancro o altre malattie. L'utilizzo di agenti di contrasto risolve inoltre il problema della bassa sensibilità della tecnica (Figura 1.3).

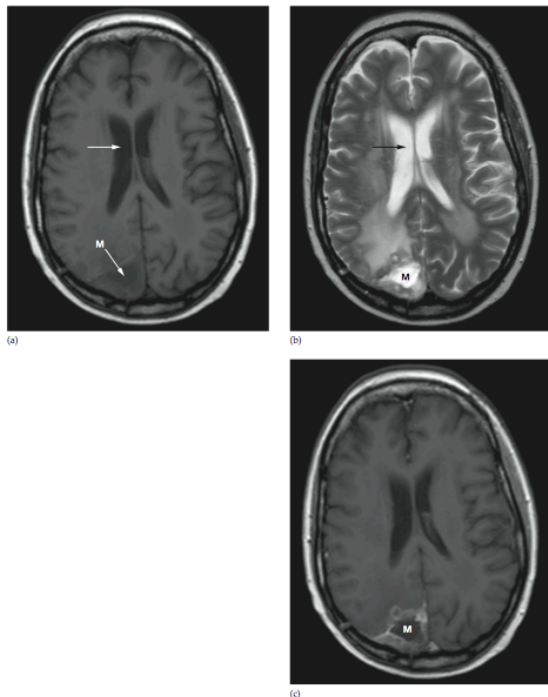


Figura 1.3: MRI del cervello. (a) MRI assiale T_1 (b) MRI assiale T_2 e (c) MRI assiale T_1 con agente di contrasto a base di Gd. Il liquido cerebrospinale da un segnale basso nell'immagine T_1 e un segnale alto nell'immagine T_2 (freccia). Contrassegnato con (M) si vede una metastasi dovuta a carcinoma nel polo occipitale destro. [9]

1. *Imaging*

1.2.1.1 Agenti di contrasto T_1

Gli agenti di contrasto T_1 hanno in genere, come componente principale, ioni di metalli paramagnetici. Lo ione più ampiamente utilizzato è il Gd^{3+} , che possiede un elevato paramagnetismo grazie alla presenza di 7 elettroni spaiati in orbitali f.^{[10][11]} Il problema principale di questi ioni è la loro tossicità, e risulta necessaria la loro coordinazione con agenti chelanti, per formare un complesso non tossico.

In presenza dell'agente di contrasto, la velocità di rilassamento osservata ($R_1 = 1/T_1$) può essere divisa in un contributo intrinseco dei tessuti R_1^{tissue} e in un contributo derivante dall'agente stesso R_1^{ca} (Equazione 1.1). Il contributo R_1^{ca} risulta uguale al prodotto $r_1 [CA]$ (con r_1 velocità di rilassamento in presenza dell'agente di contrasto, chiamata anche relassività), indicando che l'aumento della velocità di rilassamento R_1^{obs} è lineare con la concentrazione di agente di contrasto. L'Equazione 1.2 mostra che il contrasto può essere creato da un agente con elevata relassività r_1 e/o utilizzando elevate concentrazioni locali di agente.

$$R_1^{obs} = R_1^{tissue} + R_1^{ca} \quad (1.1)$$

$$R_1^{obs} = R_1^{tissue} + r_1 [CA] \quad \frac{1}{T_1^{obs}} = \frac{1}{T_1^{tissue}} + r_1 [CA] \quad (1.2)$$

Il contributo paramagnetico portato dall'agente è originato dallo scambio tra molecole d'acqua coordinate allo ione Gd^{3+} (nella prima e seconda sfera di coordinazione) e l'intorno (sfera esterna). L'interazione è un *coupling* dipolare, e decade velocemente con la distanza. Il Gd deve avere almeno un sito di coordinazione libero a cui l'acqua può legarsi, e deve inoltre scambiare velocemente acqua con l'intorno (parametro misurato dal tempo di correlazione di scambio τ_m), di modo che un significativo numero di molecole d'acqua risenta dell'intorno (Figura 1.4a). Il tempo di correlazione rotazionale τ_r del complesso è particolarmente importante. La frequenza rotazionale dei complessi di Gd^{3+} è generalmente elevata, e rallentare la rotazione risulta in fluttuazioni del centro paramagnetico che genera un incremento di relassività. Infine la diffusione, caratterizzata dal tempo di correlazione di diffusione τ_d , consente l'incremento della relassività nelle molecole dell'intorno. Gli agenti T_1 commerciali a base di Gd sono complessi poli(amminocarbossilati) a basso peso molecolare tra cui i più noti sono Gd-DTPA (Magnevist), Gd-DOTA (Dotarem), GdDTPA-BMA (Omniscan) e Gd-HP-DO3A (Prohance) (Figura 1.5).^[12] Il reagente Dotarem in particolare, è al giorno d'oggi uno dei più utilizzati ed esistono in letteratura moltissimi esempi del suo utilizzo come agente.^{[13][14][15][16]} Se utilizzati come agenti di contrasto ad alto peso molecolare, una concentrazione locale nei tessuti dell'ordine di 10^{-7} mol/g è sufficiente per ottenere un buon contrasto nelle immagini. Tuttavia, questa concentrazione minima è troppo bassa per consentire l'*imaging* di antigeni cellulari presenti con concentrazioni di 10^{-9} - 10^{-13} mol/g. C'è comunque ampio spazio per migliorare questi agenti, sulla base della conoscenza dei parametri che

1. Imaging

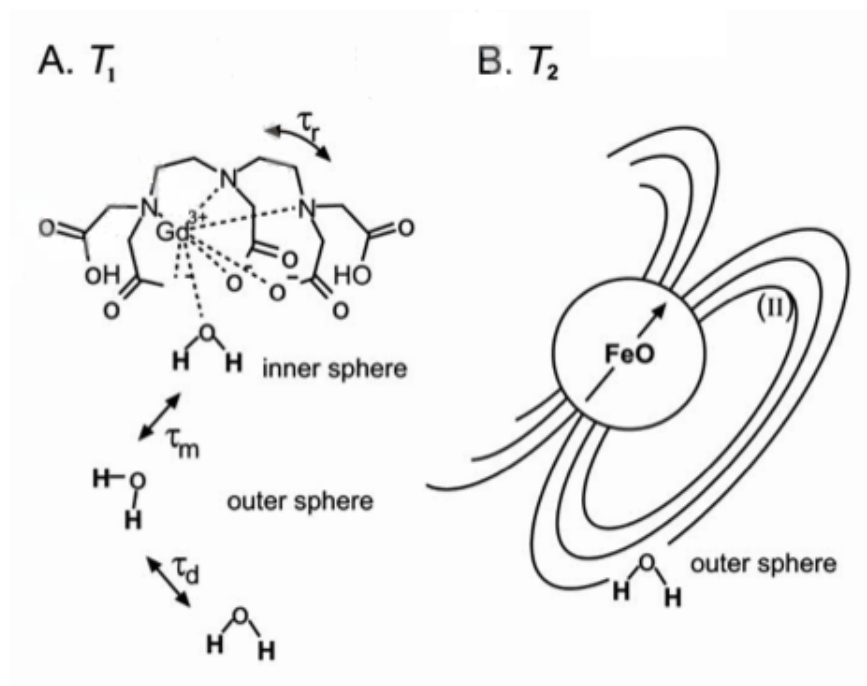


Figura 1.4: I principi fisici del funzionamento di agenti di contrasto T_1 e T_2 . In (A) è mostrato l'agente Gd-DTPA. La rilassività è efficacemente sentita dall'acqua coordinata nella sfera interna dello ione Gd^{3+} . Parametri importanti sono il tempo di correlazione rotazionale τ_r del complesso, il tempo di correlazione di scambio τ_m e il tempo di correlazione di diffusione τ_d . In (B) è mostrata la perdita di defasamento indotta dalla suscettibilità, portando ad un inferiore tempo di rilassamento T_2 nelle molecole d'acqua circondanti la particella di FeO superparamagnetica.

influenzano la rilassività. Questi agenti hanno un solo sito di coordinazione libero per l'acqua ($q = 1$), un tempo τ_r troppo breve in virtù del loro basso peso molecolare e una velocità di scambio di molecole d'acqua $1/\tau_m$ in genere troppo bassa per una rilassività ottimale. A causa di queste limitazioni, la rilassività ottenuta è solo una piccola frazione rispetto a quello che sembra teoricamente possibile. Le principali strade per l'ottimizzazione di questi agenti di contrasto sono principalmente due: migliorare la rilassività intrinseca dell'agente r_1 , ottimizzando i parametri q , τ_m e τ_r e aumentare il numero di ioni Gd^{3+} contenuti nell'agente. Per l'incremento di r_1 le ricerche si sono focalizzate sull'aumento del numero di molecole d'acqua coordinate^[12] e sul tempo di correlazione rotazionale (per esempio legando i complessi a macromolecole).^[11] Tuttavia è l'aumento del numero di ioni Gd^{3+} per unità di agente che ha portato a migliori risultati, legando i complessi a nanoparticelle metalliche, catene peptidiche, lipidi e dendrimeri.^{[12][17]} Di particolare interesse per il futuro, è la combinazione di queste migliorie, sintetizzando agenti di contrasto con un'elevata concentrazione di Gd^{3+} e una migliore rilassività intrinseca.

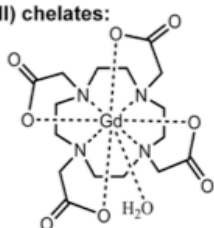
1. Imaging

Tabella 1.3: Valori dei parametri principali per alcuni complessi di Gd^{3+} commercialmente disponibili.^{[11][10]}

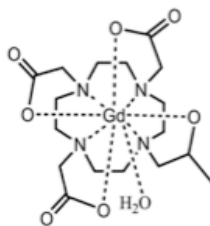
Complesso	r_1 ($mM^{-1}s^{-1}$)	k_{ex} (10^6s^{-1})*	τ_m (ns)	τ_r (ps)	T °C	pH
H ₂ O	-	804	0.94	41	-	-
DOTA	4.2	4.10	108	56	25	7.4
DTPA	4.3	3.30	130	58	25	7.4
DTPA-BMA	4.39	0.45	1000	66	25	
HP-DO3A	3.7	-	-	-	40	-

* = costante di scambio di molecole d'acqua con il complesso

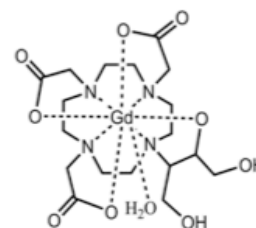
Macrocyclic Gd(III) chelates:



Gd-DOTA (DOTAREM®)

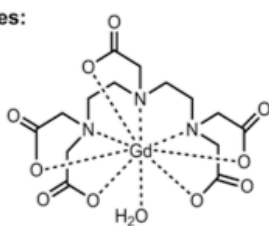


Gd(HP-DO3A) (Prohance®)

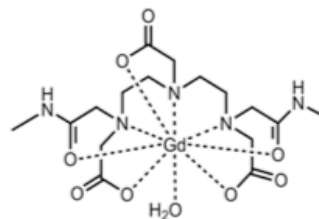


Gd(DO3A-butrol) (Gadovist®)

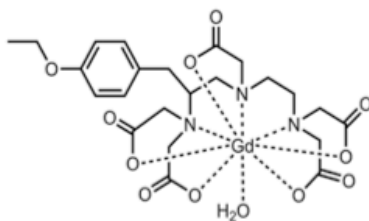
Linear Gd(III) chelates:



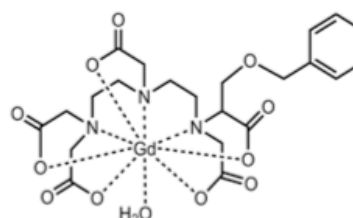
Gd-DTPA (MAGNEVIST®)



Gd(DTPA-BMA) (OMNISCAN®)



Gd-BOPTA (Multihance®)



Gd(EOB-DTPA) (EOVIST®)

Figura 1.5: Struttura dei principali agenti di contrasto a base di gadolinio utilizzati per MRI.

1.2.1.2 Agenti di contrasto T_2

Similmente a quanto descritto per gli agenti T_1 , le fluttuazioni locali di campo magnetico portate da uno ione paramagnetico, danno un contributo anche al tempo di rilassamento

1. Imaging

trasversale. Tuttavia, un metodo più efficace per diminuire T_2 si ha mediante l'utilizzo di agenti di contrasto superparamagnetici. Questi sono composti in genere da nanoparticelle di ossidi di ferro con un diametro nell'ordine di 4-40 nm. Queste nanoparticelle sono anche riferite come *superparamagnetic iron oxide particles* (SPIO), *ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles* (USPIO), *very small superparamagnetic iron oxide particles* (VSOP), *monocrystalline iron oxide particles* (MION) e *cross-linked iron oxide* (CLIO) in dipendenza delle loro dimensioni, struttura cristallina, coating e ordine di organizzazione.^{[18][19]} Recentemente, particelle micrometriche con dimensioni di circa $6 \mu\text{m}$ a base di ossidi di ferro (MPIO), sono state utilizzate per la visualizzazione di cellule.^[20] Le particelle di FeO_x possono contenere migliaia di ioni ferro con momenti di dipolo magnetici ordinati, creando un momento magnetico netto molto superiore (fino a 3 ordini di grandezza) rispetto al caso di un singolo ione paramagnetico isolato. In presenza di un campo magnetico esterno B_0 le particelle possono quindi essere magnetizzate. L'influenza di questi agenti sul tempo di rilassamento trasversale può essere spiegato da un effetto di suscettibilità (Figura 1.4b). Il grande momento magnetico delle nanoparticelle superparamagnetiche, produce rilevanti gradienti di campo locali, che accelerano la perdita di fase coerente da parte degli spin protonici nelle molecole d'acqua circostanti.^[21] Un aumento del rilassamento può essere osservato anche a considerevoli distanze, poiché, a differenza degli agenti T_1 , la suscettibilità che induce rilassamento non è limitata ai soli protoni nelle strette vicinanze. Inoltre, la diffusione in prossimità delle nanoparticelle, amplifica l'effetto di defasamento. Anche per gli agenti di contrasto T_2 , una maggior concentrazione porta ad un incremento della velocità di defasamento R_2^{obs} come mostrato nella seguente equazione.

$$\frac{1}{T_2^{obs}} = \frac{1}{T_2^{tissue}} + r_2 [CA] \quad R_2^{obs} = R_2^{tissue} + r_2 [CA] \quad (1.3)$$

Uno dei principali problemi di questi agenti, è che spesso, la scarsa mobilità di protoni in macromolecole e membrane dei tessuti biologici, porta a valori di T_2 troppo brevi per essere usati in MRI.

Tabella 1.4: Caratteristiche di alcuni ossidi di ferro utilizzati in MRI.^[18]

Formula	Nome	Forza magnetica*	Cristallografia
$\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$	magnetite	4	spinello inverso
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	maghemite	4	spinello inverso
$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$	ematite	0 - 0.01	Hexagonal close packing

* Bohr magnetoni su unità di formula

1. Imaging

Tabella 1.5: Principali caratteristiche di alcuni ossidi di ferro funzionalizzati in superficie con polimeri e impiegati come agenti di contrasto T_2 (PEG = polietilen glicole; Dextran = polisaccaride a base di glucosio).^[18]

Nome	Superficie polimerica	R_2 (mMs ⁻¹)	$r_{\text{(shell)}}$ (nm)	$r_{\text{(NPs)}}$ (nm)
AMI-227	Dextran	53	4-6	19
MION-37	Dextran T10	35	4.6	16-28
MION-mPEG	PEG	240	16-35	4.6

1.2.1.3 Struttura e biocompatibilità di complessi DOTA-Gd

Il gadolinio è un metallo pesante molto tossico e i suoi sali GdX_3 hanno un LD_{50} (nei topi) di 5 mg/Kg per via orale.^[10] Tuttavia, se si scelgono dei leganti opportuni, è possibile utilizzare lo ione Gd^{3+} sotto forma di complessi che non rilasciano gli ioni all'interno dell'organismo. Il primo complesso ad essere approvato per la sperimentazione (nel 1988) è stato $[Gd(DTPA)(H_2O)]^{2-}$ (Figura 1.6). Questo complesso non è idrofobico ed è quindi improbabile che entri nelle cellule. In esso, lo ione metallico è nascosto, e sarà improbabile che interagisca con gruppi donatori in proteine o enzimi. Inoltre, non c'è nessuna possibilità di attacco da parte di un buon nucleofilo o elettrofilo sul complesso, che in definitiva, può essere considerato solo una piccola sfera idrofila e non tossica.^[11]

I metalli della serie dei lantanidi hanno una grande capacità di coordinazione che dovrà essere bloccata per inibire la reattività del metallo. Il macrociclo DOTA (1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-acido tetraacetico) è sicuramente uno dei più utilizzati, e possiede 8 siti di coordinazione utilizzabili per legare il Gd. Quando complessato con il DOTA, il Gd mantiene ancora la possibilità di coordinare una molecola di acqua, di fondamentale

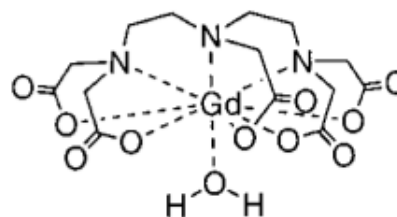


Figura 1.6: Struttura del complesso $[Gd(DTPA)(H_2O)]^{2-}$.

importanza come visto nei paragrafi precedenti (Figura 1.7). Le geometrie di coordinazione più usuali per un complesso enneacoordinato, sono la *tricapped trigonal prism* (TTP) e la *capped square antiprism* (CSAP). Le due geometrie sono strettamente connesse, ed è possibile la presenza di strutture intermedie. La struttura a raggi-X del complesso $Na[Gd(DOTA)(H_2O)]$ ^[22] mostra una preferenza per la geometria CSAP, dove i quattro atomi di azoto stanno in un unico piano, così come i quattro ossigeni carbossilici, mentre la posizione di *capping* è occupata dalla molecola d'acqua (Figura 1.8). L'equilibrio termodinamico con altre specie presenti nell'organismo (metalli, anioni etc)

1. Imaging

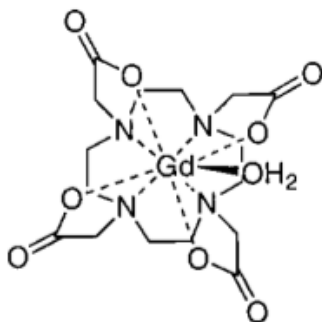


Figura 1.7: Struttura del complesso $[\text{Gd}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$.

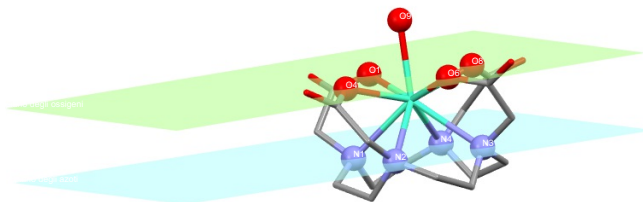


Figura 1.8: Struttura del complesso $[\text{Gd}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$. Sono qui messi in evidenza i 9 atomi che coordinano il Gd, con i 4 ossigeni che stanno su uno stesso piano, così come i 4 azoti. Colorcode: rosso (O), fucsia (N), grigio (C) e verde (Gd). Non sono mostrati in figura gli atomi di idrogeno. (Fonte: Cambridge Crystallographic Data Centre)

possono contribuire alla dissociazione del metallo dal complesso. La costante di stabilità termodinamica K_{GdL} (Equazione 1.4) è molto elevata per tutti i principali agenti di contrasto studiati e l'equilibrio è quindi fortemente spostato dalla parte del complesso $[\text{GdL}]$. In Tabella 1.6 sono riportati i valori di K_{GdL} per alcuni complessi, e si può vedere come la costante per il complesso $[\text{Gd}(\text{DOTA})]^-$ sia la più elevata, rendendolo termodinamicamente il complesso più stabile tra quelli commercialmente disponibili. Un elemento di disturbo alla stabilità dei complessi sono i protoni, che possono competere con il legante L, in particolar modo se il valore di pH è basso. Risulta più utile quindi andare ad osservare i valori della costante di stabilità dipendente dal pH K_{GdL}^* (Equazione 1.5), che tiene conto del valore del pH e delle costanti di acidità del legante K_1, K_2, \dots, K_n . Il valore di questa costante a pH 7.4 (Tabella 1.6) è inferiore di qualche ordine di grandezza rispetto al valore di K_{GdL} e diminuisce ancora all'abbassarsi del pH. A determinati valori di acidità, questi complessi si rompono; il complesso $[\text{Gd}(\text{DOTA})]^-$ per esempio, dissocia per valori di pH < 1.5 liberando lo ione metallico.^[22] Anche in questo caso comunque, il DOTA presenta la costante K_{GdL}^* con il valore più elevato. Data la differenza nei valori di K_{GdL} e K_{GdL}^* la quantità di Gd^{3+} che dissocia nell'organismo può essere investigata misurando la %ID (*initial dose*)/grammo trovata nel femore, a 7 giorni dall'iniezione del complesso su un topo. Anche in questo caso il complesso del DOTA mostra i risultati migliori. Termodinamicamente quindi, questo complesso possiede una stabilità eccezionale.

$$M + L = ML \quad K_{ML} = \frac{[ML]}{[M][L]} \quad (1.4)$$

$$K_{ML}^* = \frac{K_{ML}}{1 + K_1[H^+] + K_1K_2[H^+]^2 + \dots + K_1K_2\dots K_n[H^+]^n} \quad (1.5)$$

La termodinamica spesso non è però sufficiente per definire il comportamento di un complesso, poiché cammini cinetici a bassa energia di attivazione possono influenzare il suo

1. *Imaging*

comportamento. I complessi con macrocicli, rispetto a quelli con leganti aciclici, tendono ad essere significativamente più inerti.^[23] Questo è chiaramente il caso del legante poliamminocarbossilato costituente il DOTA, che forma complessi con Gd^{3+} eccezionalmente inerti oltre che stabili. Infatti, le reazioni di dissociazione, non intaccano il complesso nelle condizioni presenti nell'intorno extracellulare. Data la stabilità e inerzia di questi composti, imputare la tossicità, in alcuni casi riscontrata nell'uso di questi agenti, alla dissociazione di Gd^{3+} , sembra non sia sufficiente.

Tabella 1.6: Costanti di stabilità e assorbimento osseo di Gd^{3+} per una serie di agenti di contrasto con rilevanza clinica. Il complesso con EDTA non è approvato come agente di contrasto, ed è stato inserito solo a fini comparativi.^{[11][10]}

Legante (L)	%ID _{media} /grammo	log K_{GdL}	log K_{GdL}^* (pH 7.4)
EDTA	0.80	17.7	14.70
DTPA	0.005	22.46	17.70
DTPA-BMA	0.03	16.85	14.90
HP-DO3A	ND ¹	23.8	17.21
DOTA	ND ¹	25.3	18.33

¹ Non rilevabile con la tecnica strumentale utilizzata

1.2.2 Coniugazione di agenti di contrasto a macrostrutture

La coniugazione di piccole molecole come DTPA-Gd e DOTA-Gd a macromolecole altera le proprietà della molecola stessa, aumentando il tempo di correlazione rotazionale e quindi la rilassività dell'agente. Un'altra strategia per aumentare la rilassività è quella di legare più unità di complesso di Gd alla stessa macrostruttura, aumentando quindi la concentrazione locale di gadolinio. L'approccio convenzionale utilizzato è di preparare le strutture molecolari funzionalizzando complessi di Gd^{3+} con polimeri, dendrimeri, molecole biologiche e nanoparticelle metalliche.^[24] Recentemente, l'avvento delle reazioni di *click chemistry* ha portato facili, nuove e interessanti modalità per la coniugazione di agenti di contrasto a macromolecole di varia natura. Un interessante esempio è la polilislina che è commercialmente disponibile con vari pesi molecolari ed è stata efficacemente derivatizzata con chelanti a base di Gd, facendo reagire i gruppi amminici in catene laterali con funzioni carbossiliche, presenti nell'agente chelante per formare un legame ammidico. Questi coniugati possono contenere fino a 70 atomi di Gd,^[25] portando a rilassività 2.5 volte superiore rispetto al solo reagente Gd(DTPA).^[26] Anche complessi coniugati a peptidi di diversa natura portano ad una variazione del tempo di rilassamento rispetto al solo complesso. Peptidi penetranti le cellule, lineari o ciclici aumentano la velocità di rilassamento, ma con variazioni di r_1 non equivalenti (Figura 1.9-1.10).

1. Imaging

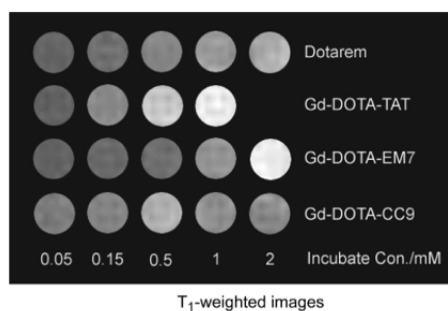


Figura 1.9: Immagini T_1 -MRI *in vitro* del sistema peptide-Gd(DOTA) (Figura 1.10) e del riferimento Dotarem alle concentrazioni di 0.05, 0.15, 0.5, 1.0 e 2.0 mM dopo 24h.^[27]

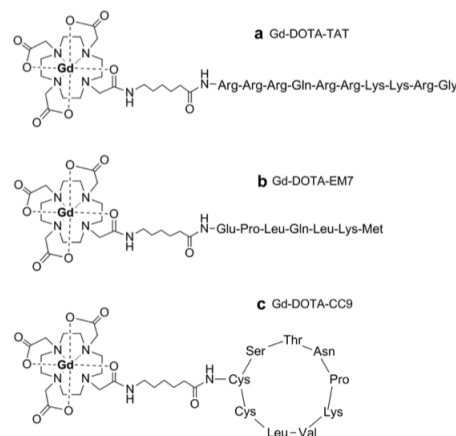


Figura 1.10: Struttura di sistemi DOTA(Gd)-peptide con diverse sequenze peptidiche.^[27]

La natura del peptide può quindi giocare un ruolo importante.^[27] Sistemi albumina-(Gd-DTPA)_x sono il prototipo di agenti macromolecolari per MRI. Si legano tipicamente 25-35 complessi per albumina con un peso di circa 92 kDa e un diametro di circa 6 nm. Il reagente ha una rilassività 3 volte maggiore rispetto a quella del complesso non coniugato, ed è stato utilizzato efficacemente per caratterizzare la vascolarizzazione di vari tumori.^[28] Sistemi misti composti da polimeri naturali e sintetici sono stati altresì sintetizzati. Un esempio è la sintesi di un sistema composto dal chelante DTPA legato a nanoparticelle formate da blocchi di *poly(L-lactide)* e *polyethylene glycol* (PEG). Il valore di r_1 misurato per questo sistema è di $18.865 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$.^[29] La stessa polilisina prima citata è stata modificata con polietilen glicole (PEG) per modulare le proprietà farmaco cinetiche dell'agente, ottenendo dei valori di r_1 per ione metallico superiori a $10 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Un altro esempio è portato dalla sintesi di sistemi proteici contenenti il Gd,

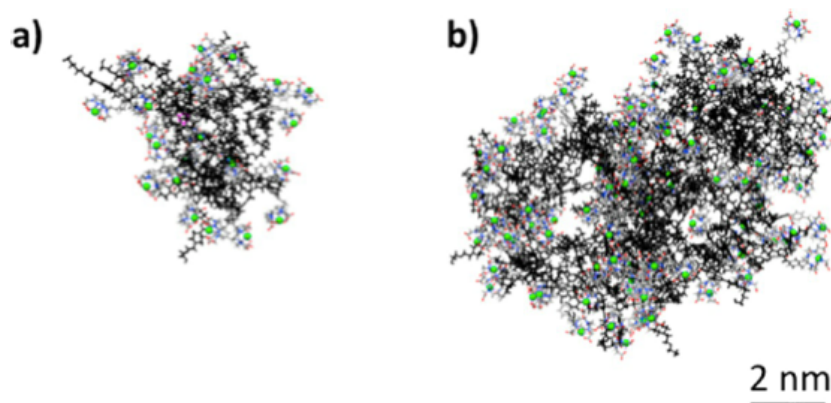


Figura 1.11: Struttura tridimensionale dei sistemi G_3 -(Gd-DOTA)₂₄ (a) and G_5 -(Gd-DOTA)₉₆ (b).^[14]

1. Imaging

funzionalizzati con polietilen glicole di varia lunghezza. I frammenti di PEG portano ad un significativo incremento di r_1 e r_2 (quasi del 200 %) rispetto al solo sistema proteico, e ad una maggiore biocompatibilità.^[15]

Un'altra classe di composti utilizzati per la coniugazione di agenti di contrasto sono i dendrimeri, molecole altamente ramificate con una ben definita nanostruttura tridimensionale. I principali vantaggi di questi composti sono una precisa struttura molecolare e un'ampia superficie utilizzabile per la coniugazione. Una classe di dendrimeri molto utilizzata è quella delle poliamidoammine (PAMAM). Ci sono varie generazioni appartenenti a questa classe, in dipendenza delle loro dimensioni e proprietà farmaco cinetiche (Figura 1.11). Sistemi di Gd-DTPA coniugato con la quinta generazione (G_5 , $M_w = 51\text{kDa}$) possiedono una rilassività 4.7 volte maggiore rispetto al complesso stesso.^[30] I dendrimeri di bassa generazione G_2 (3 nm), G_3 (5 nm) e G_4 (6 nm) hanno dimensioni sufficientemente piccole da consentire l'accumulo veloce in regioni tumorali rispetto a generazioni G_6 (10 nm) e G_8 (13 nm). Il design dell'agente di contrasto porta a modificazioni della rilassività del sistema (Figura 1.12), ed è quindi molto importante per le applicazioni in MRI.^[13] Come nel caso dei copolimeri PLA-PEG, sistemi misti a base di

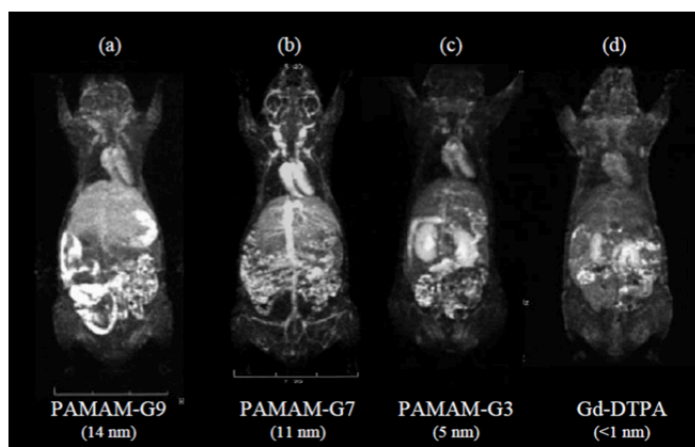


Figura 1.12: MRI di topi dopo l'iniezione di $0.03 \text{ mmol}_{Gd}/\text{Kg}$ di PAMAM G_9 (a), G_7 (b), and G_3 (c) coniugate con Gd-DTPA.^[30]

dendrimeri e PEG sono stati sintetizzati per sfruttare l'idrofilicità e la biocompatibilità di questo polimero. Complessi di Gd legati a dendrimeri PAMAM di varie generazioni sono stati coniugati con catene PEG di diversa lunghezza (Figura 1.13). Il primo ruolo del PEG è di prolungare il tempo di circolazione dell'agente nell'organismo (che altrimenti viene eliminato prontamente dai reni), che ha così il tempo di accumularsi nelle zone di interesse. Inoltre, la coniugazione con catene PEG di una certa lunghezza, porta all'aumento della rilassività fino a sei volte il valore del complesso isolato.^[31]

1. Imaging

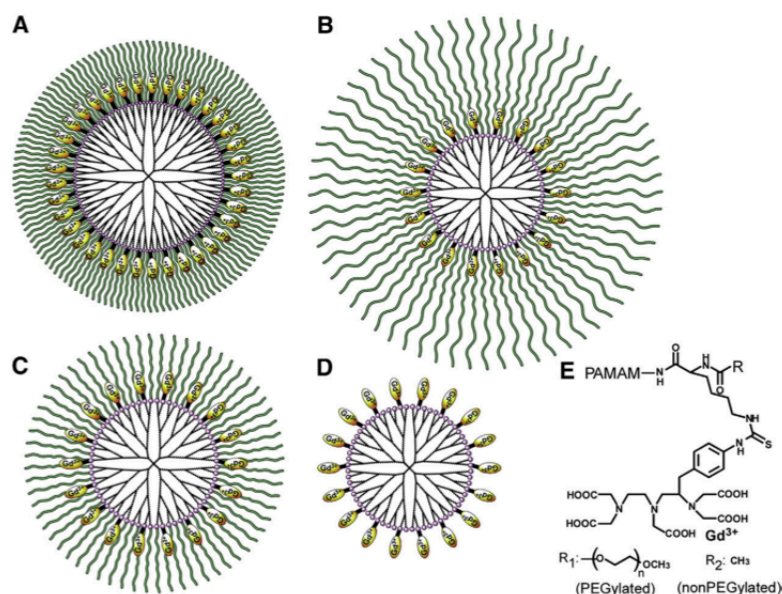


Figura 1.13: Dendrimeri a base di PAMAM coniugati con Gd-DTPA e funzionalizzati con catene PEG di varia lunghezza. (a) PEG_{2k}-PAMAM (G₅), (b) PEG_{5k}-PAMAM (G₄), (c) PEG_{2k}-PAMAM (G₄), (d) Ac-PAMAM (G₄) non funzionalizzato con PEG (e) Struttura chimica della modificazione superficiale dei dendrimeri.^[31]

1.2.2.1 Coniugazione via click-chemistry

Una sintesi in campo biomedico dovrebbe essere svolta in acqua, in condizioni blande ed evitare reazioni indesiderate che portino all'utilizzo di gruppi protettori.^[32] Le reazioni di *click chemistry* soddisfano tutti questi vincoli. Esse sono caratterizzate da elevate rese, facilità di svolgimento, purificazione dei prodotti minima o non necessaria e applicabilità a diversi substrati senza la necessità di utilizzare gruppi protettori. Tra le reazioni di *click chemistry*, le più interessanti sono sicuramente le cicloaddizioni 1,3-dipolari di Huisgen,^[33] che coinvolgono un alchino e un azide per formare 1,2,3-triazolo. La reazione può avvenire semplicemente scaldando il sistema ($\approx 100\text{ }^\circ\text{C}$), ottenendo però una miscela di prodotti 1,4 e 1,5 sostituiti (Figura 1.14).

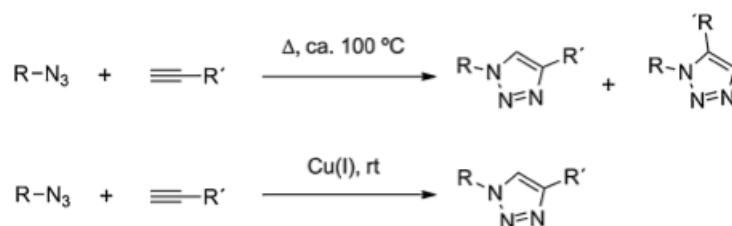


Figura 1.14: La cicloaddizione 1,3-dipolare di Huisgen catalizzata da sali di Cu(I) forma esclusivamente il prodotto 1,3-sostituito. La reazione avviene anche scaldando il sistema ($\approx 100\text{ }^\circ\text{C}$) ottenendo però i prodotti 1,4 e 1,5 sostituiti in quantità confrontabili.^[33]

1. Imaging

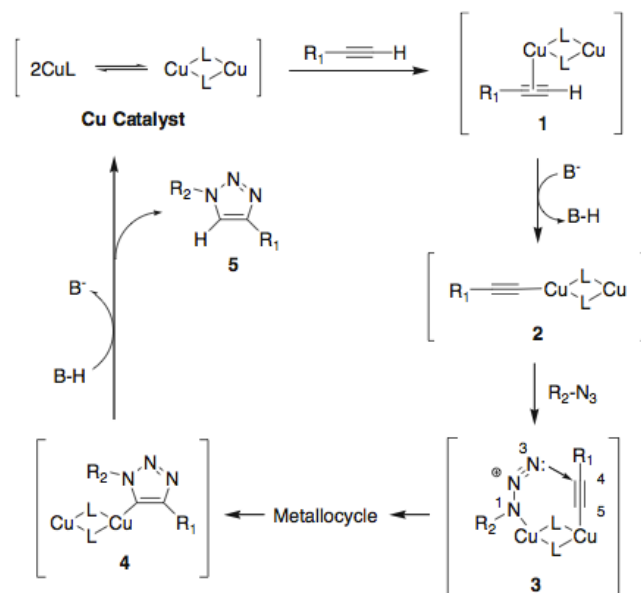


Figura 1.15: Cicloaddizione 1,3-dipolare di Huisgen catalizzata da sali di Cu(I). Il ruolo del rame è quello di deprotonare l'alchino e allo stesso tempo attivare l'azide. L indica un generico alogenuro, mentre BH indica la base (in genere il solvente).^[32]

La reazione catalizzata da rame (Figura 1.15) avviene per lo più a temperatura ambiente, può essere fatta in una grande varietà di solventi (nel caso dell'acqua è possibile lavorare in un ampio range di pH compreso tra 5 e 12), non è influenzata da fattori sterici ed è 10^7 volte più veloce rispetto alla non catalizzata. Azidi e alchini sono facilmente introducibili su molecole organiche o complessi, e sono estremamente stabili (in condizioni standard) in presenza di ossigeno e acqua. Negli ultimi anni, cicloaddizioni di Huisgen catalizzate da Cu(I) sono state quindi ampiamente utilizzate in vari campi.^{[32] [33] [34] [35]} Tuttavia, l'utilizzo di rame come catalizzatore può comportare degli svantaggi in alcune applicazioni, come la sintesi di agenti di contrasto T_1 dove il rame può competere con il gadolinio quando bisogna legare quest'ultimo a macrocicli come il DOTA o il DTPA. Inoltre, i sali di rame a volte non sono desiderati nei prodotti di reazione, e devono essere separati comportando un'ulteriore step di sintesi. Per ovviare a questi problemi, negli ultimi anni sono state sviluppate delle cicloaddizioni senza la mediazione del rame. *Click chemistry Cu-free* differiscono dalle tradizionali per l'utilizzo di cicloalchini tensionati, in cui la formazione del prodotto triazolo mitiga la tensione dell'anello, favorendo la reazione anche a basse temperature. I primi tentativi fatti dal gruppo di Bertozzi^[36] utilizzando cicloottino come alchino tensionato (Figura 1.16), consentivano reazioni in condizioni blande ma con una bassa velocità, soprattutto se paragonata con la reazione Cu(I) catalizzata. La cinetica è stata migliorata modificando il cicloottino con gruppi elettron-attrattori e gruppi che aumentano la tensione d'anello (Figura 1.17). Il reagente dibenzocicloottino (DBCO) in particolare, ha una velocità 10^4 volte superiore rispetto al

1. Imaging

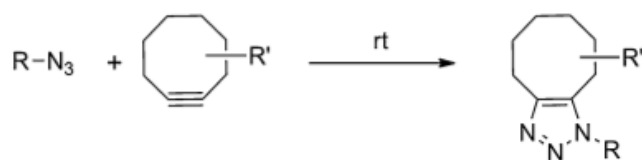


Figura 1.16: La cicloaddizione 1,3-dipolare di Huisgen con cicloottini tensionati procede in condizioni blande senza utilizzare Cu(I) come catalizzatore.^[33]

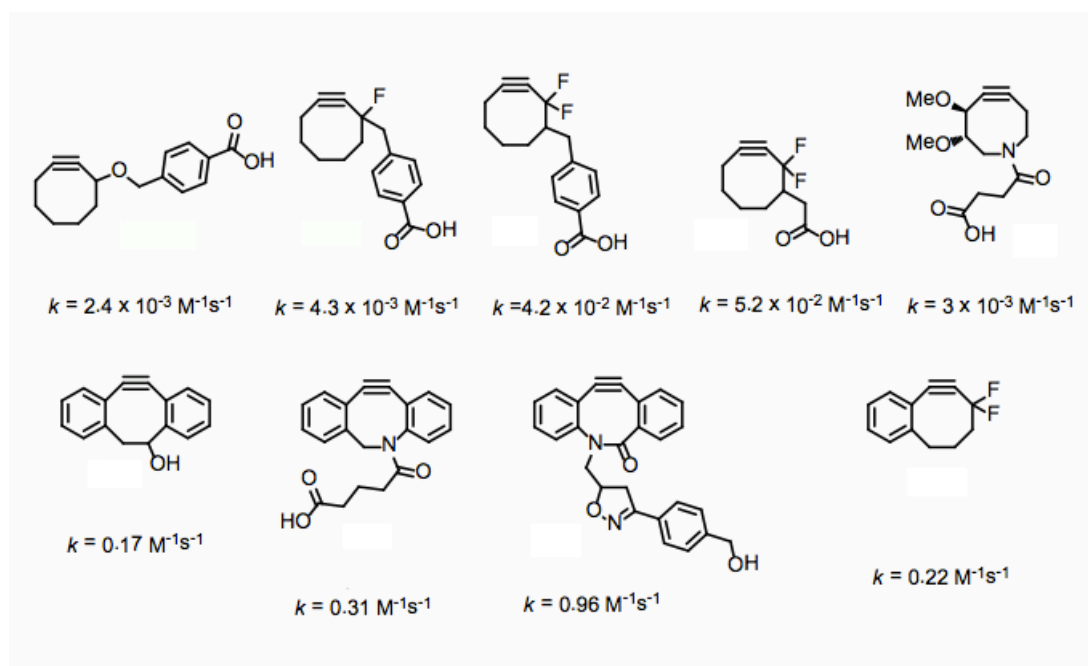


Figura 1.17: Cicloottino modificati con gruppi elettron-attrattori per migliorare la velocità di reazione di click chemistry Cu-free. Sono indicate per ogni composto le costanti di velocità relative alla reazione con acido 5-azidopentanoico.^[33]

cicloottino, grazie alla sinergia di effetti elettronici e una maggiore tensione d'anello.^[33] Lo sviluppo delle reazioni di *click chemistry* Cu catalizzate e Cu-free è stato subito sfruttato nella sintesi di agenti di contrasto per T₁-MRI. Gruppi azido e alchino sono stati introdotti su leganti per il complessamento del gadolinio, in particolare il DOTA.^{[37] [38]} La disponibilità di questi reagenti, al giorno d'oggi commercialmente disponibili, ha aperto la strada alla facile coniugazione a macromolecole con diverse proprietà (Figura 1.18 - 1.19), ampliando i campi di utilizzo degli stessi agenti.^{[39] [40] [41]}

1. Imaging

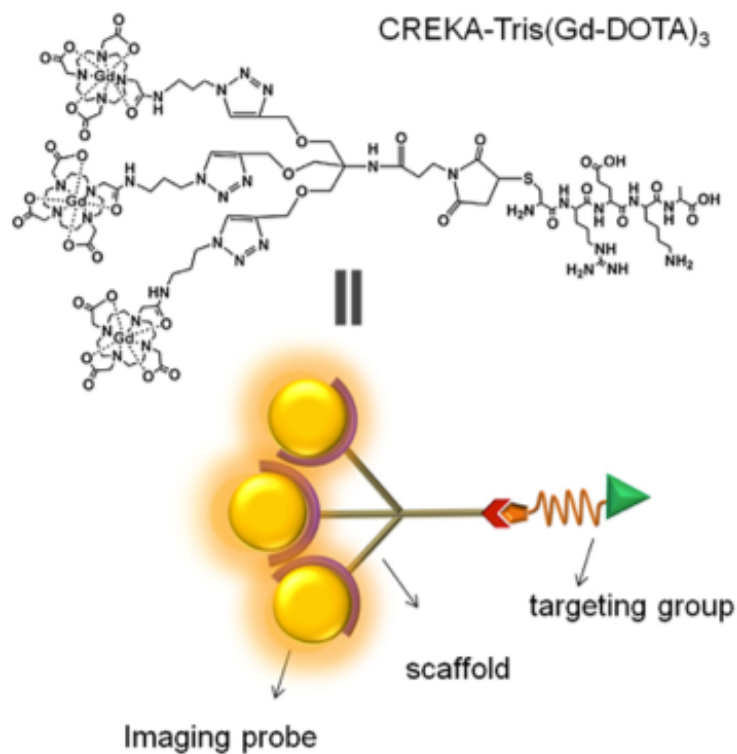


Figura 1.18: Struttura del sistema CREKA-Tris(Gd-DOTA)₃. La catena peptidica contenente tre gruppi alchino è stata fatta reagire con i DOTA-N₃ tramite reazione di click chemistry Cu catalizzata.^[16]

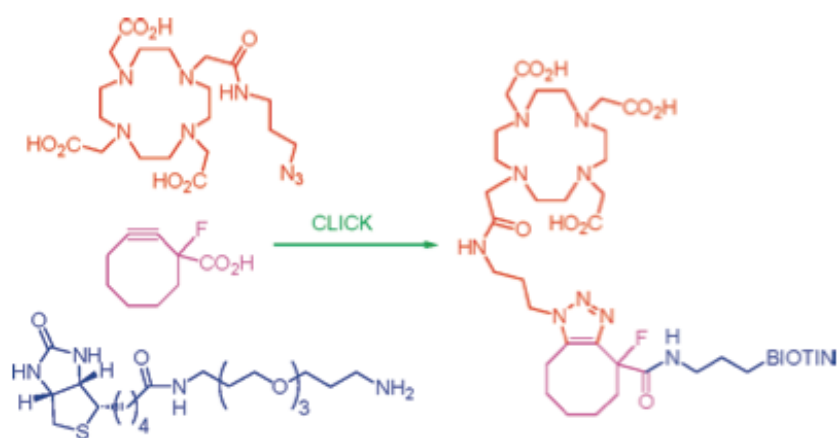


Figura 1.19: Sistema DOTA-biotina sintetizzato facilmente tramite reazione di click chemistry Cu-free. Questa strategia di sintesi offre un generale e conveniente metodo per legare agenti di targeting di diverso tipo al macrociclo DOTA-N₃.^[39]

1. *Imaging*

1.2.3 Targeting con agenti di contrasto

Negli ultimi anni, gli anticorpi monoclonali hanno portato un grande contributo alle tecniche diagnostiche. Questi localizzano antigeni prodotti sulla superficie cellulare e legandosi ad essi segnalano al sistema immunitario la necessità di intervenire. Anticorpi monoclonali (ma anche peptidi) specifici possono essere coniugati ad agenti di contrasto per risonanza magnetica, consentendo la localizzazione mirata di patologie. Tuttavia, la concentrazione degli antigeni è spesso troppo bassa (10^{-8} - 10^{-13}) per ottenere delle buone immagini. Per aumentare l'intensità del segnale è quindi necessario aumentare la concentrazione di Gd^{3+} nei sistemi per targeting. Agenti di *targeting* per MRI furono inizialmente preparati coniugando complessi commercialmente noti come il DTPA e il DOTA a agenti di *targeting* specifici per il cancro come il peptide ciclico RGD. Questo peptide ha una buona affinità per l'integrina $\alpha_v\beta_3$ espressa da molte cellule tumorali durante l'angiogenesi. Il peptide RGD è stato quindi coniugato con Gd(DOTA). Il sistema RGD-Gd(DOTA) possiede una maggiore rilassività rispetto al solo complesso, dovuta a minore velocità di rotazione dopo l'introduzione del peptide. L'analisi *in vivo* (Figura 1.20) su topi con carcinoma che esprime l'antigene $\alpha_v\beta_3$ ha mostrato un incremento di rilassività del 45 % nella zona tumorale rispetto all'iniezione dell'agente di contrasto senza target. Tuttavia, per produrre un buon contrasto, è stata necessaria un'elevata dose (1.43 mmol/Kg) di agente RGD-Gd(DOTA).^[42]

Legare agenti di *targeting* come anticorpi a sistemi proteina-[Gd(complesso)]_n consente di diminuire la dose di agente da iniettare. Artemov et al.^[43] hanno sviluppato un sistema a due componenti avidina-biotina a base di Gd per MRI di recettori della famiglia HER-2/*neu* espressi sulla superficie di molte cellule tumorali. I recettori sono stati legati a mAb anti-HER-2/*neu* modificati con biotina con cui il sistema avidina-(Gd-DTPA) ha poi interagito.^[43]

Oltre a polimeri, anche vari dendrimeri coniugati ad agenti di contrasto sono stati testati utilizzando come agenti di *targeting* anticorpi, peptidi e folati.^{[44] [45]} L'acido folico controlla la proliferazione cellulare, ed è quindi utilizzato come target nel caso di cellule tumorali che espongono recettori positivi ai folati. Acido folico e Gd(DOTA) sono stati coniugati a dendrimeri PAMAM di 5° generazione per produrre agenti di contrasto selettivi per i folati. La rilassività del sistema testata *in vivo* su topi è risultata più di 6 volte maggiore rispetto al solo Gd(DOTA). L'iniezione di 0.029 mmol Gd/Kg è stata sufficiente per produrre un contrasto significativo per un periodo di 24-48 h. L'agente senza acido folico coniugato non solo produce un contrasto minore nella zona tumorale, ma rimane in circolo per solo 1 h prima di essere eliminato dall'organismo.^[45]

Un altro esempio è dato dal sistema (Figura 1.21) formato coniugando il peptide CLT-1 (che fa da agente di *targeting*) e Gd(DOTA) a nanoglobuli G₂ e G₃ (dendrimeri a base

1. Imaging

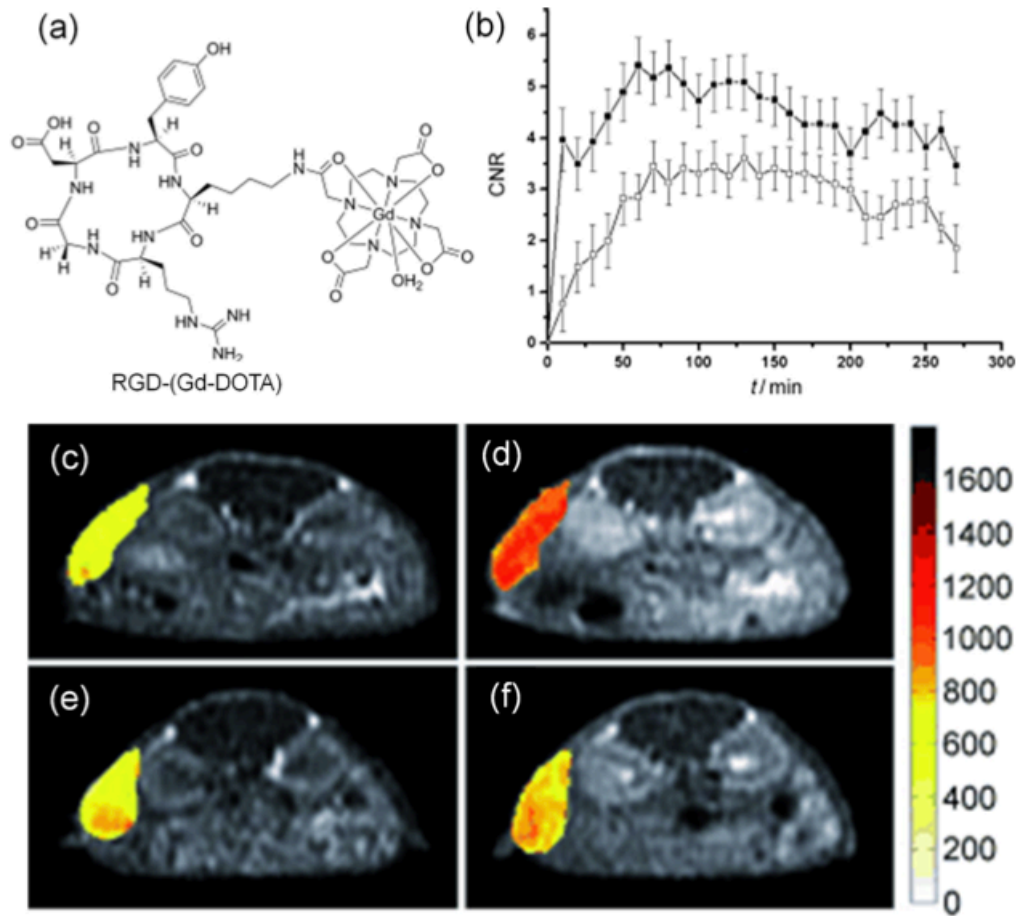


Figura 1.20: (a) Struttura del sistema RGD-Gd(DOTA), (b) Intensità normalizzata del segnale proveniente dal tumore in funzione del tempo per RGD-Gd(DOTA) ● e Omniscan ○, (c)(e) MRI T₁ di topo con carcinoma epatocellulare prima, e dopo (d)(f) l'iniezione di RGD-Gd(DOTA) (in f è stato iniettato il peptide RGD 30 minuti prima).^[42]

di lisina). Testato su topi che esprimono l'antigene MDA MB-231 (espresso nel caso di cancro al seno anche nell'uomo), l'agente mostra un migliore contrasto dei tessuti tumorali (Figura 1.22) e un tempo di ritenzione nell'organismo 6 volte superiore rispetto all'agente senza peptide.^[44]

1. Imaging

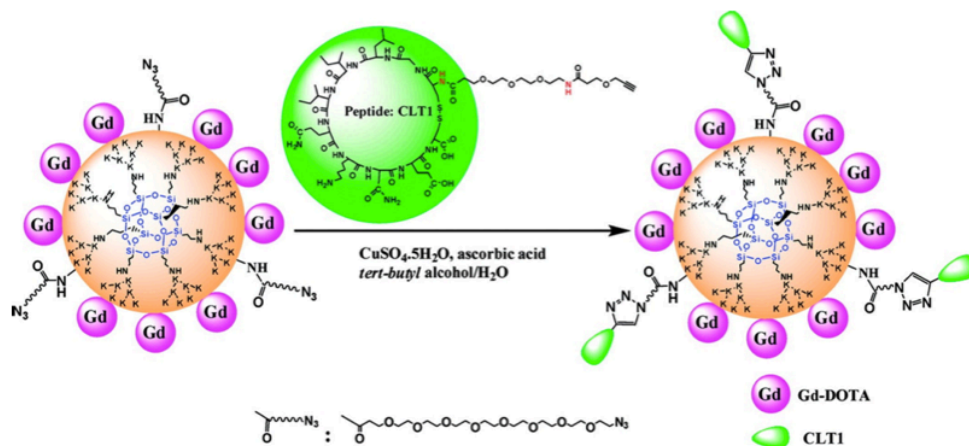


Figura 1.21: Sintesi dell'agente di contrasto peptide CLT1-Gd(DOTA)-G₂.^[44]

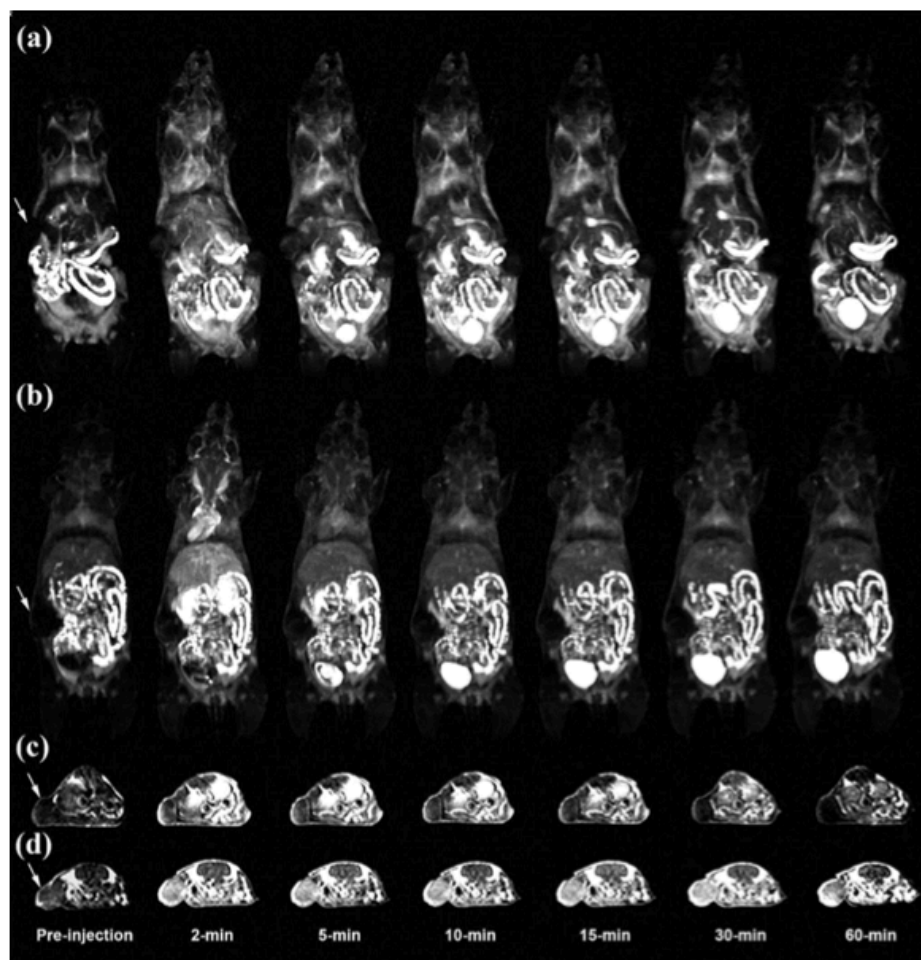


Figura 1.22: Immagini 3D a massima intensità di proiezione (a)(b) e immagini assiali 2D spin-echo T₁-pesate (c)(d) del tessuto tumorale di un topo esprimente l'antigene MDA MB-231 a vari tempi dopo l'iniezione di 0.03 mmol Gd/Kg di G₂-Gd(DOTA) (a)(c) e CLT1-G₂Gd(DOTA) (b)(d). La freccia indica il tumore.^[44]

2. Imaging con nanoparticelle

Lo sviluppo di nuovi sistemi di contrasto consente alle tecniche di *imaging* di divenire efficienti e di migliorare la capacità di individuare particolari significativi. I recenti avanzamenti nel campo delle nanotecnologie, hanno portato allo sviluppo di agenti basati su nanoparticelle per sfruttare le loro particolari caratteristiche. Le proprietà di questi nanosistemi, specialmente al di sotto dei 100 nm, sono molto diverse rispetto al materiale massivo per diversi motivi, tra cui vale ricordare l'aumento dell'area superficiale, la comparsa di effetti di confinamento quantico e le dimensioni minori rispetto alla lunghezza d'onda della radiazione dello spettro del visibile e dell'infrarosso. L'aumento di area superficiale, aumenta l'interazione con altri materiali, rendendo i sistemi nanostrutturati interessanti per la catalisi. L'effetto di confinamento quantico influenza le proprietà elettroniche delle nanoparticelle e perciò le loro proprietà ottiche e magnetiche. Il confronto con la lunghezza d'onda della radiazione con cui le particelle interagiscono consente di poter osservare effetti come quelli plasmonici, non osservabili per i sistemi massivi. Nanoparticelle di materiali con proprietà metalliche sono state ampiamente utilizzate in molte tecniche di *imaging* per le loro proprietà plasmoniche, mentre *quantum dots* (nanoparticelle di semiconduttori) sono stati sfruttati come sonde fluorescenti.^[46]

2.1 Funzionalizzazione di NPs con PEG

Poiché hanno dimensioni maggiori rispetto a molecole e molte proteine, ma minori rispetto alle cellule, le nanoparticelle (NPs) agiscono diversamente rispetto ai comuni agenti di *imaging*, comportandosi in modo caratteristico nelle applicazioni *in vivo*. Per esempio, le NPs si accumulano nelle zone tumorali, permettendo di utilizzare terapie mirate o produrre segnali localizzati.^[47] Nonostante questi vantaggi, l'utilizzo di nanoparticelle nell'organismo può comportare delle controindicazioni. Le nanoparticelle, come altri corpi estranei, sono sequestrate dal sistema reticoloendoteliale (RES), accumulandosi nel fegato, nella milza, nel midollo e quindi in aree che potrebbero non essere quelle di interesse. Inoltre, fenomeni di aggregazione possono portare ad occlusione capillare, intrappolando le NPs nel fegato, nei polmoni etc.^[48] La coniugazione di PEG (polietilene glicole) alla superficie delle nanoparticelle (operazione chiamata *PEGylation*) può ridurre molti di questi problemi (Figura 2.1).

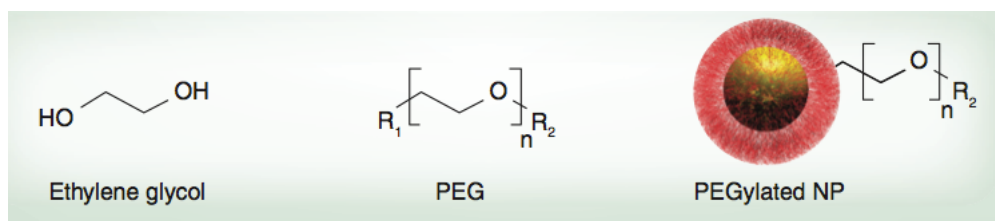


Figura 2.1: Monomeri di etilene glicole sono polimerizzati per formare PEG utilizzato per il coating di NPs. Il PEG contiene in genere un gruppo R_1 per legarsi alle NPs e un gruppo R_2 per legare altre funzionalità.^[47]

Nei campi dell'*imaging* e del *drug delivery*, l'aggiunta di PEG alla superficie delle particelle riduce il riconoscimento da parte del RES e incrementa il tempo di circolazione nell'organismo. La passivazione della superficie, diminuisce l'aggregazione e l'associazione con proteine non oggetto di *targeting*, portando ad un comportamento definito *stealth*. Le catene di PEG inoltre, aumentano la solubilità delle NPs grazie alle loro proprietà idrofiliche e riducono la carica superficiale riducendo le interazioni elettrostatiche con proteine e piccole molecole. Grazie a tutti questi attributi, NPs funzionalizzate con PEG si accumulano in organi quali il fegato e i polmoni in quantità molto inferiori rispetto a NPs non funzionalizzate, portando quindi ad un maggiore accumulo nelle zone di interesse. L'utilizzo di PEG è economico, versatile ed è approvato dalla FDA (*Food and Drug Administration*) in molte applicazioni.^[47]

2.2 Nanoparticelle di oro

Negli ultimi anni, molti agenti di contrasto a base di nanoparticelle, in particolare ossidi di ferro, sono stati utilizzati per T_2 MRI. Questi sono agenti di *imaging* negativi, e producono quindi un effetto di diminuzione del segnale.^[49] Nelle immagini, le risultanti zone scure hanno una risoluzione peggiore rispetto al contrasto positivo ottenibile con T_1 , e possono quindi essere confuse con altre condizioni patologiche. In particolare, a causa di questo, l'applicazione clinica di questi sistemi è stata limitata e al giorno d'oggi, gli agenti di contrasto più utilizzati a base di nanoparticelle sono agenti T_1 .^[49] Le nanoparticelle di oro vengono utilizzate per la loro biocompatibilità e perché possono essere il luogo in cui agenti per T_1 MRI vengono concentrati e migliorano la propria rilassività. Inoltre, esse offrono la possibilità di essere utilizzate per tecniche di *imaging* complementari a quella MRI come una tecnica ottica quale il SERS (*Surface Enhanced Raman Scattering*) che risulta avere grande risoluzione spaziale a scapito della scarsa penetrazione, al contrario di quella MRI che invece ha grande penetrazione ma minore risoluzione spaziale. AuNPs sono sintetizzabili in un vasto range dimensionale che va da dimensioni subnanometriche a centinaia di nanometri e possono essere facilmente funzionalizzate per esempio con tioli, che formano forti legami Au-S. La facilità di funzionalizzazione, permette spesso il raggiungimento di una sinergia tra proprietà delle AuNPs e delle funzioni ad esse legate. Inoltre, la formazione di una shell di materiali opportuni sulla superficie (in genere PEG), consente di evitare problemi di biocompatibilità.

2.2.1 Sintesi di AuNPs

Le nanoparticelle, per dimensione, si trovano a metà strada tra gli atomi (\AA) e il materiale massivo. La sintesi, tramite metodi di *bottom up*, parte da atomi o loro complessi e induce un assemblaggio fino alle dimensioni desiderate sfruttando, in genere, reazioni chimiche come per esempio la riduzione di ioni. La riduzione di complessi di Au per la formazione di nanoparticelle è sempre accompagnata dalla presenza di specie stabilizzanti che inibiscono una crescita eccessiva dei nuclei consentendo una distribuzione dimensionale abbastanza stretta. La via di sintesi più utilizzata è sicuramente la riduzione con citrato del complesso HAuCl_4 in H_2O . In questa sintesi il citrato opera sia da riducente che da stabilizzante creando, con le sue cariche, una repulsione elettrostatica tra le particelle. Una variante di questa preparazione consiste nell'introduzione di un altro agente stabilizzante assieme al citrato, come per esempio il mercaptopropionato sodico, che si lega più fortemente alla superficie della particella, contribuendo anch'esso con delle cariche negative alla repulsione elettrostatica tra particelle.^[50] L'uso di agenti stabilizzanti ingombrati, un maggiore rapporto surfattante/oro e il veloce abbassamento

2. *Imaging con nanoparticelle*

della temperatura appena avvenuta la reazione per la formazione delle nanoparticelle, sono tutti metodi adottati per cercare di controllare la distribuzione di dimensioni delle particelle. Una classe di agenti stabilizzanti molto utilizzata che interagiscono con gruppi funzionali che non siano tioli è quella dei polimeri. Benché sia usualmente preferito l'utilizzo di stabilizzanti tiolici, polimeri con altri gruppi funzionali coordinanti vengono utilizzati per favorire una successiva sostituzione. Infine, metodi fisici come ultrasuoni, irraggiamento laser nell'IR, fotochimica con raggi ultravioletti o trattamenti termici, vengono a volte accoppiati ai metodi di *bottom up* nel tentativo di aumentare il controllo dimensionale delle particelle.^[50]

I metodi *top down*, al contrario di quelli *bottom-up*, sono tipicamente dei metodi fisici e sintetizzano nanostrutture partendo dal materiale massivo. Tra le varie tecniche di sintesi, va sicuramente citata la *Laser Ablation Synthesis In Solvents* (LASIS), cioè l'ablazione di materiali massivi ricoperti da solventi, con impulsi laser usualmente di nanosecondi o femtosecondi. Alcuni dei vantaggi di questa sintesi sono:

- Sintesi di nanoparticelle senza l'utilizzo di leganti o stabilizzanti;
- Sintesi in vari solventi con la possibilità di una successiva funzionalizzazione in un singolo step;
- Spettri plasmonici utilizzabili per monitorare la dimensione e la funzionalizzazione delle particelle;
- Riproducibilità della sintesi;
- Sintesi di leghe di nanoparticelle utilizzando più di un metallo nella sintesi.

Questo metodo è stato utilizzato durante il progetto di tesi e viene quindi riportato con il dettaglio degli strumenti utilizzati nel laboratorio di ricerca ospitante. La tecnica si basa sull'irraggiamento di un target di Au ad elevata purezza (99.99 %), con impulsi laser Nd:YAG (1064nm) di 10 nanosecondi, ad una frequenza di 10Hz e una potenza media di circa 0.6 W su una superficie di circa 2 mm². La strumentazione consiste in una sorgente laser e un sistema di ottica per focalizzare il fascio su di un target di oro (o altro materiale) immerso nel solvente (Figura 2.2). I processi che avvengono al momento dell'ablazione non sono ancora del tutto chiari. Si è ipotizzato che l'ablazione inizi con l'assorbimento dei fotoni incidenti, a cui consegue un grande riscaldamento localizzato e la fotoionizzazione della superficie irradiata.^[51] Questi processi, nel tempo di poche decine di picosecondi, portano all'espulsione di materiale come vapore, gocce di metallo fuso, frammenti solidi e la formazione di una nube di plasma, ossia materiale ionizzato ad alta energia. Il fenomeno più importante è proprio l'instaurarsi di questa nube di plasma che viene contenuta in un'area relativamente piccola dal solvente circostante. In questo ambiente il materiale appena separato dal *bulk* viene mantenuto ad energie elevate per alcune decine di nanosecondi. In funzione della durata dell'impulso si generano,

2. Imaging con nanoparticelle

quindi, predominanze di differenti meccanismi di ablazione. Con impulsi di nanosecondi il materiale viene espulso mentre è ancora presente l'impulso. Al contrario, nel caso di impulsi dell'ordine di pico- o femtosecondi, il materiale viene estratto quando l'impulso si è già esaurito. Nel primo caso si assiste a una più ampia espansione della nuvola di plasma composta da atomi ionizzati e *clusters*.

In queste condizioni il plasma può assorbire parte della radiazione incidente, generando un ulteriore riscaldamento della nube e una omogeneizzazione del materiale ablato in termini di dimensioni e forma.^[51] Per ottenere questi risultati, un laser nel vicino-IR è il più adatto per l'ablazione di Au perché previene l'assorbimento della radiazione da parte delle risonanze plasmoniche del materiale ablato, che porterebbe a una minor potenza sul target e a fenomeni di frammentazione fotoindotta. Passato l'istante della separazione dal materiale massivo, gli atomi ionizzati e i piccoli frammenti e gocce di Au si trovano concentrati nelle strette vicinanze dello spot del laser e formano la nube di plasma. Si instaurano quindi dei veloci processi di nucleazione dovuti alla elevata energia e

concentrazione delle specie all'interno della nube. Mentre la nucleazione è veloce, la crescita è un fenomeno legato a processi diffusionali. La nube tenderà a disperdersi cedendo energia e materiale ablato all'intorno e perciò al solvente e ad eventuali soluti se presenti. Questa situazione comporta l'interazione di materiale nanostrutturato con specie molecolari con le quali possono anche instaurarsi delle reazioni.^{[51] [52]} Le nanoparticelle ottenute con questo metodo risultano avere delle superfici cariche e libere da surfattanti. Questo consente di avere soluzioni colloidali stabili anche senza l'aggiunta di altre molecole. Le nanoparticelle sono poi facilmente funzionalizzabili, date le loro superfici libere, senza la necessità di particolari processi di scambio e purificazione.

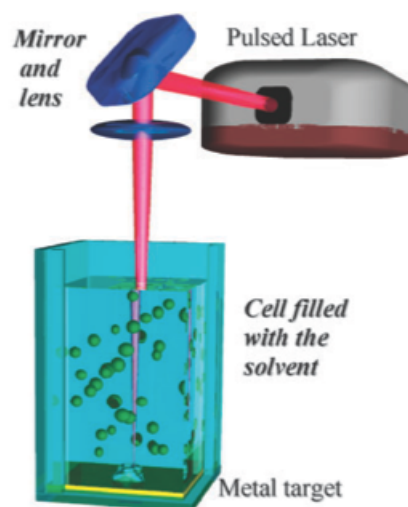


Figura 2.2: Illustrazione schematica dell'apparato minimo per condurre una LASIS.^{[51] [52]}

2.2.2 Risonanza plasmonica di superficie localizzata

Le nanoparticelle di alcuni metalli appaiono intensamente colorate in modo diverso rispetto al metallo in forma massiva, ad esempio quelle di argento hanno un colore giallo chiaro mentre quelle d'oro sono rosse. Quando le nanoparticelle metalliche interagiscono

2. Imaging con nanoparticelle

con un campo elettromagnetico (ad esempio la luce visibile) gli elettroni della banda di conduzione del metallo iniziano ad oscillare coerentemente con esso. Il campo elettrico incidente induce una polarizzazione degli elettroni di conduzione che comporta una ridistribuzione di cariche positive e negative sulla superficie della nanoparticella. A sua volta, questa ridistribuzione genera una forza di richiamo detta *restoring force*, che riporta il sistema alle condizioni iniziali. La conseguenza di tutto ciò è l'instaurarsi di un'oscillazione dipolare conosciuta come plasmone di superficie localizzato (LSP). La frequenza (o lunghezza d'onda) alla quale avviene l'eccitazione degli elettroni viene invece definita risonanza plasmonica superficiale localizzata (LSPR). Per molti metalli, la risonanza plasmonica risiede nella regione UV dello spettro elettromagnetico e quindi le rispettive nanoparticelle non mostrano particolari effetti di colore.

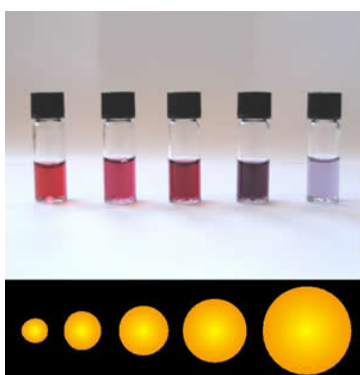


Figura 2.3: L'immagine mostra i colori di AuNPs di varie dimensioni in H₂O. Per particelle di piccole dimensioni si ha un colore rosso chiaro, che diventa sempre più scuro all'aumentare delle dimensioni.

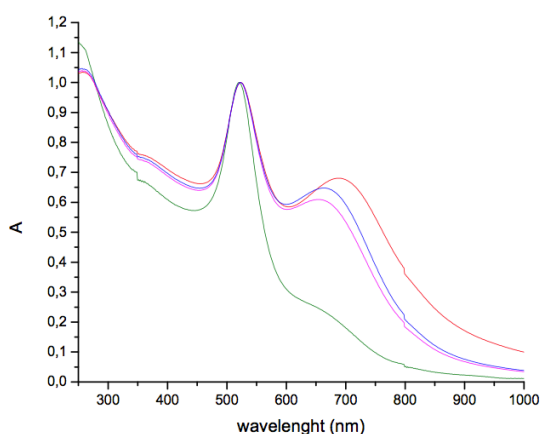


Figura 2.4: Spettro UV-Vis di AuNPs in H₂O con diverse dimensioni. Qui le particelle sono state aggregate con il colorante NPCySH formando AuNPs più grandi che presentano quindi un picco a lunghezze d'onda maggiori. (Fonte di laboratorio).

Le nanoparticelle d'oro invece hanno una LSPR localizzata a circa 520 nm (per AuNP con diametro di circa 20 nm) che le fa apparire rosse. La LSPR non è situata sempre alla stessa lunghezza d'onda, ma dipende da dimensione (Figura 2.3) e forma delle nanoparticelle nonché dal tipo di solvente nel quale sono immerse e dal tipo di leganti presenti sulla superficie (Figura 2.4). Il fisico tedesco Gustav Mie nel 1908 fu il primo a razionalizzare la natura del plasmone di risonanza e la sua teoria descrive l'estinzione (assorbimento e scattering) di nanoparticelle sferiche di dimensioni arbitrarie.^[50] La teoria di Mie parte dall'assunzione che la particella e il mezzo nella quale è immersa, siano omogenei e descrivibili mediante le funzioni dielettriche dei rispettivi *bulk*. Per mettere in relazione la frequenza di risonanza del plasmone della nanoparticella con la costante dielettrica si considera l'interazione della luce con una particella molto più piccola della lunghezza d'onda della luce incidente, $\lambda \gg 2R$, dove R è il raggio della particella. Sulla base di ciò, il campo elettrico incidente può essere considerato costante lungo tutta la

2. Imaging con nanoparticelle

particella. Questo tipo di approssimazione è denominata quasi-statica e prevede una distribuzione dipolare delle cariche sulla particella. In approssimazione quasi-statica la sezione d'urto totale σ_{ext} è descritta dalla seguente equazione:

$$\sigma_{ext} = 9 \frac{\omega}{c} \epsilon_m^{\frac{3}{2}} V \frac{\epsilon_2(\omega)}{[2\epsilon_m + \epsilon_1(\omega)]^2 + \epsilon_2(\omega)^2} \quad (2.1)$$

dove V è il volume della particella, ω è la frequenza angolare della radiazione incidente, c è la velocità della luce, ϵ_m è la costante dielettrica del mezzo mentre ϵ_1 e ϵ_2 sono rispettivamente la parte reale e immaginaria della costante dielettrica del metallo di cui è composta la nanoparticella. La condizione di risonanza si verifica quando $\epsilon_1 = -2\epsilon_m$, con σ_{ext} che assume in genere valori molto elevati. Questa condizione si ottiene per frequenze prossime a quella della risonanza plasmonica del metallo. Risulta altresì chiaro come il solvente o molecole che funzionalizzano la superficie siano di fondamentale importanza nel determinare la frequenza di risonanza in quanto mezzi diversi possiedono costanti dielettriche diverse.

2.2.3 Raman scattering e SERS^[53]

Con diffusione o *scattering* Raman si intende lo studio della luce diffusa da parte di un mezzo materiale. Lo *scattering* deriva dalla polarizzazione prodotta nel materiale da un campo elettrico $\vec{E}(\omega)$ con esso interagente. Se il materiale è formato da N molecole con una polarizzabilità α , la polarizzazione risulta essere:

$$\vec{P} = N \underline{\alpha} \cdot \vec{E}(\omega) \quad (2.2)$$

dove $\underline{\alpha}$ è la polarizzabilità della singola molecola e dipende quindi dalle sue proprietà. In particolare, poiché dipende dalla posizione di elettroni e nuclei, essa dipenderà anche dalle vibrazioni molecolari che spostano i nuclei dalle loro posizioni di equilibrio. La dipendenza della polarizzabilità da una coordinata normale di vibrazione può essere descritta, dall'espansione in serie:

$$\alpha(Q) = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right)_{eq} Q + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 \alpha}{\partial Q^2} \right)_{eq} Q^2 + \dots \quad (2.3)$$

dove α_0 è la polarizzabilità della molecola nella posizione di equilibrio dei nuclei. Esprendo la coordinata normale come $Q = Q_0 \cos(\omega_v t)$ con ω_v la frequenza vibrazionale del modo normale e il campo elettrico come $E = E_0 \cos(\omega t)$, possiamo scrivere la polarizzazione come:

$$P = N \left\{ \alpha_0 E_0 \cos(\omega t) + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right)_{eq} E_0 Q_0 \cos(\omega_v t) \cos(\omega t) + \dots \right\} \quad (2.4)$$

2. Imaging con nanoparticelle

Troncando l'espansione al secondo termine e ricordando che $\cos(\alpha)\cos(\beta) = 1/2\cos(\alpha + \beta) + 1/2\cos(\alpha - \beta)$ possiamo scrivere la polarizzazione come:

$$P = N \left\{ \alpha_0 E_0 \cos(\omega t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right)_{eq} E_0 Q_0 \left(\cos[(\omega + \omega_v)t] + \cos[(\omega - \omega_v)t] \right) \right\} \quad (2.5)$$

Se nell'espansione in serie ci fermiamo al termine α_0 , la polarizzazione macroscopica è data da $P = N\alpha_0 E_0 \cos(\omega t)$ con le molecole che oscillano solo alla frequenza del campo. In questo caso, la radiazione diffusa dalle molecole è definita *Rayleigh scattering* e possiede una frequenza ω uguale a quella del campo applicato. Se invece consideriamo il primo termine dell'espansione, la polarizzazione non oscilla più alla frequenza del campo incidente, ma a frequenze $\omega - \omega_v$ (*Raman Stokes*) e $\omega + \omega_v$ (*Raman antistokes*). Qualsiasi sistema molecolare possiede una propria polarizzabilità e quindi tutte le molecole mostreranno uno *scattering* di Rayleigh in presenza di un campo applicato. Lo *scattering* Raman, invece, potrà essere osservato solo per le vibrazioni che modulano il tensore polarizzabilità. Per questa ragione i modi normali di vibrazione possono essere Raman-attivi o Raman-non attivi. In presenza di plasmoni di superficie localizzati (LSP) si ottengono spettri Raman molto più intensi e la tecnica viene chiamata *Surface Enhanced Raman Scattering* (SERS). Questa tecnica sfrutta i campi locali molto più intensi generati da nanostrutture in cui gli LSP vengono eccitati. Una molecola che si trovi a contatto con una nanoparticella mostra quindi un notevole incremento del segnale Raman. Si possono raggiungere *enhanced factor* (EF) ancora maggiori se la specie molecolare ha un assorbimento nella stessa zona in cui cade l'assorbimento del LSP, in tal caso i tre sistemi (molecola, plasmon e radiazione) entrano in risonanza tra loro e la tecnica viene chiamata SERRS (*Surface Enhanced Resonant Raman Scattering*).

2.2.4 AuNPs per MRI

Agenti di contrasto T_1 a base di gadolinio, sono stati incorporati in nanomateriali di varia natura come silice, nanotubi di carbonio e nanodiamanti ottenendo buoni contrasti dovuti all'elevato numero di ioni Gd^{3+} caricati e alla bassa velocità di rotazione dei nanosistemi. Ulteriori vantaggi di questi sistemi derivano dall'aumento del tempo di circolazione nel sangue e dalla possibilità di multifunzionalità, consentendo per esempio analisi ottiche e magnetiche su uno stesso sistema.^[54] Per complessi di gadolinio legati a nanodiamanti sono stati osservati tempi di rilassamento maggiori di un ordine di grandezza rispetto al complesso isolato. In altri casi, particelle di silice mesoporose sono state funzionalizzate con agenti T_1 formando particelle capaci di operare *drug delivery*, creando i presupposti per funzionalità terapeutiche.^[5] Un esempio di multifunzionalità si ha nella sintesi di nanoparticelle magnetiche ibride MHNPs (*magnetic lipid-polymer hybrid nanoparticles*).

2. Imaging con nanoparticelle

Il sistema (Figura 2.5) è composto da un core idrofobico di PLGA (*polylactic acid-co-glycolic acid*) che contiene $\sim 5\%$ in peso di particelle di ossidi di ferro (USPIO); il lipide interagisce con il core tramite la coda idrofobica mentre lega sulla testa polare i complessi di Gd. Il tutto è stabilizzato da uno strato esterno di PEG.

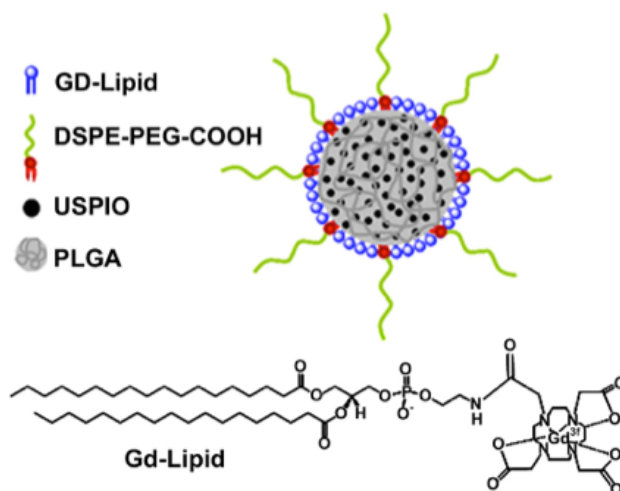


Figura 2.5: Rappresentazione schematica del sistema MHNPs. ^[55]

Nanoparticelle di oro (AuNP) sono sicuramente una delle basi più interessanti per l'ancoraggio di agenti di contrasto. AuNP sono facilmente sintetizzabili con un ampio range dimensionale, biocompatibili e resistenti all'ossidazione. Sono inoltre facilmente funzionalizzabili tramite la reazione con tioli, formando legami stabili Au-S. ^[56] La dimensione delle particelle è molto importante, e particelle piccole comportano solo modesti aumenti di rilassività, dovuti ad un'elevata velocità di rotazione. Aumentando le dimensioni delle particelle da qualche nanometro, a una decina di nanometri è possibile invece aumentare il tempo di rilassamento, ^[4] portando ad un aumento del contrasto nelle immagini. Un altro parametro da valutare è la carica superficiale delle particelle, che pesa sul tempo di circolazione nel sangue. Forti cariche positive e negative portano ad una precoce eliminazione dell'agente dall'organismo. Per ovviare a questo problema, le nanoparticelle sono spesso funzionalizzate con polimeri biocompatibili, tra cui il più interessante è sicuramente il polietilene glicole. Grazie alla funzionalizzazione con PEG, le AuNP vengono celate all'organismo, e hanno quindi il tempo di raggiungere i siti di interesse. ^{[5][18]}

In Figura 2.6 sono mostrate delle AuNPs funzionalizzate con leganti DTDTPA, (analoghi del DTPA con due tioli per legarsi alle AuNPs). Quello che si forma è una robusta *shell* multistrato che assicura una buona stabilità al sistema su un ampio range di pH e che consente di legare facilmente un grande numero di ioni Gd³⁺. Nanoparticelle delle dimensioni di 2nm possono legare fino a 150 ioni ed esibiscono una rilassività molto più elevata ($586 \text{ nM}^{-1}\text{s}^{-1}$) rispetto al solo complesso ($3 \text{ nM}^{-1}\text{s}^{-1}$). ^[57]

2. Imaging con nanoparticelle

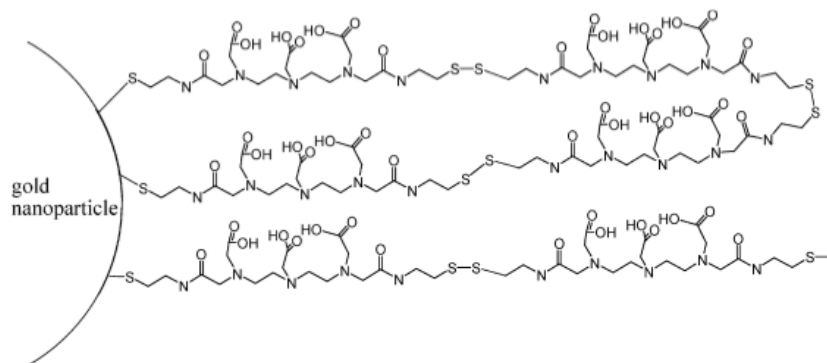


Figura 2.6: Schema illustrativo di AuNPs con shell di DTTPA. ^[57]

AuNPs sono state efficacemente impiegate anche per MRI cellulare. Il sistema è mostrato in Figura 2.7. Lo scheletro della molecola è un frammento di DNA, con agli estremi un tiolo e una cianina. Le basi nucleotidiche formanti la catena, sono state modificate ad intervalli regolari con gruppi $-N_3$ utilizzati per legare i complessi DTPA-alchino tramite reazione di *click chemistry* (cicloaddizione di Huisgen azide-alchino). Infine, il sistema DNA-DTPA è stato legato alle AuNPs formando un legame Au-S stabile. Questo sistema esibisce eccellenti proprietà di biocompatibilità, stabilità, un elevato numero di ioni Gd^{3+} per nanoparticella e un'elevata relaxività (Tabella 2.1). L'assorbimento nelle cellule, è 50 volte maggiore se comparato con agenti di contrasto disponibili clinicamente. In particolare, osservazioni tramite microscopia a fluorescenza, mostrano l'accumulo dell'agente in piccole vescicole della regione perinucleare (Figura 2.8).

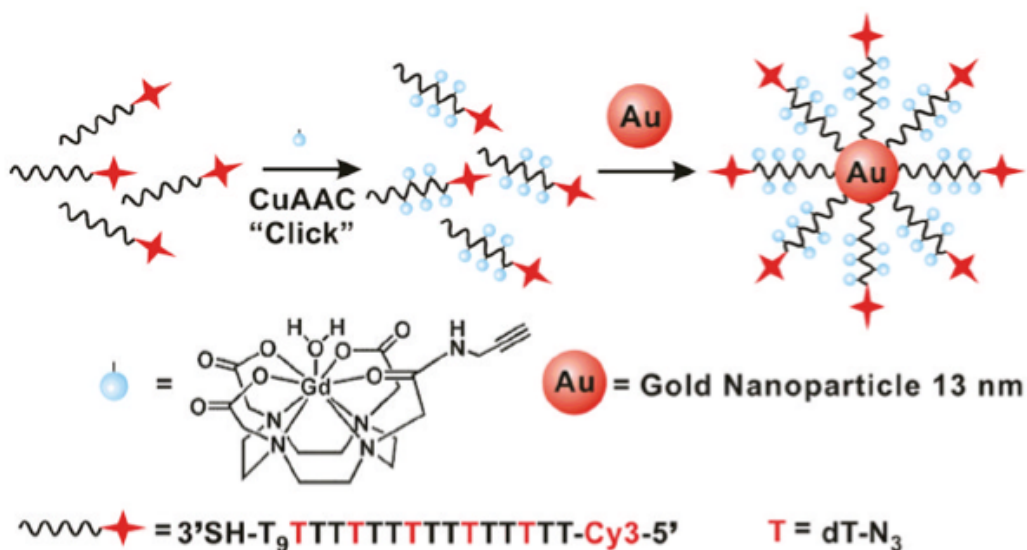


Figura 2.7: Illustrazione schematica del sistema Cy3-DNA-Gd(III)-AuNPs. ^[58]

2. Imaging con nanoparticelle

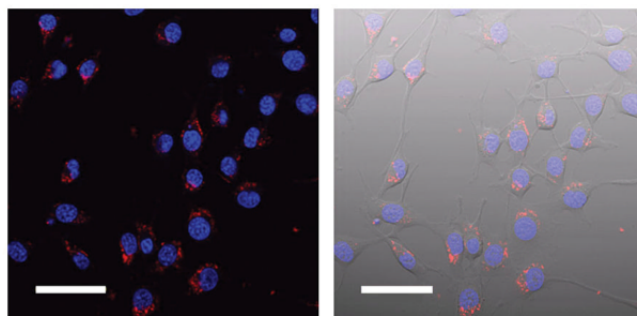


Figura 2.8: Microscopia a fluorescenza di cellule incubate con 0.2 nM dell'agente Cy3-DNA-Gd(III)-AuNPs per 24 h e trattate con DAPI 1 μ M per 10 minuti. A sinistra è mostrata l'unione dei canali blu (DAPI) e rosso (Cy3-DNA-Gd(III)-AuNPs). A destra è mostrata la sovrapposizione con immagine a luce trasmessa. Scala 50 μ m.^[58]

Anche sistemi misti Au-Fe presentano proprietà interessanti. Nanoparticelle superparamagnetiche di ossidi di ferro (SPIO con un core di silice) ricoperte da *nanoshell* di oro (Figura 2.9), mostrano una buona combinazione degli effetti dei due metalli. L'ossido di ferro fornisce il magnetismo, mentre la *shell* consente di sfruttare le proprietà ottiche dell'oro. Il sistema esibisce un'elevata relaxività r_2 , e può quindi essere utilizzato per MRI T₂. Inoltre, queste particelle ibride mostrano un significativo assorbimento nella regione del vicino infrarosso (NIR), caratteristica che può essere sfruttata in terapie fototermiche.^[59]

Tabella 2.1: Relaxività di complessi di Gd³⁺ coniugati a DNA e AuNPs.^[58]

	r_1 (mM ⁻¹ s ⁻¹)
DOTA-Gd(III)	3.2
DNA-Gd(III)	8.7
13 nm DNA-Gd(III)-AuNPs	16.9
30 nm DNA-Gd(III)-AuNPs	20

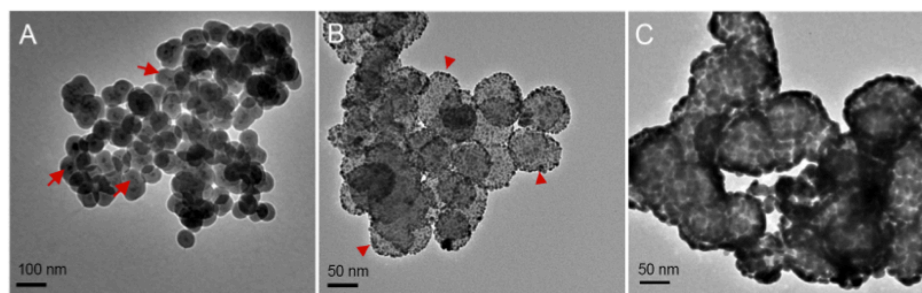


Figura 2.9: Immagini TEM di (A) nanoparticelle SPIO con core di silice, (B) nanoparticelle SPIO con core di silice e *nanoseeds* di oro in superficie e (C) SPIO con *nanoshell* di oro.^[59]

3. Scopo della tesi

Nei paragrafi precedenti, abbiamo riassunto brevemente le principali tecniche per aumentare la rilassività degli agenti di contrasto commercialmente disponibili, in particolare per gli agenti T_1 . Il lavoro di tesi è stato ideato per sintetizzare un nuovo nanosistema che riassume in sé tutti questi aspetti positivi. Un precedente progetto, sviluppato nel laboratorio ospitante aveva permesso la sintesi del sistema schematizzato in Figura 3.1. Questo sistema prevede la coniugazione del complesso [Gd(DOTA)] ad una catena PEG di 3000 Da, il tutto coniugato a nanoparticelle di oro. L'analisi MRI *in vivo* del composto, ha mostrato assenza di segnali mentre analisi ICP-MS hanno mostrato un rapporto di circa $6 \cdot 10^3$ ioni $Gd^{3+}/AuNP$. Data la mancanza di segnale MRI, il contenuto di Gd^{3+} è stato ritenuto insufficiente. Per questo si è pensato di progettare un nuovo polimero che abbia una maggiore numero di siti leganti.

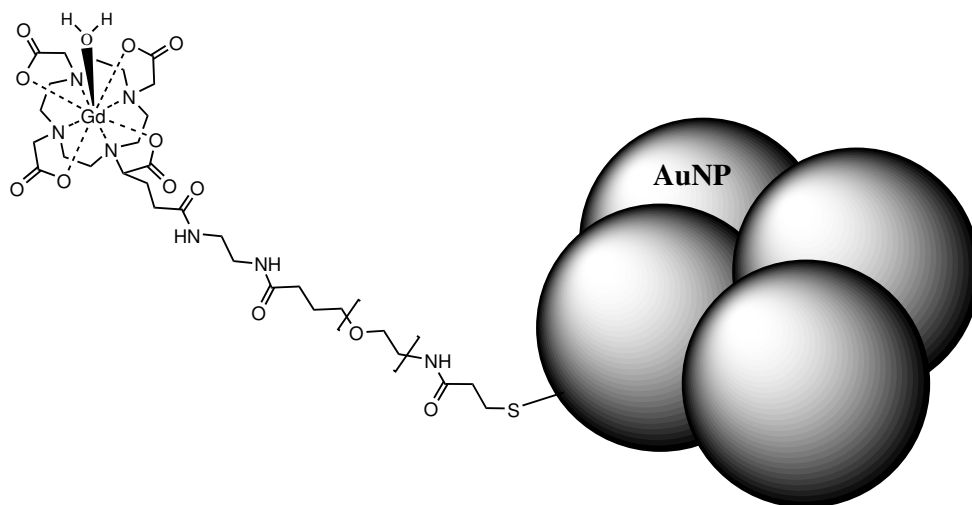


Figura 3.1: Illustrazione schematica del nanosistema sintetizzato nei nostri laboratori analizzato con MRI *in vivo* e ICP-MS.

Il progetto di tesi è stato sviluppato per sintetizzare un nanosistema che consenta di combinare una tecnica di *imaging* come MRI o anche PET o CT, con la tecnica SERS. Quest'ultima è poco penetrante, ma possiede una risoluzione spaziale maggiore rispetto

3. Scopo della tesi

alle comuni tecniche di *imaging*, che sono invece più penetranti ma meno spazialmente risolte. Il progetto ha centrato l'attenzione sull'utilizzo della tecnica MRI da abbinare alla tecnica SERS dato che esempi di questo tipo sono ancora pochi. Uno di questi ha avuto particolare rilievo su Nature Medicine nel 2012 ed è stato prodotto dal gruppo di Gambhir^[60]. In questo lavoro, la tecnica MRI è stata utilizzata per evidenziare un tumore in profondità nel cervello, mentre la SERS è stata utilizzata per aiutare l'operazione di asportazione del tumore, evidenziando il confine tra tessuto malato e sano. Risulta perciò chiaro come sia importante combinare, all'interno dello stesso sistema, tecniche con caratteristiche complementari.

Il principale obiettivo di questa tesi è stato quello di sintetizzare un sistema di contrasto efficiente per la tecnica MRI, da accoppiare ad un sistema plasmonico nanostrutturato con proprietà SERS.

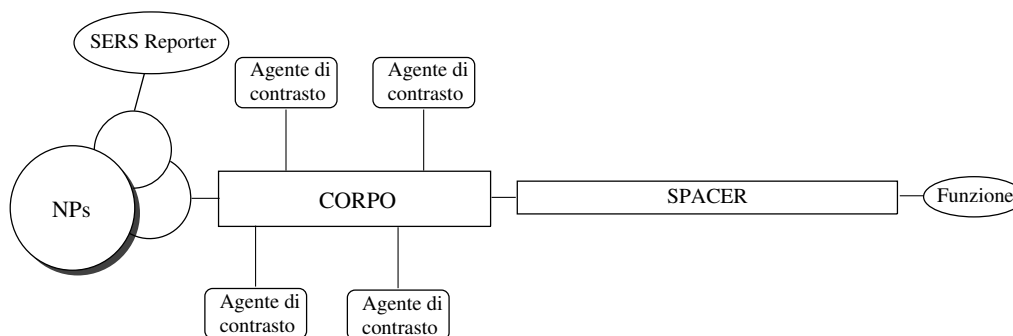


Figura 3.2: Illustrazione schematizzata dei componenti costituenti il sistema da sintetizzare.

In Figura 3.2 è mostrato uno schema illustrativo delle parti essenziali del sistema da sintetizzare:

- **Agente di contrasto.** La base essenziale di un sistema per MRI è la presenza di un agente di contrasto, in questo caso Gd^{3+} . Questo dovrà essere opportunamente complessato con dei leganti che verranno poi coniugati al resto del sistema;
- **Nanoparticelle.** Abbiamo visto nel capitolo 2, che agenti di contrasto legati a NPs mostrano una maggiore relaxività e permettono di sfruttare le proprietà delle stesse NPs nel prodotto finale. La funzionalizzazione di NPs con complessi di Gd^{3+} consente di aumentare anche il numero di ioni per unità di agente. Inoltre, le AuNPs sono essenziali per sviluppare la tecnica SERS, come descritto nel paragrafo 2.2.3;
- **SERS-Reporter** Per poter sfruttare la tecnica SERS è necessario avere una specie che fornisca uno spettro Raman caratteristico;

3. *Scopo della tesi*

- **Funzione.** La possibilità di coniugare funzioni specifiche amplia i campi di applicazione del sistema sintetizzato. Un esempio è la coniugazione di agenti di *targeting* come anticorpi e proteine, che consentono di fare *imaging* molecolare;
- **Spacer.** Lo *spacer* ha il compito di modulare alcune delle proprietà del sistema. Essendo la parte più esposta una volta all'interno dell'organismo (assieme alla funzione), dovrà possedere proprietà idrofiliche per rendere solubile l'agente. Inoltre, il suo compito è anche quello di aumentarne il tempo di circolazione nell'organismo, conferendogli proprietà *stealth*;
- **Corpo.** Il corpo è forse la parte più importante perché ha il compito di legare a sé tutti i pezzi del sistema in modo semplice e pratico, mantenendo allo stesso tempo una buona stabilità.

Questi componenti principali sono stati pensati per rendere possibile la sintesi di sistemi in cui la tecnica SERS possa essere accoppiata a diverse tecniche di *imaging*. Durante il lavoro di tesi abbiamo sviluppato un sistema per MRI e quindi abbiamo utilizzato come agente di contrasto il Gd^{3+} . Sostituendo il gadolinio con ^{68}Ga o gruppi ioduro per esempio, è possibile sintetizzare agenti di contrasto rispettivamente per la tecnica PET e CT. La strategia di sintesi permette quindi, modificando un solo componente, di cambiare la tecnica di applicazione del sistema.

4. Risultati e Discussioni

Lo scopo del progetto di tesi è quello di sviluppare un sistema multitecnica SERS-MRI come mostrato in Figura 4.1. Passeremo ora ad analizzare più in dettaglio le varie componenti del sistema, motivando le decisioni che hanno portato alla scelta dei vari costituenti.

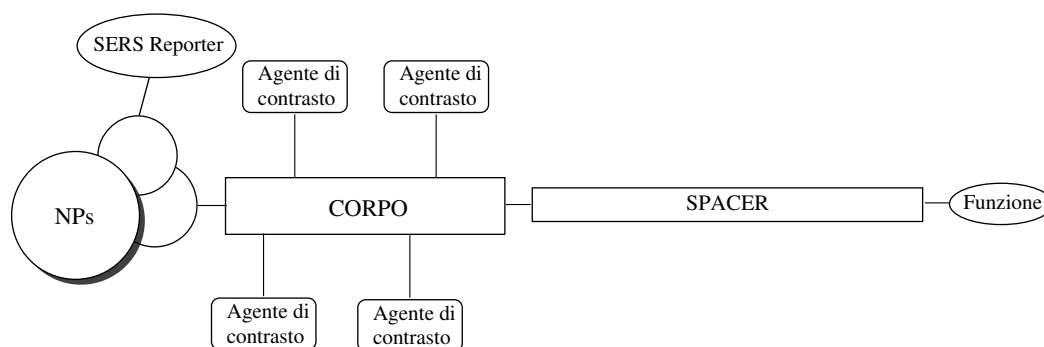


Figura 4.1: Illustrazione schematizzata dei componenti costituenti il sistema da sintetizzare.

L'agente di contrasto scelto è il Gd^{3+} che, data la sua tossicità, deve essere opportunamente complessato. Nel paragrafo 1.2.1 abbiamo illustrato come il macrociclo DOTA formi i complessi più stabili termodinamicamente e cineticamente. La nostra scelta è ricaduta per cui su questo legante. Il passo successivo è decidere come legare il complesso al corpo del sistema. Nel paragrafo 1.2.2.1 abbiamo spiegato i vantaggi delle reazioni di *click chemistry*, in particolare della cicloadizione di Huisgen. Abbiamo quindi deciso di sfruttare questa reazione, in particolare la cicloadizione di Huisgen *Cu-free* tra azide e alchino. Si è scelto di mettere il gruppo alchino sul complesso di gadolinio, che reagirà con gruppi azido contenuti nel corpo del sistema.

Per quanto riguarda le **nanoparticelle** (NPs) la scelta è ricaduta sull'oro. AuNPs sono sicuramente le più indicate per un agente T_1 e nel paragrafo 2.2 abbiamo indicato i diversi vantaggi derivanti dal loro utilizzo. Tra i vari vantaggi, la presenza di LSP permette di poter sfruttare la tecnica SERS. Funzionalizzare le AuNPs oltre che con complessi di Gd^{3+} anche con **SERS-Reporter**, consente quindi di sviluppare un sistema che sfrutti la tecnica MRI più penetrante ma poco spazialmente risolta e la tecnica SERS

4. Risultati e Discussioni

meno penetrante ma più spazialmente risolta. Il SERS-*reporter* scelto per la sintesi è il colorante NPCySH (Figura 4.2). Grazie alla presenza di due gruppi tiolo, ogni molecola di colorante può legare fino a due AuNPs, consentendo quindi la loro aggregazione (Figura 2.4). L'aggregazione delle AuNPs è molto importante, in quanto permette la presenza di *Hot Spot* che aumentano il campo elettrico locale, amplificando l'*enhanced* della tecnica SERS.

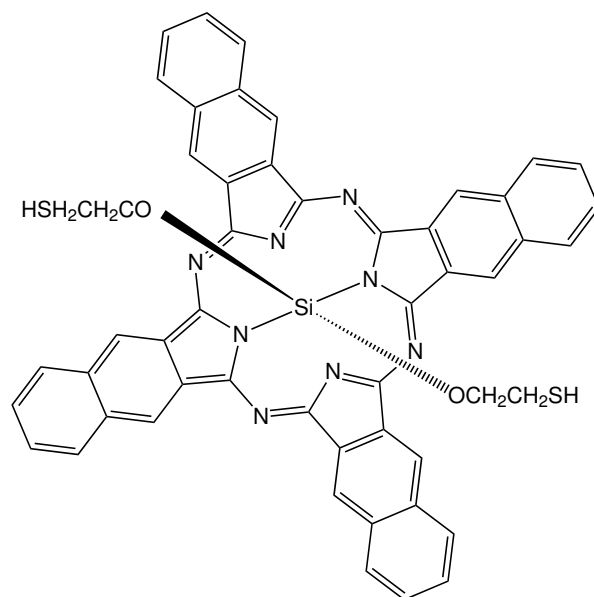


Figura 4.2: Struttura del colorante NPCySH.

Nel paragrafo 2.1 abbiamo visto che la funzionalizzazione della superficie di NPs con catene di PEG riduce il loro accumulo nei principali organi e incrementa il tempo di circolazione nell'organismo. Alla luce di ciò, abbiamo deciso di utilizzare una catena di PEG come **spacer** del sistema. Nel nostro caso specifico il PEG non è direttamente legato alle AuNPs, ma in ogni caso rappresenta la parte più esposta, che verrà quindi a contatto con l'organismo. Lo *spacer* scelto (Figura 4.5) è una catena di PEG da circa 2kDa (PEG_{2kDa}) e funzionalizzata con un gruppo metossi e un gruppo carbossile. Il gruppo carbossile verrà utilizzato per legare lo *spacer* al corpo, mentre il gruppo metossi verrà successivamente sostituito da un gruppo funzionale che consenta l'aggancio della **funzione** al nostro sistema. La funzione da attaccare al nanosistema sarà idealmente un anticorpo che consenta il *targeting* con determinati recettori cellulari.

L'ultimo pezzo del sistema, il **corpo**, dovrà unire attorno a sé tutti i frammenti fin qui visti. Le caratteristiche del corpo dovranno essere:

- Presenza di gruppi azido lungo la struttura per dare reazione di *click chemistry* con il complesso del gadolinio;

4. Risultati e Discussioni

- Un gruppo che consenta la coniugazione con lo *spacer*, nel nostro caso un gruppo amminico che reagisca con l'acido carbossilico del PEG_{2kDa};
- Infine, data la scelta di usare AuNPs, il corpo dovrà avere anche un gruppo tiolo per legarsi facilmente alla loro superficie.

Per adempiere a tutte queste funzioni abbiamo deciso di progettare il corpo mediante sintesi su fase solida. Grazie a questa sintesi è possibile formare una catena di *building blocks* (in genere amminoacidi), ognuno con diverse caratteristiche. La funzione tiolo, necessaria per la coniugazione alle AuNPs, è introdotta tramite l'inserimento in catena dell'amminoacido cisteina. Seguiranno alternati, un *building block* contenente un gruppo azido (BB-Azide) e un *building block* contenente una catena con 12 unità di glicole etilenico (BB-PEG₁₂). Il ruolo del BB-PEG₁₂ è quello di creare una certa distanza tra i complessi di gadolinio, una volta che saranno legati al polimero. Il corpo sarà formato

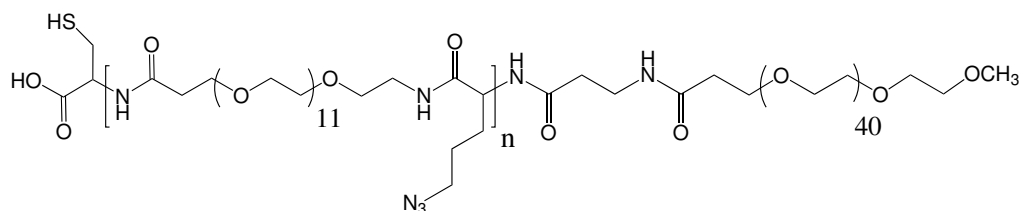


Figura 4.3: Il corpo del sistema è sintetizzato tramite sintesi su fase solida, a partire dall'amminoacido cisteina, alternando *building blocks* contenenti gruppo azido e PEG₁₂. Lo *spacer* è la parte terminale, rappresentata da una lunga catena di PEG (PEG_{2kDa} con circa 40 unità di PEG).

alternando questi due *building blocks* per un totale di 6 residui. L'ultimo passaggio della sintesi sarà l'attacco dello *spacer* (PEG_{2kDa}) che chiuderà quindi la catena. Da questa sintesi, si ottiene un polimero come mostrato in Figura 4.3.

I complessi del gadolinio verranno legati al corpo, come già detto, tramite cicloaddizione di *Huisgen Cu-free*. Gli ultimi step di sintesi del nanosistema saranno l'attacco della funzione e la funzionalizzazione delle AuNPs tramite la formazione di legami Au-S.

Il sistema sintetizzato e analizzato con MRI durante il periodo di tesi è mostrato in Figura 4.4.

4. Risultati e Discussioni

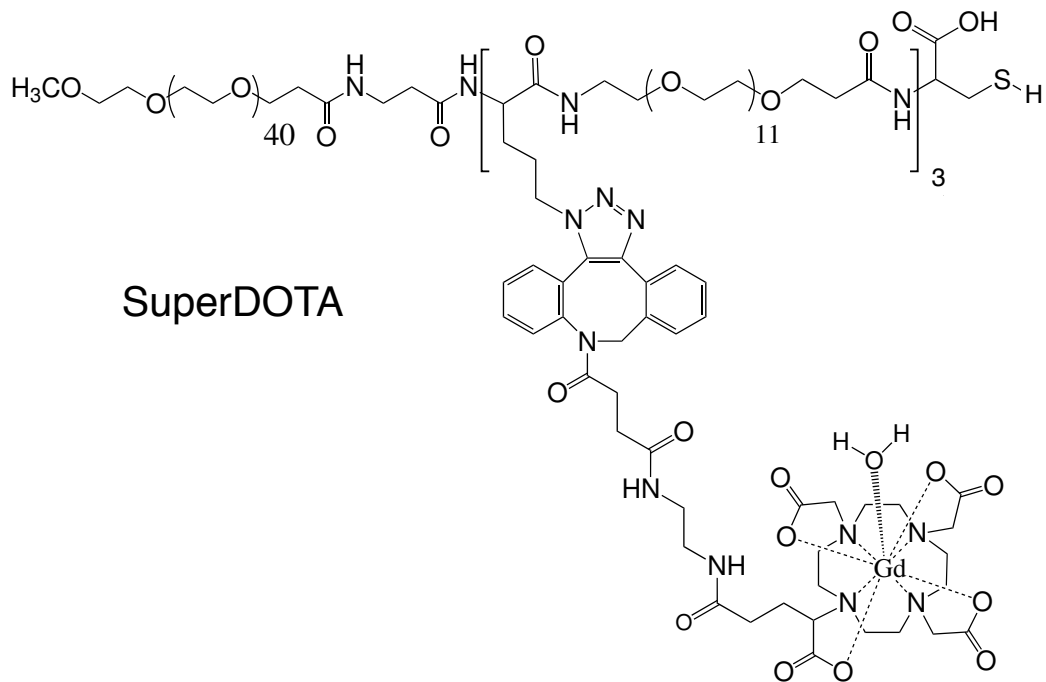


Figura 4.4: Nanosistema sintetizzato e analizzato con MRI *in vitro* durante il periodo di tesi, denominato superDOTA.

4.1 Sintesi su fase solida del polimero funzionalizzato

La sintesi del polimero mostrato in Figura 4.3 è stata fatta col procedimento della sintesi su fase solida. Questa rappresenta un metodo efficace per sintetizzare oligomeri di amminoacidi di piccole e medie dimensioni. Rispetto alla sintesi in soluzione presenta vari vantaggi:

- Possibilità di portare a completezza la reazione, utilizzando un eccesso di reagenti solubili, facilmente eliminabili per filtrazione;
- Rimozione dei sottoprodotti indesiderati, sempre per filtrazione, con conseguente semplificazione della fase di purificazione;
- Possibilità di automatizzazione del processo.

Anche se sviluppata per la sintesi di peptidi, può essere utilizzato per costruire oligomeri di amminoacidi non proteici. La sequenza è sintetizzata dall'estremità C-terminale verso l'N-terminale, con il gruppo carbossilico dell'ultimo amminoacido legato ad un supporto solido (resina) tramite un *linker*. L'ancoraggio ad una matrice insolubile costituisce il vantaggio principale di questa tecnica, in quanto permette di condurre l'intera sintesi nello stesso contenitore, con il prodotto che viene isolato dopo ogni ciclo attraverso semplice filtrazione. Come supporto insolubile è stata usata una resina di clorometil-polistirene modificato con alcol 4 idrossi-benzilico che fa da *linker* e consente il rilascio del prodotto dalla resina, al termine della sintesi, come acido carbossilico. Nel nostro caso, abbiamo utilizzato una resina Wang precaricata con l'amminoacido cisteina, con le protezioni Fmoc per la funzione amminica, e tritile per il gruppo tiolico in catena laterale come mostrato in Figura 4.5. Nella stessa figura sono mostrati anche gli altri *building blocks* (BB) usati per la sintesi del polimero, che contengono agli estremi i tipici gruppi di un amminoacido, un acido carbossilico e un gruppo amminico qui protetto il gruppo Fmoc (Fluorenilmetilossicarbonil).

Ogni ciclo di sintesi, che corrisponde all'attacco di un nuovo residuo alla resina, comprende tre passaggi fondamentali:

1. La deprotezione del gruppo Fmoc dalla funzione α -amminica dell'amminoacido resina, che avviene per trattamento della resina con una soluzione di piperidina al 20% in DMF;
2. La condensazione del nuovo Fmoc-amminoacido sulla catena peptidica in crescita (reazione di acilazione). Gli amminoacidi da inserire in catena sono attivati come esteri attivi dell'N-idrossibenzotriazolo;

4. Risultati e Discussioni

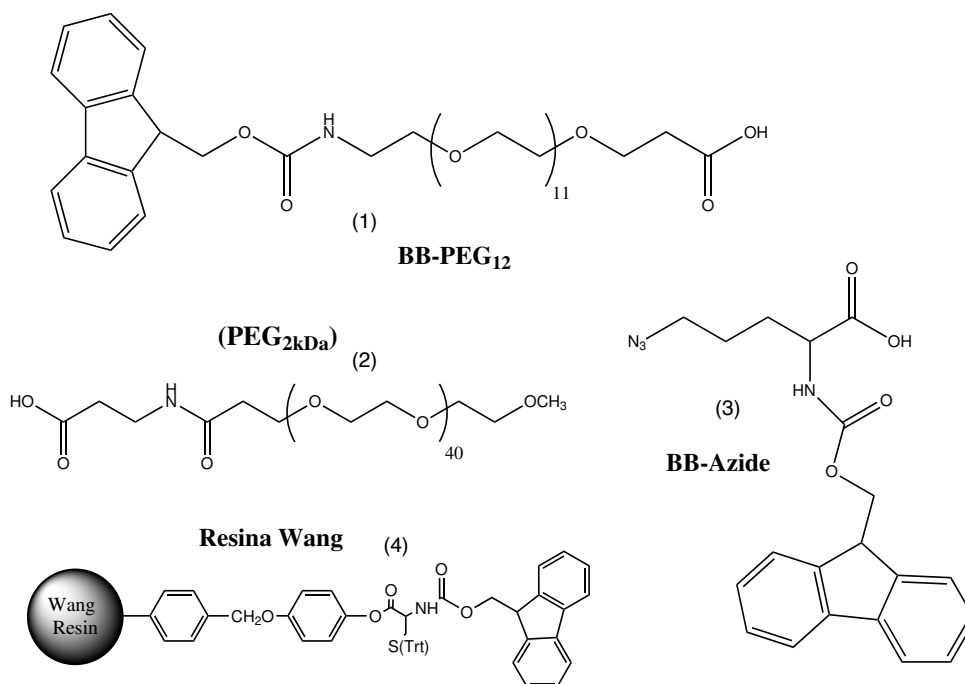


Figura 4.5: Reagenti utilizzati nella sintesi del polimero (BB è l'acronimo per *building block*). BB-PEG₁₂: Fmoc-NH-PEG₁₂-COOH. BB-Azide: (S)-5-Azido-2-(Fmoc-amino) pentanoic acid. PEG_{2kDa}: CH₃O-PEG₄₀-NHCO-C₂H₄-COOH. Resina Wang: Fmoc-Cys(Trt)-Wang resin LL (100-200 mesh) 0.30 mmol/g.

3. Dopo l'introduzione dell'ultimo residuo, il trattamento con miscela di sblocco per 90 minuti (95% TFA, 2.5% TIS e 2.5% H₂O) stacca il peptide dalla resina. Il trattamento con la miscela di sblocco deprotegge anche la funzione tiolo, rimuovendo il gruppo tritile.

Lo schema di sintesi seguito è illustrato in Figura 4.6. Per la nomenclatura dei prodotti abbiamo deciso di attenerci al numero di *couplings* effettuati, per cui i prodotti dopo 4, 6 e 7 *couplings* sono stati denominati **4c**, **6c** e **7c** (Figura 4.6). Il prodotto con 6 *couplings* effettuati, in cui però il gruppo amminico non è stato liberato dal gruppo protettore Fmoc è stato denominato **6c-Fmoc**.

Nel nostro caso, la sintesi su fase solida si è dimostrata un buon metodo per ottenere il polimero di interesse. I diversi amminoacidi sono entrati in modo quantitativo sulla catena in crescita come dimostrato dall'analisi dei prodotti intermedi **4c** e **6c**. Oltre a questi intermedi, è stato isolato anche l'intermedio **6c-Fmoc**, con il gruppo Fmoc ancora attaccato alla funzione amminica. Infatti, l'intermedio **6c** diventa così idrofilico che, analizzato con HPLC, esce col fronte dell'eluente anche in una colonna con fase inversa costituita da lunghe catene alchiliche (C₁₈). La presenza del gruppo Fmoc abbassa l'idrofilicità dell'intermedio, rendendo possibile l'analisi HPLC. L'ultimo step della sintesi,

4. Risultati e Discussioni

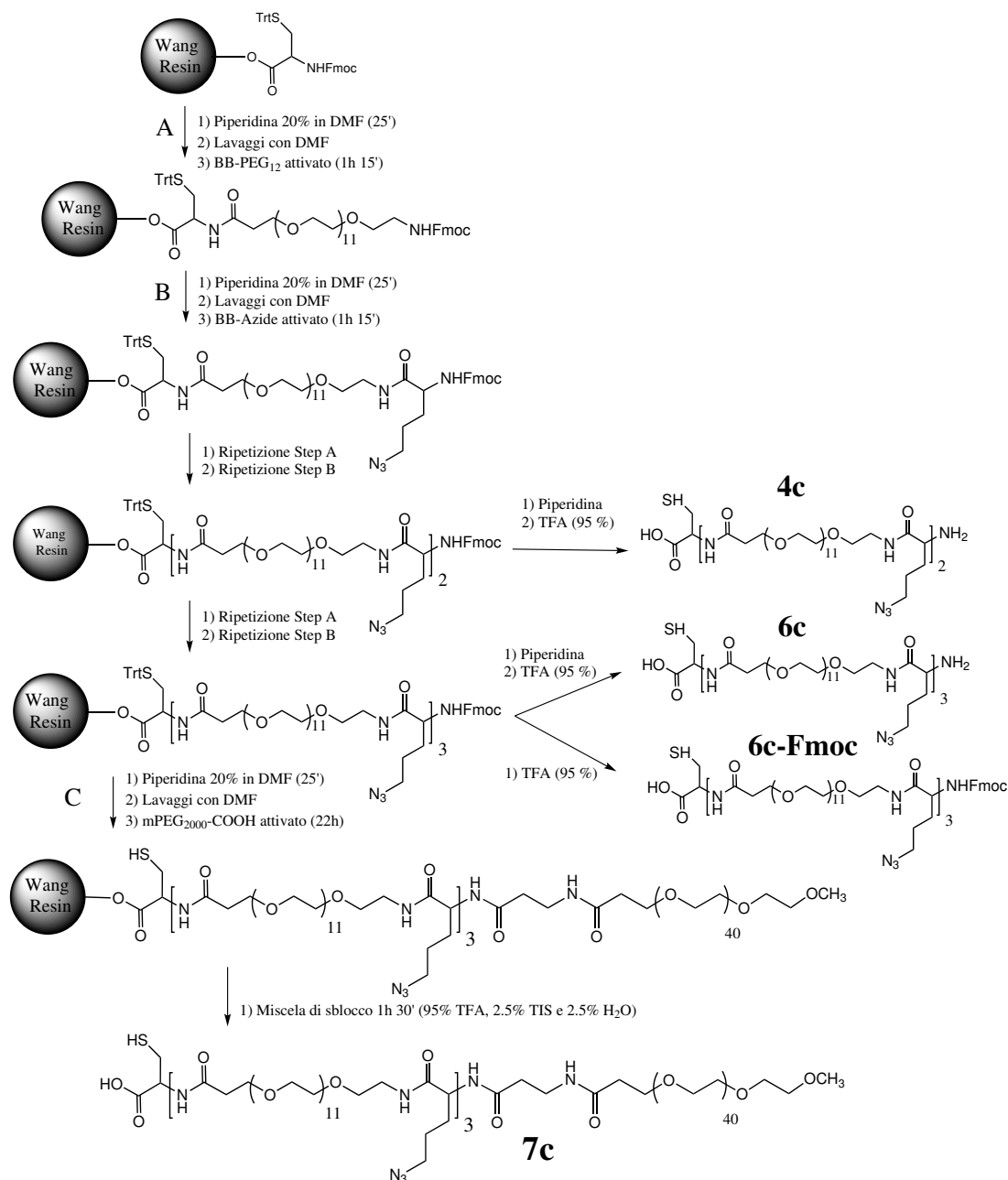


Figura 4.6: Schema di sintesi del polimero costituito da 7 *couplings* e quindi denominato **7c**. Per verificare le reazioni di attacco sono stati isolati anche gli intermedi **4c**, **6c** e **6c-Fmoc**.

l'attacco dello *spacer*, costituito da una lunga catena di PEG con una distribuzione di massa di circa 800 Da centrata attorno al valore medio di 2000 Da (Figura 6.4), è stato il più difficoltoso per i seguenti motivi:

- Il componente acilante (PEG) è polidisperso e la lunghezza delle catene potrebbe ostacolare l'attivazione della funzione carbossilica;

4. Risultati e Discussioni

- Come nel caso dell'intermedio **6c**, il prodotto risultante dopo l'inserimento dello *spacer* PEG_{2kDa} diventa così idrofilico che esce col fronte dell'eluente all'analisi HPLC. Di conseguenza, l'attacco finale del polimero è stato stabilito in base all'aumento di peso del prodotto legato al supporto solido (resa 56 %) e in base agli spettri di massa.

Lo spettro MALDI-TOF del polimero **7c**, non presenta il picco dell'oligomero **6c** e allo stesso tempo mostra il picco molecolare con una distribuzione di massa confrontabile con quella del frammento PEG_{2kDa} (Figura 6.4) e centrata sul valore di massa calcolato per il prodotto finale. Lo spettro ESI-MS non presenta il picco molecolare del prodotto, ma mostra assenza di oligomeri con un numero di *couplings* inferiore rispetto a quelli eseguiti. Come ulteriore verifica, il polimero è stato caratterizzato mediante NMR.

4.1.1 Analisi NMR del polimero sintetizzato

Con una serie di esperimenti NMR mono e bidimensionali è stata confermata la presenza di tutti i *building blocks* nel prodotto finale **7c**. Le analisi effettuate sono ¹H-NMR, ¹H¹H-COSY, ¹H¹H-TOCSY, ¹H¹H-NOESY, ¹H¹³C-HMQC, ¹H¹³C-HMBC e ¹³C-NMR (Figura C.1 - C.7).

La Figura 4.7 mostra la struttura del polimero **7c**, in cui sono numerati gli atomi a cui è stata data un'assegnazione tramite l'analisi NMR. Le informazioni iniziali sono state ottenute dallo spettro ¹H-NMR. I gruppi ammidici del polimero cadono, in questo spettro, nella zona 6.70 - 7.40 ppm. Il segnale del protone 4 è presente come doppietto centrato a 7.38 ppm. I restanti segnali dei protoni ammidici si sovrappongono in un unico segnale. I segnali dei protoni 5 e 10 sono comunque stati assegnati con l'aiuto degli spettri bidimensionali COSY e TOCSY. Guardando la struttura del polimero ci si aspetta un unico segnale di singoletto, riferito ai protoni del gruppo metossilico, che cade a 3.31 ppm nello spettro ¹H-NMR (anche il segnale dell'acido carbossilico, che non è stato riscontrato nello spettro, dovrebbe dare un singoletto, ma a valori di chemical shift molto più elevati). Un altro segnale facilmente assegnabile è quello dei gruppi etilen glicole (EG). L'elevato numero di questi gruppi all'interno della struttura, da origine a un segnale estremamente intenso a 3.58 ppm. Infine, i protoni 1 e 6 entrambi vicini a gruppi elettron attrattori (acido carbossilico e ammidi), mostrano un segnale ad elevato *chemical shift* nella zona 4.30 - 4.80 ppm. A partire da questi segnali, grazie agli spettri COSY e TOCSY, è stato possibile fare l'assegnazione di altri segnali protonici (riportati in Tabella 4.1). Inoltre, gli spettri TOCSY E COSY hanno permesso di studiare in modo dettagliato le catene laterali che portano i gruppi azido (Figura 4.8). In questa piccola catena formata da 4 atomi di carbonio, la presenza di un centro chirale (atomo 6) rende

4. Risultati e Discussioni

gli altri atomi della catena dei centri prochirali (atomi 7, 8 e 9). I segnali dei due idrogeni su ogni centro prochirale non saranno per cui identici, ma avranno valori diversi. Questo effetto è meno marcato man mano che ci si allontana dal centro chirale. In effetti, per i protoni dell'atomo 7 sono stati registrati due segnali distinti (Figura 4.9c-d), mentre per i protoni degli altri atomi è stato osservato un singolo segnale.

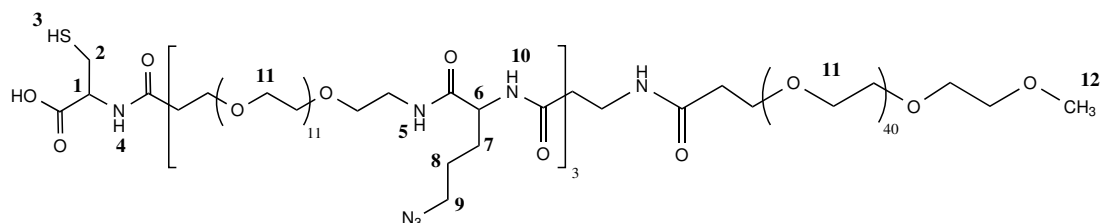


Figura 4.7: Viene mostrato in figura il polimero **7c**. Sono numerati gli atomi a cui sono state date delle assegnazioni con l'analisi NMR, riportate in Tabella 6.4.

Tabella 4.1: Assegnazioni dei *chemical shift* ^1H e ^{13}C e integrazioni dei segnali protonici del polimero **7c**. I numeri dei segnali sono riportati in Figura 4.7. L'area del segnale del gruppo metossilico è stata normalizzata con un valore pari a 3.0. Le aree degli altri segnali sono rapportate a questo valore di normalizzazione.

	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)	Area teorica (^1H)	Area calcolata (^1H)
1	4.74	53.81	1	0.8
2	2.97	26.49	2	1.3
3	1.54	-	1	0.3
4	7.38	-	1	0.8
5	7.10	-	-	-
6	4.39	52.47	3	2.9
7	1.87 1.63	29.60	12	10.2
8	1.58	25.00		
9	3.25	50.98	6	6.1
10	7.04	-	-	-
11	3.58	70.51	304	306.5
12	3.31	58.97	3.0	3.0*

* Valore di normalizzazione assegnato

Lo spettro ^1H -NMR è stato analizzato anche integrando le aree dei picchi assegnati. Le aree sono state calcolate rapportandole al valore di normalizzazione (pari a 3.0) assegnato al picco del gruppo $-\text{OCH}_3$. Questo segnale è stato scelto per la normalizzazione perché non sovrapposto con altri segnali e perché facilmente integrabile, dato che si presenta come singoletto. Le integrazioni dei segnali hanno permesso di confermare l'attacco di tutti i *building blocks* nel polimero sintetizzato, in particolare del PEG_{2kDa} introdotto con l'ultimo *coupling*. I composti **6c** e **7c** infatti, hanno una differenza nel numero di gruppi etilen glicole (EG) di circa 40, che corrisponde a una differenza nel numero di

4. Risultati e Discussioni

protoni per questi gruppi di circa 160. L'area teorica del segnale a 3.58 ppm avrà per cui un valore notevolmente superiore nel caso del composto **7c**. Anche il numero di segnali ammidici è diverso per i composti **6c** (7 idrogeni ammidici) e **7c** (8 idrogeni ammidici) e l'area teorica è quindi diversa nei due casi. I valori delle aree calcolati dallo spettro $^1\text{H-NMR}$, hanno confermato che il prodotto sintetizzato è il composto **7c** (Tabella 4.2 - Figura 4.9b).

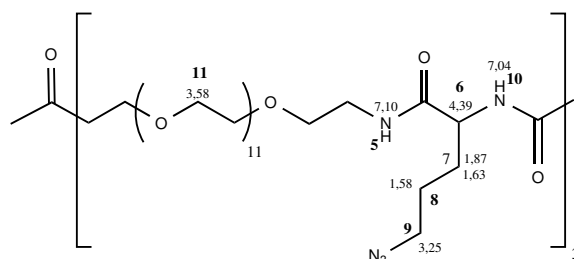


Figura 4.8: Parte centrale del polimero **7c** in cui sono messe in evidenza le catene laterali contenenti i gruppi $-\text{N}_3$. Sono mostrati in figura i valori di *chemical shift* protonici in ppm per alcuni atomi di idrogeno.

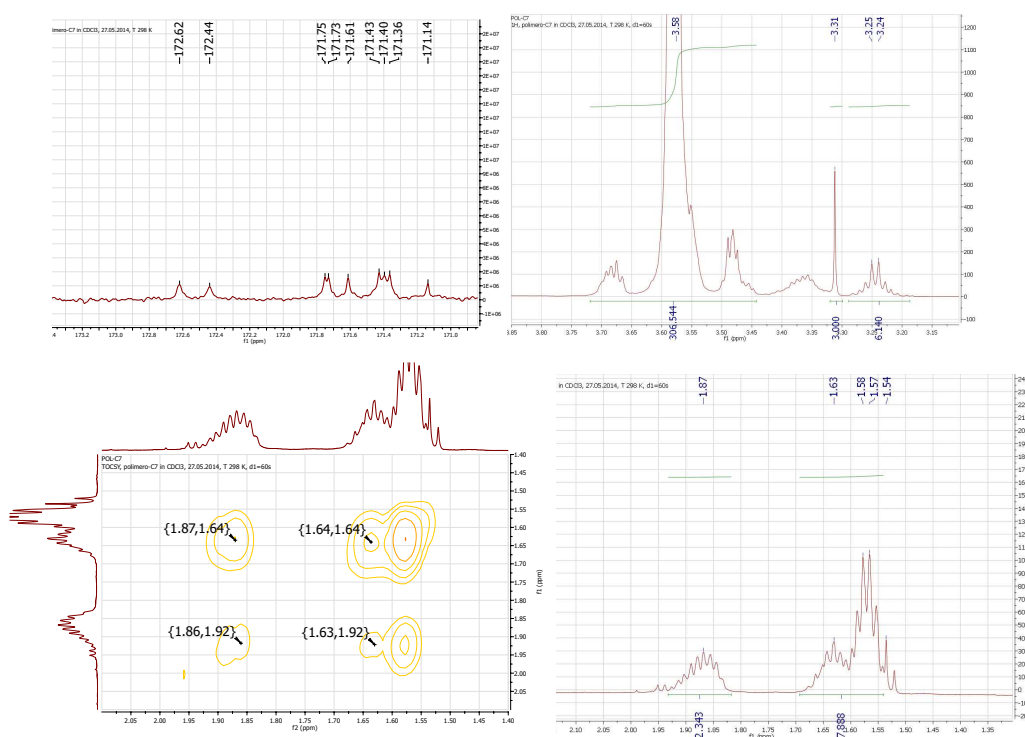


Figura 4.9: Spettri NMR del polimero **7c**. (a) In alto a sinistra è mostrato la regione a circa 170 ppm dello spettro $^{13}\text{C-NMR}$ che presenta 9 segnali dovuti a carboni carbonilici. (b) In alto a destra sono mostrati i segnali dei gruppi EG (3.58 ppm) e del gruppo $-\text{OCH}_3$ (3.31 ppm), con rispettive integrazioni nello spettro $^1\text{H-NMR}$. (c – d) In basso sono mostrati gli spettri COSY (a sinistra) e $^1\text{H-NMR}$ (a destra), che evidenziano due segnali distinti a 1.87 e 1.63 ppm per i protoni legati all'atomo di carbonio 7 della catena laterale del polimero (Figura 4.8).

4. Risultati e Discussioni

Dalle assegnazioni dei segnali protonici è stato possibile grazie agli spettri $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMQC, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMBC fare delle assegnazioni nello spettro ^{13}C -NMR (riportate in Tabella 4.1). In questo spettro, i segnali dei gruppi carbonilici cadono a circa 170 ppm e il loro numero conferma ulteriormente che il composto analizzato è il prodotto **7c** (Tabella 4.2 - Figura 4.9a).

Tabella 4.2: Dati dell'analisi NMR del polimero **7c**. Le aree sono rapportate all'area del segnale del gruppo $-\text{OCH}_3$ normalizzata con un valore pari a 3.0.

	Valori teorici		Valori sperimentali
	Composto 6c	Composto 7c	Polimero sintetizzato
Gruppi di EG*	36	76	76.5
Protoni dei gruppi EG*	144	304	306
Idrogeni ammidici	7	8	8
Gruppi carbonili	8	9	9

* Etilen Glicole

4.2 Sintesi di DOTA-DBCO

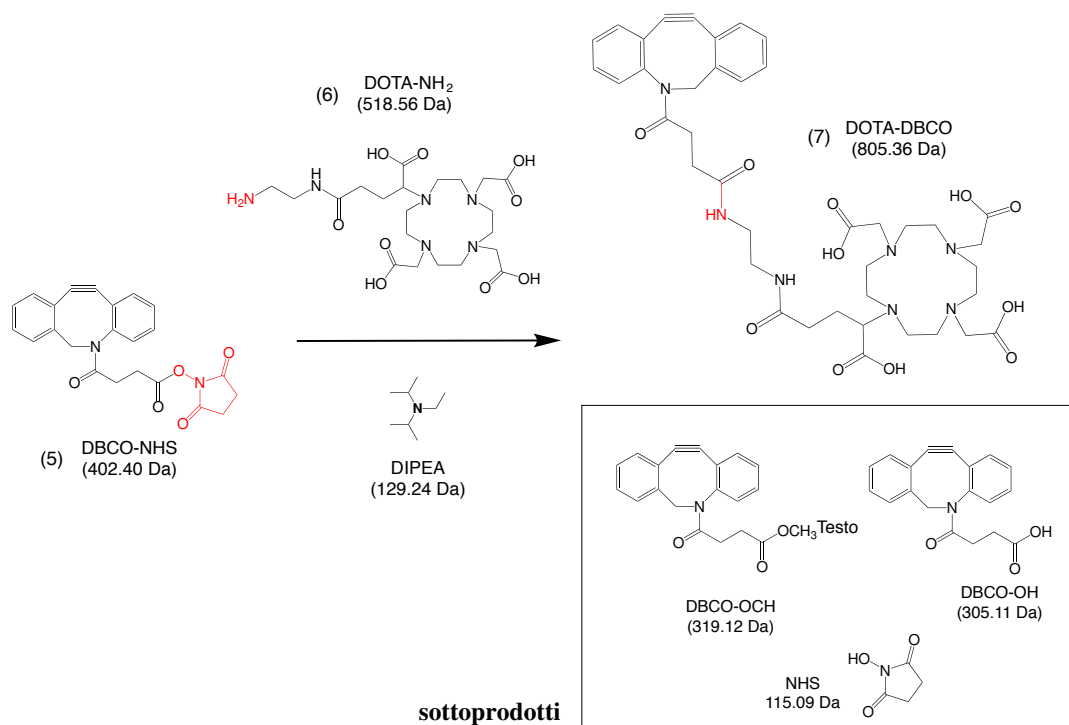


Figura 4.10: Sono mostrati in figura il DOTA-NH₂ e DBCO-NHS che reagiscono in presenza di base DIPEA per dare DOTA-DBCO. Tra i sottoprodotti della reazione, oltre a idrosuccinimide si possono formare anche DBCO-OH E DBCO-OCH₃.

Come già anticipato nella parte introduttiva, per ancorare il complesso DOTA(Gd) al corpo del sistema, si è scelto di utilizzare la reazione di cicloadizione di Huisgen tra azide e alchino. Avendo deciso di introdurre il gruppo azide nel polimero, sintetizzato su fase solida, il legante DOTA è stato funzionalizzato con un dibenzocicloottino (DBCO-NHS) secondo lo schema di Figura 4.10. Le diverse caratteristiche chimico fisiche dei reagenti (DBCO-NHS poco polare e DOTA-NH₂ polare) hanno creato delle difficoltà nella scelta del solvente di reazione. Alla fine, si è dovuto optare per la DMF, anche se la solubilità del DOTA-NH₂ in questo solvente non era ottimale. La reazione di acilazione sul DOTA-NH₂ è risultata, in base all'analisi HPLC, estremamente lenta e dopo 5 giorni il prodotto si era formato per il 50-60 %. Fortunatamente, il DBCO non reagito, che potrebbe competere col prodotto DOTA-DBCO nella successiva reazione di cicloadizione, è stato facilmente rimosso dalla soluzione acquosa della miscela di reazione, per estrazione con acetato di etile. Il prodotto DOTA-DBCO, impuro per la presenza di DOTA-NH₂, è stato usato nella successiva reazione di complessamento con gadolinio senza ulteriore purificazione.

4.3 Complessazione del macrociclo DOTA con Gd^{3+}

Per la complessazione del DOTA con Gd^{3+} sono stati seguiti i protocolli riportati in letteratura,^{[61][62]} con la reazione che viene svolta in acqua, a temperatura ambiente o scaldando leggermente e con un eccesso di gadolinio. Bisogna considerare che il complesso risultante è negativo (Figura 4.11), in quanto quattro dei nove atomi che si legano al metallo per formare il complesso portano con sé una carica negativa (ossigeni dei gruppi carbossilici). Lo ione Gd^{3+} controbilancia solo tre di queste cariche, lasciando una carica formale negativa sul complesso.

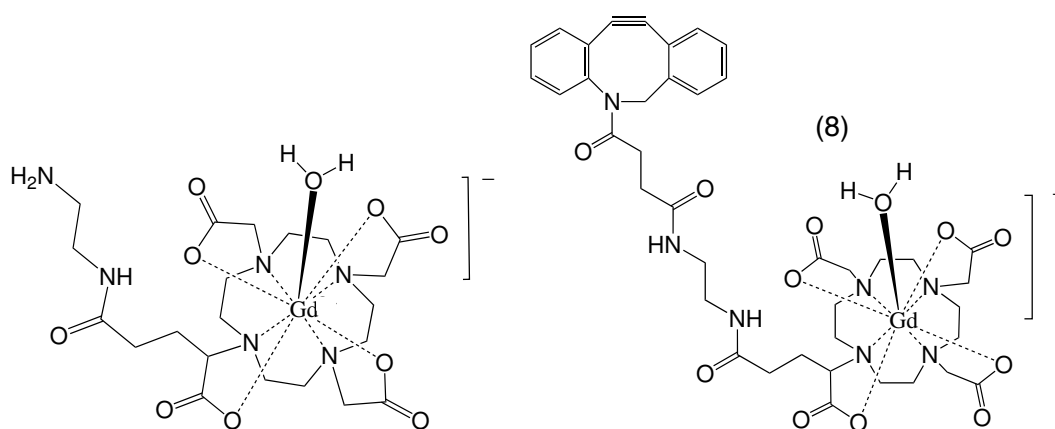


Figura 4.11: Struttura dei complessi $[DOTA(Gd)-NH_2]^-$ e $[DOTA(Gd)-DBCO]^-$

La complessazione del DOTA-DBCO con Gd^{3+} è stata verificata con l'analisi MALDI-TOF in negativo. Data la presenza di un atomo di Gd, che possiede una distribuzione isotopica caratteristica, l'assegnazione può essere supportata paragonando la distribuzione isotopica del picco sperimentale con quella teorica (Figura 4.12). Nel nostro caso, le due distribuzioni risultano perfettamente equivalenti, confermando l'assegnazione del picco e dimostrando qualitativamente la complessazione del DOTA-DBCO.

Per fare delle valutazioni quantitative è invece stata effettuata una retrotitolazione complessometrica, utilizzando come complessante l'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) e come indicatore complessometrico lo Xylenol Orange (XO) (Figura 4.13 - 4.14).

4. Risultati e Discussioni

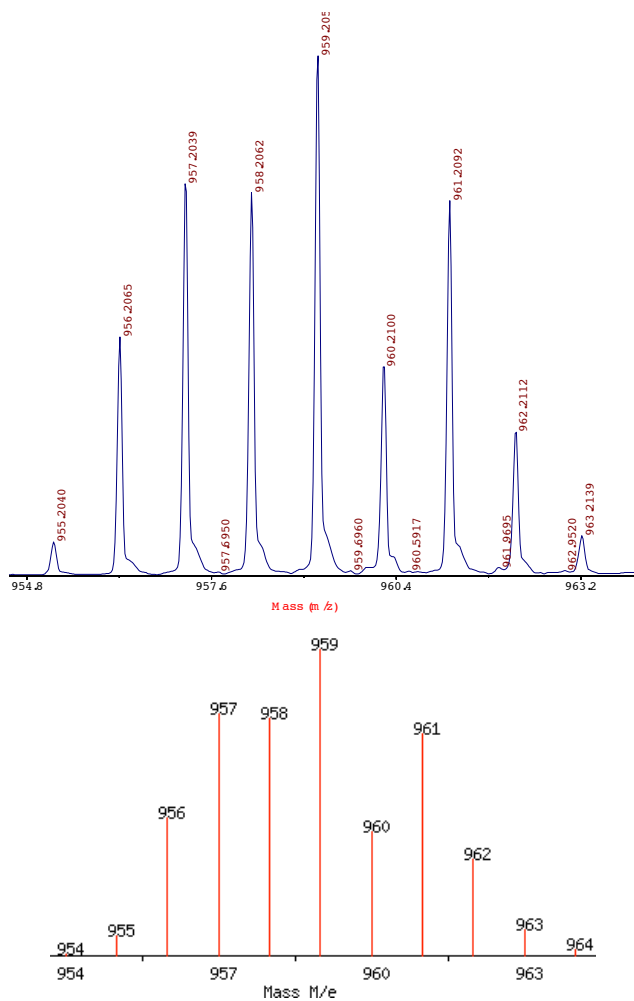


Figura 4.12: Viene mostrato nell'immagine in alto il picco del complesso $[\text{DOTA}(\text{Gd})\text{-DBCO}]^-$ derivante dall'analisi MALDI-TOF in negativo del precipitato. La distribuzione isotopica del complesso risulta uguale a quella teorica mostrata nella figura in basso.

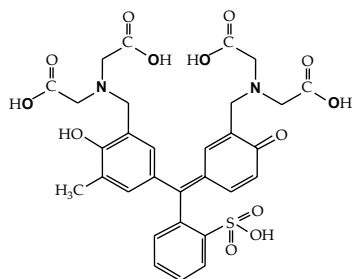


Figura 4.13: Struttura dell'indicatore complessometrico Xylenol Orange (XO).

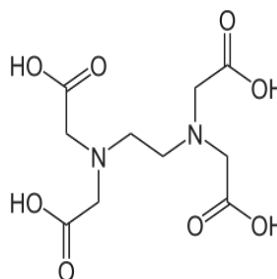


Figura 4.14: Struttura del legante acido etilendiamminotetraacetico (EDTA).

4. Risultati e Discussioni

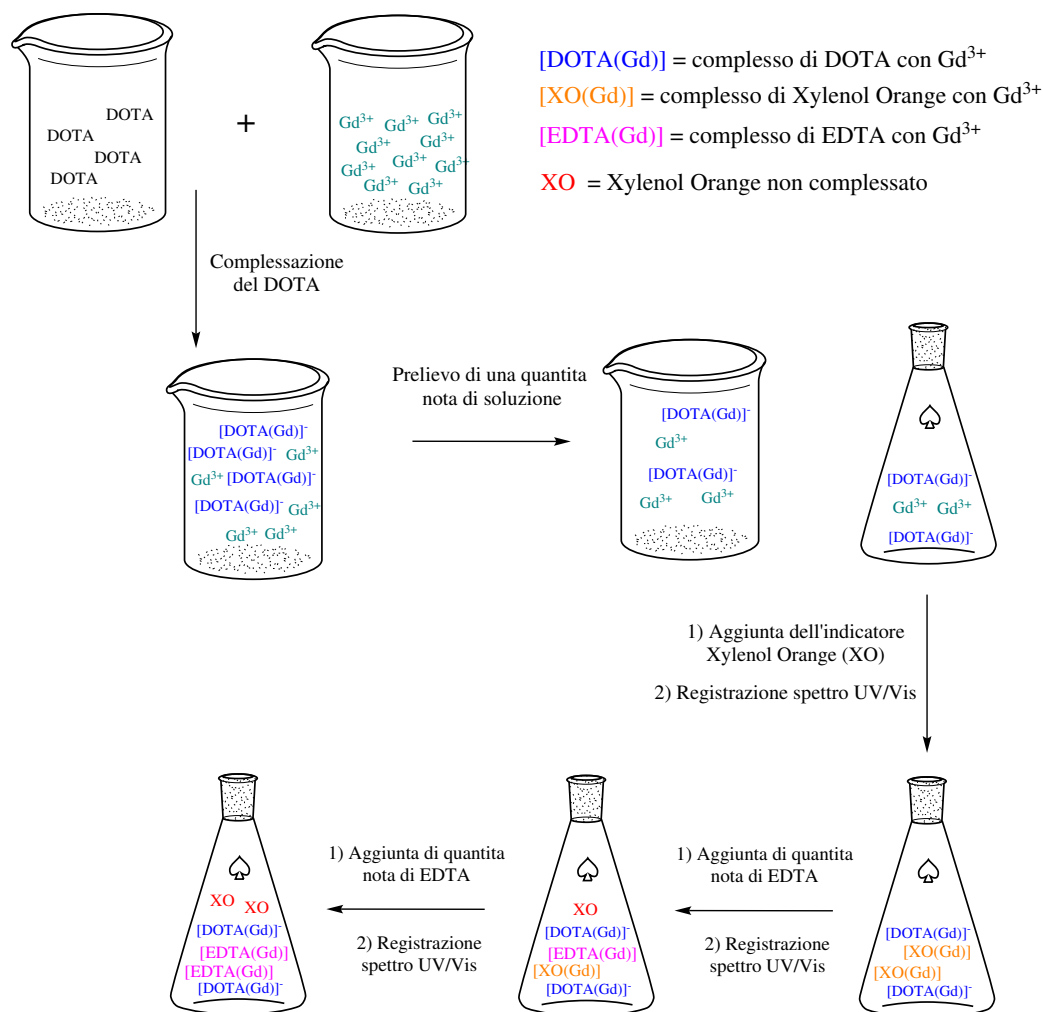


Figura 4.15: Schema della retrotitolazione complessometrica utilizzata per determinare l'eccesso di ioni Gd^{3+} in soluzione.

I principali passaggi della retrotitolazione, illustrati in Figura 4.15, sono:

- Preparare una soluzione del legante DOTA con un eccesso di Gd^{3+} , e porla a reagire nelle condizioni di reazione che si stanno testando;
- Aggiungere a una quantità nota di soluzione l'indicatore complessometrico XO, che leggerà gli ioni Gd^{3+} non complessati;
- Titolare con aggiunte di EDTA a concentrazione nota;
- Registrare lo spettro UV-Vis dopo ogni aggiunta di EDTA;
- Dalle variazioni degli spettri UV-Vis, ricavare il punto di fine della titolazione.

Un punto su cui soffermare l'attenzione è la diversa stabilità dei tre complessi in soluzione. Le costanti di complessamento (riportate di seguito) mostrano una stabilità dei complessi nell'ordine $DOTA \gg EDTA \gg XO$.

4. Risultati e Discussioni

$$\log K_{[DOTA(Gd)]} = 25.3 \gg \log K_{[EDTA(Gd)]} = 17.7 \gg \log K_{[XO(Gd)]} = 5.2$$

Pertanto, l'EDTA sottrarrà Gd^{3+} all'indicatore XO, che sarà via via sempre meno complessato fino ad arrivare alla sua forma libera al punto di fine titolazione. La forte stabilità del complesso DOTA(Gd), evita che l'EDTA estragga da lui ioni metallici, portando ad una sovrastima della quantità di gadolinio in soluzione. Saranno descritti di seguito gli indicatori XO e EDTA per capire meglio il loro ruolo nella retrotitolazione.

L'indicatore XO (Figura 4.13) è utilizzato per la determinazione di ioni metallici in soluzione, tra cui anche il Gd^{3+} .^[63] Nella sua forma non complessata l'indicatore si presenta in soluzione (a pH 7) di colore giallo^[64]. Una molecola di XO può complessare diversi ioni metallici M^{n+} , comportandosi da legante esadentato. Sono usati per la formazione del complesso i 4 atomi di ossigeno dei carbossili (che si deprotonano) e due atomi di azoto. Il colore dell'indicatore cambia da giallo a rosso/viola quando complessato. Il legante EDTA (Figura 4.14) possiede 6 equilibri acido-base e la forma completamente deprotonata presenta la massima efficienza di coordinazione, con tutti gli ossigeni e azoti disponibili per la coordinazione di ioni metallici. Questa forma è prevalente per valori di pH circa 10 ($pK_a^6 = 10.37$). Per questo motivo abbiamo preparato le soluzioni di EDTA a concentrazione nota in NH_3 0.1 M (pH \approx 11), di modo da avere l'indicatore con la massima efficienza di coordinazione.

Per testare la linearità del metodo, abbiamo inizialmente titolato soluzioni di solo Gd^{3+} . Abbiamo preparato 6 soluzioni a titolo noto di Gd^{3+} in H_2O bidistillata. Dopo aver aggiunto lo XO, le soluzioni sono state titolate con EDTA 30.04 mM in NH_3 0.1 M. Il punto di fine è stato calcolato in base alle variazioni degli spettri UV-Vis registrati dopo ogni aggiunta di EDTA. Dalle sei titolazioni, considerando la concentrazione di Gd^{3+} e il volume di EDTA a fine titolazione, è stata costruita una retta di calibrazione (Figura 4.16). Dopo aver verificato la linearità del metodo, abbiamo effettuato un'ulteriore prova inserendo il DOTA in soluzione. Abbiamo preparato una soluzione mescolando DOTA- NH_2 (1 eq) e $GdCl_3$ (4.5 eq) e abbiamo lasciato ad agitare per una notte. La soluzione è stata quindi titolata con EDTA. La quantità di Gd^{3+} libero in soluzione che sarà titolato dipende dalla % di complessamento del DOTA- NH_2 . Anche qui il punto di fine è stato calcolato in base alle variazioni degli spettri UV-Vis registrati dopo ogni aggiunta di EDTA. Dalle moli di EDTA al punto di fine è stata calcolata una % di complessamento per il DOTA- NH_2 pari all'84 %.

Dopo i test preliminari, la retrotitolazione complessometrica è stata condotta sulla miscela DOTA-DBCO e DOTA- NH_2 a cui era stato aggiunto un eccesso di ioni Gd^{3+} . È da rilevare che i complessi risultanti sono facilmente separabili grazie alla loro diversa solubilità in acqua, con il $[DOTA(Gd)-DBCO]^-$ che precipita come sale sodico e il $[DOTA(Gd)-NH_2]^-$ che rimane in soluzione. Dalla titolazione si è ottenuto un valore di

4. Risultati e Discussioni

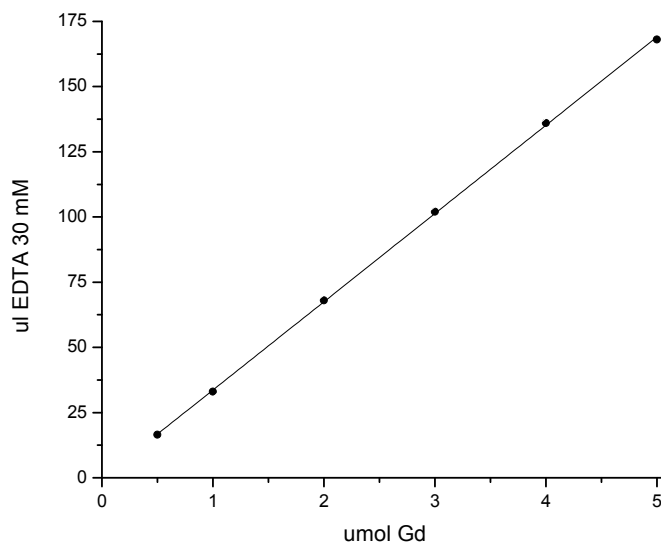


Figura 4.16: Correlazione lineare fra μmol di Gd^{3+} e μl di EDTA al punto di fine. Pendenza: 33.85479 ± 0.21787 . Intercetta: -0.20822 ± 0.66114 .

compiamento pari al 98.6 % rispetto alle μmol di DOTA- NH_2 utilizzate per la reazione col DBCO-NHS. I risultati della titolazione sono riportati in Tabella 4.3 e in Figura 4.18.

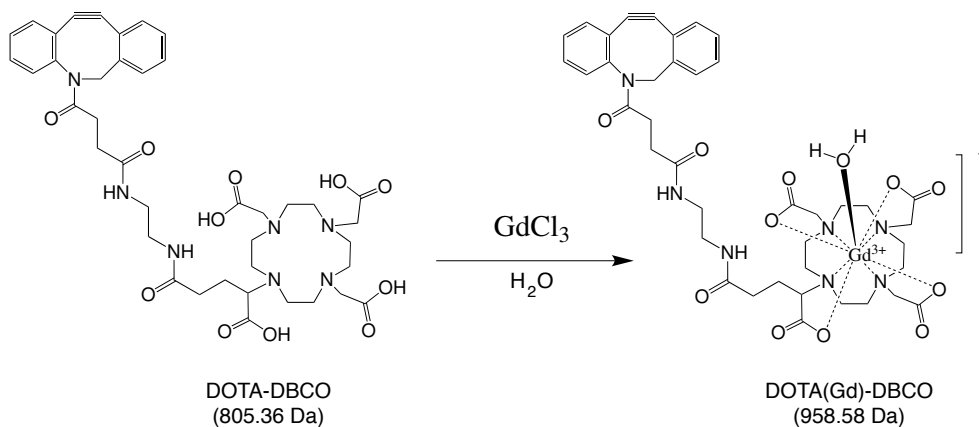


Figura 4.17: Viene mostrata in figura la reazione di complessamento del DOTA-DBCO con GdCl_3 in soluzione acquosa.

4. Risultati e Discussioni

Tabella 4.3: Sono mostrati in tabella i dati della retrotitolazione complessometrica utilizzata per calcolare la % di complessamento del DOTA-DBCO.

Miscela di reazione DOTA-DBCO, DOTA-NH ₂ e Gd ³⁺			
DOTA-NH ₂ + DOTA-DBCO		GdCl ₃ · 6H ₂ O	
V (ml)	μmol	massa (mg)	μmol
16	96.6	287.8	774.3
Retrotitolazione complessometrica con EDTA 10.01 mM			
PF teorico		PF sperimentale	
μl EDTA	μmol EDTA	μl EDTA	μmol EDTA
212	2.12	209	2.09
% di complessamento calcolata			
98.6			

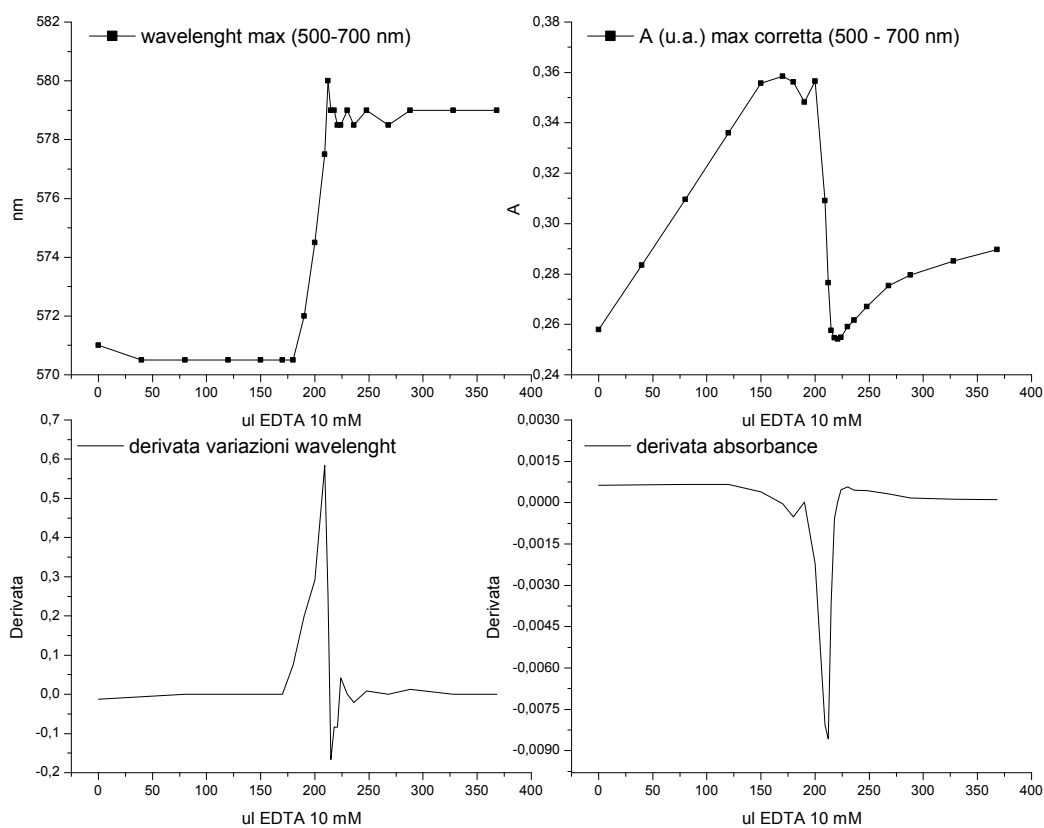


Figura 4.18: Sono mostrate in alto le variazioni di lunghezza d'onda e assorbanza dello spettro UV-Vis (in particolare della banda a 500-600 nm) per la miscela di reazione DOTA-DBCO e DOTA-NH₂ con Gd³⁺ in funzione dei μl di EDTA aggiunti. Per il calcolo del punto di fine è stata graficata la derivata delle variazioni di lunghezza d'onda e assorbanza (mostrate in basso) in funzione dei μl di EDTA aggiunti.

4.4 Attacco del complesso di Gd^{3+} al polimero tramite cicloaddizione di Huisgen

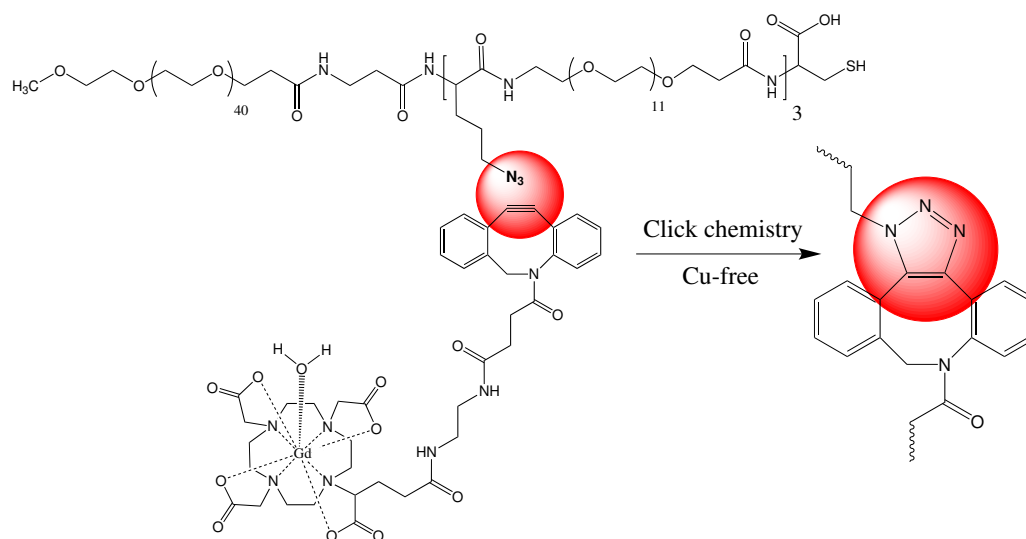


Figura 4.19: Reazione di *click chemistry* tra polimero **7c** e DOTA(Gd)-DBCO. Viene qui evidenziata la formazione del 1,2,3-triazolo.

Le condizioni di reazione sono state inizialmente verificate mescolando tra loro in metanolo il dibenzociclottrino DBCO e una piccola porzione di oligomero **6c** contenente tre gruppi azide. Dopo 24 h è stata osservata completa formazione del prodotto di cicloaddizione. Quando la reazione è stata ripetuta tra il complesso $[DOTA(Gd)-DBCO]^-$ e il polimero **7c** si sono incontrate notevoli difficoltà poiché il complesso ha dimostrato di essere insolubile nella maggior parte dei solventi comunemente utilizzati (MeOH, EtOH, $CHCl_3$, H_2O , DMF, THF, benzene). Tra i solventi testati, quello che ha dato i risultati migliori è stata una soluzione leggermente acida, condizioni di pH che non dovrebbero intaccare il complesso che dissocia a $pH < 1.5$.^[22] Abbiamo deciso di lavorare, in via precauzionale a $pH = 3$ senza ottenere comunque completa dissoluzione del complesso. Dopo 24 h di reazione il complesso residuo (indisciolto) è stato separato dalla soluzione e su entrambi è stato eseguito uno spettro di massa. Il solido è risultato essere, secondo l'analisi di massa, il complesso $[DOTA(Gd)-DBCO]^-$ rimasto indisciolto nella miscela di reazione. L'analisi di massa della soluzione invece, non ha mostrato né traccia del polimero **7c** né del prodotto desiderato. L'assenza di segnale riferito al prodotto superDOTA può essere imputata alle cariche negative introdotte dalla coniugazione di tre complessi negativi, che comportano una difficile visualizzazione all'analisi di massa in negativo, già di per sé meno sensibile rispetto a quella in positivo.

I problemi di solubilità presentati dal complesso $[DOTA(Gd)-DBCO]^-$, ci hanno portato

4. Risultati e Discussioni

a valutare un differente approccio. In particolare, è stata provata la reazione tra il solo DOTA-DBCO non complessato e il polimero **7c** nell'ipotesi di introdurre il gadolinio dopo la reazione di cicloadizione. La reazione è stata condotta in acqua, solvente in cui erano solubili sia il polimero **7c** che il DOTA-DBCO (tuttavia ancora impuro per la presenza di DOTA-NH₂). Già dopo 24 h di reazione, l'analisi ESI-MS evidenziava la scomparsa del DOTA-DBCO e la comparsa di una distribuzione di massa. Questa analisi sembra indicare che il DOTA-DBCO ha reagito quantitativamente con il polimero. Per motivi di tempo, questa via di reazione non è stata ulteriormente sviluppata durante il periodo di tesi.

4.5 Analisi MRI

L'analisi MRI è stata effettuata sul composto superDOTA (Figura 4.4) in soluzione acquosa. Da una soluzione madre sono state preparate delle soluzioni diluite e per ogni soluzione è stato misurato un valore di T_1 . Graficando i valori di $1/T_1$ sulla concentrazione delle soluzioni, è stata ottenuta una retta, il cui valore di pendenza corrisponde alla rilassività r_1 del sistema (Figura 4.20). Per avere un riferimento, le soluzioni sono state effettuate anche su delle soluzioni di $GdCl_3$.

Tabella 4.4: Valori $1/T_1$ e r_1 della soluzione di SuperDOTA 112.5 μM e di una soluzione di $GdCl_3$ utilizzata come riferimento.

	SuperDOTA			GdCl ₃		
	C (μM)	$1/T_1$ (s^{-1})	r_1 ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	C (μM)	$1/T_1$ (s^{-1})	r_1 ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Diluizione 1	112.5	2.60		500	8.20	
Diluizione 2	56.3	1.58		250	4.52	
Diluizione 3	28.1	0.99	19.5	50	1.29	16.8
Diluizione 4	14.1	0.72		25	0.76	
Diluizione 5	7.0	0.54		10	0.56	

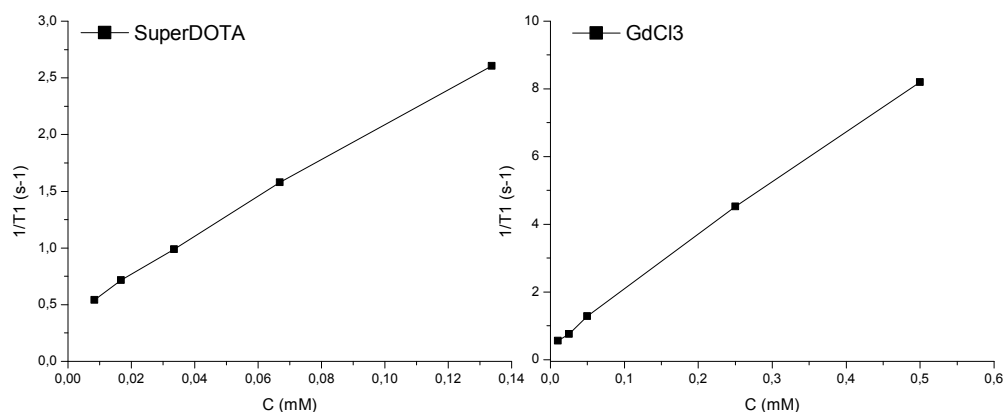


Figura 4.20: Grafici di $1/T_1$ (s^{-1}) in funzione della concentrazione di SuperDOTA e $GdCl_3$ (mM). Dalla pendenza delle rette è stato calcolato il valore di rilassività r_1 .

I dati dell'analisi MRI si basano sul presupposto che gli 1.3 mg ottenuti dalla reazione di *click chemistry* tra polimero **7c** e $[\text{DOTA}(\text{Gd})\text{-DBCO}]^-$ siano costituiti di solo prodotto superDOTA. Il valore di rilassività r_1 ottenuto dall'analisi MRI è pari a $19.5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Il confronto con dati di letteratura richiede un po' di cautela, in quanto il valore è influenzato dalla frequenza di lavoro dello strumento, che nel nostro caso è di 200 MHz. Per paragone, nelle stesse condizioni operative, il Dotarem ha un valore di r_1 pari a

4. Risultati e Discussioni

4.2.^[11] Nonostante il risultato ottenuto sia molto buono, non è possibile trascurare il fatto che il prodotto non è stato sufficientemente caratterizzato.

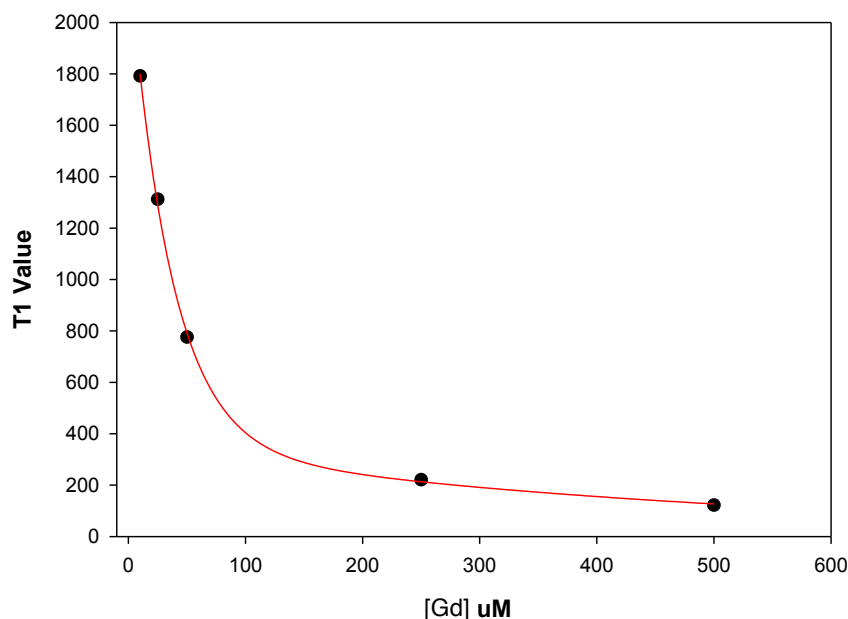


Figura 4.21: Dai valori di T_1 (ms) misurati per soluzioni di $GdCl_3$ a diversa concentrazione (500, 250, 50, 25, 10 μM) è stata fatta una curva di taratura. L'equazione del fitting è $y = a^{-bx} + c^{-dx}$ (con $y = [Gd^{3+}]$ in μM , $x = T_1$ in ms, $a = 352.5007$, $b = 0.0020$, $c = 1926.4039$ e $d = 0.0280$)

Oltre ad ottenere un valore di rilassività, l'analisi MRI consente di calcolare una stima della quantità di Gd^{3+} all'interno del nostro sistema. Dal *fitting* dei valori di T_1 (in ms) registrati per le soluzioni di $GdCl_3$ a diversa concentrazione è stata costruita una curva di calibrazione (Figura 4.21). Inserendo il valore di T_1 misurato per la soluzione di superDOTA nell'equazione della curva, si ottiene una concentrazione di Gd^{3+} pari a 110.6 μM . Questo valore è molto simile alla concentrazione di superDOTA della soluzione analizzata pari a 112.5 μM . Sembra quindi che il sistema analizzato all'MRI contenga un solo Gd^{3+} per unità di superDOTA. Questo dato potrebbe indicare che un solo complesso $[DOTA(Gd)-DBCO]^-$ ha reagito via *click chemistry* per legarsi al polimero **7c**. Secondo questa ipotesi, migliorando il procedimento di sintesi ed ottenendo il sistema completo di 3 unità $[DOTA(Gd)-DBCO]^-$, è possibile ottenere risultati ancora migliori all'analisi MRI.

5. Conclusioni

Questo progetto di tesi si è occupato della sintesi di un sistema nanostrutturato, adatto a ricoprire il ruolo di agente di contrasto per T₁-MRI. Il sistema è composto da nanoparticelle di oro (AuNPs) funzionalizzate con una struttura molecolare formata da due componenti principali:

- Complessi di Gd³⁺ con il legante DOTA;
- Un corpo polimerico che lega a sé i complessi di gadolinio;

La struttura molecolare è stata sintetizzata tramite sintesi su fase solida, tecnica che ha permesso di inserire nel polimero diversi gruppi funzionali. Ad una estremità è presente il gruppo tiolo, che consente l'attacco della struttura a AuNPs, mentre la parte centrale del corpo contiene tre gruppi azido. Infine, per chiudere la catena è stato inserito uno *spacer* (costituito da una lunga catena di PEG), per rendere più biocompatibile il sistema. La resa della reazione (56 %) non è risultata particolarmente elevata, ma le caratterizzazioni del polimero finale indicano la formazione del solo prodotto desiderato.

Il componente del sistema che svolge la funzione di contrasto è il complesso di Gd³⁺ con il legante DOTA. Per legare i complessi di gadolinio al corpo del sistema è stata scelta la reazione di cicloaddizione di Huisgen tra azide e alchino. Per permettere questa reazione, il complesso è stato funzionalizzato con un gruppo ciclotino, che reagisce con i gruppi azido presenti nella catena polimerica. Questa reazione ha comportato qualche difficoltà inerente alla scarsa solubilità del reagente DOTA-NH₂ nel solvente di reazione. Per questo motivo la reazione è risultata molto lenta (5 giorni) e non quantitativa, con entrambi i reagenti presenti nella miscela di reazione finale.

Il legante funzionalizzato è stato fatto reagire con GdCl₃ ed il complesso risultante è stato analizzato con l'analisi di massa MALDI-TOF e con una retrotitolazione complessometrica, mostrando una reazione di complessamento quantitativa. Il complesso formato è stato poi legato al polimero tramite cicloaddizione di Huisgen, tuttavia, le analisi di massa effettuate hanno mostrato la scomparsa dei reagenti senza però mostrare il prodotto di reazione. Per questo motivo sono stati effettuati diversi step di purificazione al fine di

5. Conclusioni

isolare, per esclusione dimensionale, il solo prodotto superDOTA (un polimero con MM circa 7300 Da).

L'analisi MRI del prodotto superDOTA ha dato buoni risultati, mostrando una rilassività quasi 5 volte maggiore rispetto al Dotarem. Il prodotto superDOTA è stato legato anche ad AuNPs formando il sistema AuNPs-superDOTA, tuttavia, questo sistema analizzato con MRI non ha mostrato segnali.

Per concludere, la struttura molecolare superDOTA, ha dimostrato di poter ricoprire efficacemente il ruolo di agente di contrasto per T_1 -MRI. Il progetto proseguirà con una migliore caratterizzazione del polimero e con la sua successiva reazione con AuNPs funzionalizzate con SERS-*reporter* per formare un sistema per tecnica multi-*imaging* SERS-MRI.

6. Protocolli sperimentali

In questa sezione vengono riportati i protocolli sperimentale, con descrizione delle procedure e corrispondenti caratterizzazioni dei vari step che hanno portato a sintetizzare il nanosistema. Alcuni degli spettri e cromatogrammi a cui si fa riferimento, non sono riportati direttamente in questa sezione, ma possono essere trovati in Appendice C.

6.1 Strumenti e tecniche di caratterizzazione

Le analisi HPLC sono state effettuate utilizzando il cromatografo Dionex, serie P680, dotato di autocampionatore Dionex ASI-100, camera per degasare i solventi e rivelatore Dionex UVD170U operante a 215, 254 e 420 nm. Lo strumento è interfacciato ad un computer. È stata utilizzata la colonna analitica Vydac C18 218TP104 a fase inversa (250 x 4.6 mm, flusso di 1.5 ml/min, particelle di 5 μm di diametro) e come eluente si è fatto uso di una miscela dei solventi A (H_2O con 0.1 % TFA v/v) e B (90 % CH_3CN , 10 % H_2O e 0.1 % TFA v/v/v). Se non diversamente indicato le condizioni generali di eluizione sono state: 3 min 10 % B; gradiente lineare da 10 % a 90 % di B in 30 min. I cromatogrammi sono stati elaborati con il programma Chromeleon versione 6.60.

Le analisi di massa ESI-MS sono stati registrati con lo spettrometro di massa a tempo di volo Mariner modello ESI-TOF, Perseptive Biosystem, utilizzando l'ESI come tecnica di ionizzazione. Se non diversamente indicato lo strumento è stato utilizzato con rilevazione in positivo.

Lo spettrometro utilizzato per raccogliere gli spettri UV-Vis è un Varian Cary 5. Gli spettri sono stati registrati in cuvette in quarzo con cammino ottico di 2mm.

Le analisi MRI sono state svolte nei laboratori del Dipartimento di Patologia, Sezione di Immunologia del Policlinico *GB. Rossi* di Verona, dal gruppo di ricerca del Prof. Marco Colombatti. Lo strumento opera a 200 MHz (4.7 T).

6. *Protocolli sperimentali*

Le analisi NMR sono state fatte su uno strumento Bruker Avance DMX 600 operante a 600 MHz. Il solvente utilizzato per l'analisi è CDCl_3 99.99 % con TMS come riferimento interno. Le analisi sono state registrate a temperatura ambiente.

Lo spettrometro di massa MALDI-TOF/TOF utilizzato è un UltrafleXtreme prodotto dalla Bruker Daltonik. Gli ioni sono generati con un laser a Nd:YAG ($\lambda = 335$ nm), analizzati con un tempo di volo della lunghezza di un metro e rivelati con un multichannel plate. Le analisi per la determinazione del polimero sono state effettuate in modalità reflectron con rivelazione di ioni positivi, mentre le analisi dei complessi con rivelazione di ioni negativi. Per la preparazione del campione sono stati depositati su un target di acciaio 1 μl di soluzione satura in matrice seguita da 1 μl di soluzione di analita (0.5 - 5 mM). Per le analisi in positivo è stata utilizzata la matrice 2,5-DHAP (soluzione satura in $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ con 0.1 % TFA), mentre per le analisi in negativo è stata utilizzata la matrice HCCA (soluzione satura in $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ con 0.1 % TFA). Se non diversamente indicato gli spettri MALDI-TOF sono stati registrati in positivo.

I principali reagenti utilizzati nella sintesi sono riassunti nella seguente Tabella.

Tabella 6.1: Reagenti utilizzati per la sintesi del nanosistema superDOTA.

Sigla	MM (g/mol)	CAS	Casa produttrice
Fmoc-NH-PEG ₁₂ -COOH	839.98	867062-95-1	Irish Biotech
(S)-5-Azido-2-(Fmoc-amino)pentanoic acid	380.40	1097192-04-5	Sigma Aldrich
Dibenzocyclooctyne-N-hydroxysuccinimidyl ester	402.20	-	Sigma Aldrich
Fmoc-Cys(Trt)-Wang resin LL (100-200 mesh)	0.30 mmol/g	-	Merk Millipore
NH ₂ -DOTA-GA	518.56	306776-79-4	Chematech
CH ₃ O-PEG-NHCO-C ₂ H ₄ -COOH	≈ 2000	-	Rapp Polymer

6.2 Sintesi e aggregazione di AuNPs

Per ottenere le soluzioni colloidali di AuNPs abbiamo utilizzato la *Laser Ablation Synthesis in Solvent* (LASIS). Lo strumento utilizzato in questo lavoro di tesi è un laser a Nd:YAG, (modello YG-981E⁻¹⁰ della Quantel) in cui il mezzo attivo è un cristallo di granato di ittrio e alluminio (*yttrium aluminium garnet*, Y₂Al₅O₁₂) drogato con ioni Nd³⁺. Si utilizza la riga fondamentale ($\lambda = 1064$ nm), con impulsi della durata di 9ns e una frequenza di ripetizione di 10Hz; la potenza utilizzata è di circa 600 mW, che si traduce in una fluensa di circa 10 J/cm² sul campione. Il *target* consiste in un disco di Au 99.9% dello spessore di circa 1-0.5 mm, posto circa 0.6 cm prima del fuoco della lente (focale 100 mm) che focalizza il fascio. La provetta di polietilene, sul fondo della quale è posizionato il dischetto d'oro, è riempita con circa 15 mL di una soluzione 10⁻⁵ M di NaCl in H₂O bidistillata. L'ablazione è monitorata da periodiche misure di assorbanza della soluzione di AuNPs. Si decide di considerare terminato il processo di sintesi quando il picco di assorbimento del plasmone superficiale delle AuNPs raggiunge un valore di assorbanza $Abs_{(520nm)} \geq 0.4$ registrata in cuvetta di quarzo con cammino ottico di 0.2 cm. In Figura 6.1 è riportato lo spettro UV-Vis di AuNPs sintetizzate tramite LASIS in NaCl 10⁻⁵ M. Una volta sintetizzate, le AuNPs sono state aggregate con il colorante NPCySH (Figura

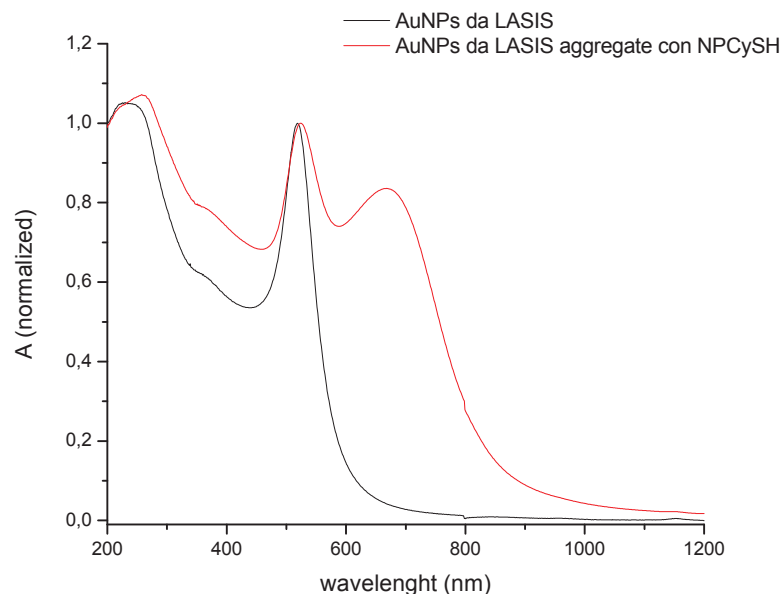


Figura 6.1: Spettro UV-Vis di AuNPs sintetizzate tramite LASIS in NaCl 10⁻⁵ M (linea nera) e spettro UV-Vis delle stesse AuNPs aggregate con il colorante NPCySH (linea rossa). Gli spettri sono stati normalizzati per evidenziare le differenze.

4.2). Per l'aggregazione sono stati mescolati 2 ml di AuNPs 3.73 nM 100 μ l di NaOH 0.06 M e 100 μ l di NPCySH in MeOH. La soluzione è lasciata per 30' sotto agitazione

6. *Protocolli sperimentali*

magnetica dopodiché, è stata centrifugata per 15 minuti a 15.000 rcf. Il surnatante viene separato e le AuNPs riprese in 500 μl di acqua. In Figura 6.1 è riportato lo spettro UV-Vis delle particelle aggregate. Le AuNPs aggregate con il colorante NPCySH sono state depositate su un vetrino e analizzate con spettrometria Raman (Figura 6.2).

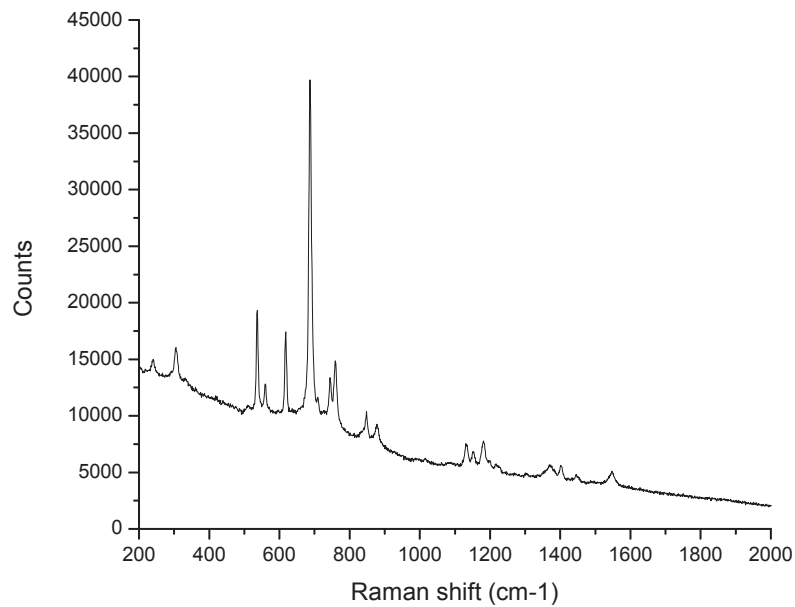


Figura 6.2: Spettro SERS delle AuNPs aggregate con il colorante NPCySH.

6.3 Sintesi del polimero 7c

Il polimero è stato sintetizzato seguendo il protocollo della sintesi su fase solida descritta nel paragrafo 4.1. Abbiamo messo in una siringa 100 mg di resina Wang (0.30 mmol/g, 30 μ mol, 1eq) e 2 ml di DMF. Abbiamo lasciato agitare 1 h per far rigonfiare la resina. A questo punto abbiamo iniziato con la reazione di attacco del primo *building block* (BB). In totale abbiamo eseguito sette reazioni, equivalenti all'aggiunta di sette BB. In Tabella 6.2 sono riassunte le quantità utilizzate per ogni *coupling* con il relativo *building block* inserito. Ogni step della sintesi segue il medesimo protocollo, che viene di seguito illustrato. Il frammento di catena ancorato alla resina viene trattato con piperidina al 20 % in DMF per 5 minuti, poi il solvente viene drenato e si ripete il trattamento con piperidina al 20 % in DMF della durata di 20 minuti. La resina viene lavata con 2 ml di DMF per sei volte e si aggiunge quindi l'aliquota del relativo BB insieme a 150 μ l di HBTU/HOBT 0.5M, 150 μ l di DIPEA 1M e 700 μ l di DMF. La reazione viene mantenuta in agitazione per 1h30'. Infine, il solvente viene drenato e si eseguono sei lavaggi con 2ml di DMF. La procedura si ripete fino al settimo *coupling*.

Tabella 6.2: Sono riportati in tabella i sette *building blocks* utilizzati nella sintesi su fase solida.

Reagenti							
	Building Block	mg	Solvente	V (μ l)	MM (g/mol)	μ mol	eq
Resina	-	100	DMF	-	-	30	1
1° Coupling	BB-PEG ₁₂	67,1	DMF	700	839.98	80	2.7
2° Coupling	BB-Azide	29.0	DMF	700	380.4	76	2.5
3° Coupling	BB-PEG ₁₂	70.2	DMF	700	839.98	84	2.8
4° Coupling	BB-Azide	30.0	DMF	700	380.4	79	2.6
5° Coupling	BB-PEG ₁₂	67.5	DMF	700	839.98	80	2.7
6° Coupling	BB-Azide	30.0	DMF	700	380.4	79	2.6
7° Coupling	PEG _{2kDa}	163.0	DMF	700	\approx 2000	82	2.7
Prodotti sintetizzati							
Prodotto	Coupling effettuati			Caratterizzazioni effettuate			
4c	4			MALDI-TOF, ESI-MS, HPLC			
6c	6			MALDI-TOF, ESI-MS			
6c-Fmoc	6			ESI-MS, HPLC			
7c	7			ESI-MS, MALDI-TOF, NMR			

A questo punto, il polimero viene staccato dalla resina mediante il seguente procedimento di sblocco. Si eseguono due trattamenti con piperidina 20 % in DMF di 5 e 20 minuti. A questo punto la resina viene lavata con DCM e posta in essiccatore per circa 10'. La resina asciutta è stata trattata con la miscela di sblocco (95% TFA, 2.5% TIS e

6. Protocolli sperimentali

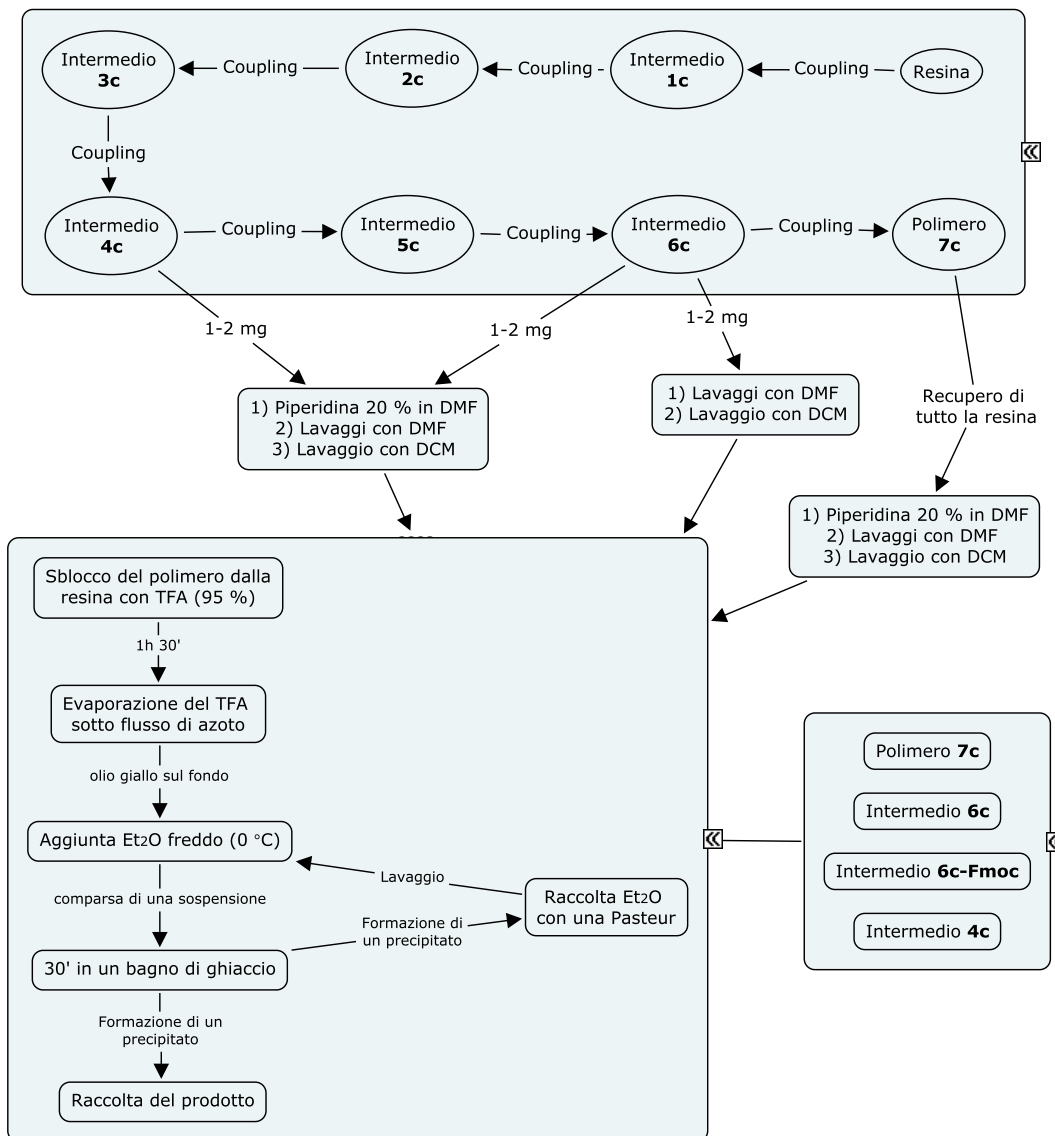


Figura 6.3: Schema delle operazioni eseguite dopo lo sblocco con TFA per ottenere i prodotti.

2.5% H₂O) per 1h 30'. Abbiamo quindi travasato la miscela di sblocco in una *falcon*, e abbiamo fatto evaporare il TFA sotto un leggero flusso di azoto. Una volta evaporato il solvente, si nota un olio giallo sul fondo della fiala. Il residuo viene quindi disperso in etere etilico freddo, al fine di solubilizzare gli scarti della reazione di sblocco dalla resina e cristallizzare meglio il prodotto di reazione. Lasciando la *falcon* per 30' in un bagno di ghiaccio si forma un precipitato giallo chiaro mentre la soluzione diventa limpida. Questa operazione è stata ripetuta altre tre volte, poi il solido è stato essiccato sotto flusso di azoto ottenendo un solido giallo chiaro. Il prodotto è stato lasciato ad asciugare in essiccatore per una notte. In Figura 6.3 sono schematizzate le operazioni di sintesi eseguite dopo lo sblocco del polimero dalla resina. Per la nomenclatura degli oligomeri,

6. Protocolli sperimentali

abbiamo deciso di attenerci al numero di *couplings* effettuati. Con lo sblocco dopo 4, 6 e 7 *couplings* abbiamo quindi ottenuto i prodotti **4c**, **6c** e **7c**. Anche il prodotto **6c-Fmoc** è stato ottenuto con la stessa procedura, ad eccezione del trattamento con piperidina per sbloccare il gruppo protettore della funzione amminica.

Tabella 6.3: Dati delle caratterizzazioni svolte sugli intermedi **4c**, **6c** e **6c-Fmoc**.

Caratterizzazione degli intermedi di reazione	
4c (MM calcolata 1600.75 Da)	
HPLC (Figura C.8)	tempo di ritenzione 25.0 minuti
MALDI (Figura C.10)	1601.34 m/z [M(H)] ⁺ , 1623.33 m/z [M(Na)] ⁺
ESI-MS (Figura C.11)	1601.86 m/z [M(H)] ⁺ , 800.92 m/z [M(H ₂)] ²⁺ , 534.28 [M(H ₃)] ³⁺
6c (MM calcolata 2340.73 Da)	
MALDI (Figura C.12)	2342.01 m/z [M(H)] ⁺ , 2364.02 m/z [M(Na)] ⁺
ESI-MS (Figura C.13)	2341.43 m/z [M(H)] ⁺ , 1171.64 m/z [M(H ₂)] ²⁺ 781.10 m/z [M(H ₃)] ³⁺ e 586.07 m/z [M(H ₄)] ⁴⁺
6c-Fmoc (MM calcolata 2563.52 Da)	
HPLC (Figura C.9)	tempo di ritenzione 35.6 minuti
ESI-MS (Figura C.14)	2564.49 m/z [M(H)] ⁺ , 1282.17 m/z [M(H ₂)] ²⁺ 855.12 m/z [M(H ₃)] ³⁺ , 641.59 m/z [M(H ₄)] ⁴⁺

Caratterizzazione del prodotto 7c

Resa: 56 %.

A causa dell'elevata idrofilicità non si è potuto analizzare il prodotto in HPLC.

MALDI-TOF: il *building block* PEG_{2kDa} attaccato al polimero con il 7° *coupling* è polidisperso, e analizzato con MALDI-TOF mostra una distribuzione di picchi centrata a circa 2000 Da (Figura 6.4). Alla luce di ciò, anche il prodotto finale **7c** presenterà una polidispersione, centrata a circa 4340 Da. Lo spettro MALDI (Figura 6.4) mostra una distribuzione di picchi centrata a circa 4300 m/z.

ESI-MS (Figura C.17): distribuzione di massa nella zona 600-800 m/z e una distribuzione di massa centrata a 1100 m/z. Assenza del segnale dell'intermedio **6c**.

6. Protocolli sperimentali

Il polimero **7c** è stato caratterizzato con $^1\text{H-NMR}$, $^1\text{H}^1\text{H-COSY}$, $^1\text{H}^1\text{H-TOCSY}$, $^1\text{H}^1\text{H-NOESY}$, $^1\text{H}^{13}\text{C-HMQC}$, $^1\text{H}^{13}\text{C-HMBC}$ e $^{13}\text{C-NMR}$ (Figura C.1-C.7). In Tabella 6.4 sono riassunte le assegnazioni $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$ derivanti da queste analisi.

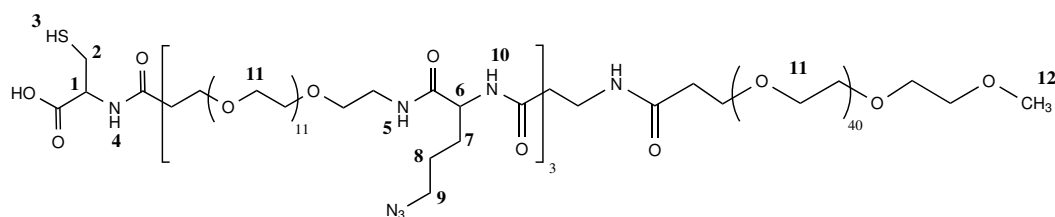


Figura 6.5: Viene mostrato in figura il polimero **7c**. Sono numerati gli atomi a cui sono state date delle assegnazioni con l'analisi NMR mostrate in Tabella 6.4.

Tabella 6.4: Assegnazioni dei *chemical shift* ^1H e ^{13}C e integrazioni dei segnali protonici del polimero **7c**. L'area del segnale del gruppo metossilico è stata normalizzata con un valore pari a 3.0. Le aree degli altri segnali sono rapportate a questo valore di normalizzazione.

	$\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm)	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$ (ppm)	Area teorica (^1H)	Area calcolata (^1H)
1	4.74	53.81	1	0.8
2	2.97	26.49	2	1.3
3	1.54	-	1	0.3
4	7.38	-	1	0.8
5	7.10	-	-	-
6	4.39	52.47	3	2.9
7	1.87 1.63	29.60	12	10.2
8	1.58	25.00		
9	3.25	50.98	6	6.1
10	7.04	-	-	-
11	3.58	70.51	304	306.5
12	3.31	58.97	3.0	3.0

6.4 Sintesi di DOTA-DBCO

Abbiamo messo ad agitare in un pallone 50.1 mg di DOTA-NH₂ (96.6 μ mol, 1eq), 32.8 mg di DBCO-NHS (81.5 μ mol, 0.84 eq), 75 μ l di DIPEA (d = 0,755 g/ml, 438 μ mol, \approx 4,5 eq) e 8 ml di DMF anidra (Figura 4.17). La soluzione presenta del solido non disciolto in soluzione. Dopo 5 giorni la reazione viene fermata. Abbiamo quindi evaporato la DMF e ridisciolto il prodotto (resta sul pallone un olio giallo) in MeOH.

Tabella 6.5: Reagenti utilizzati nella sintesi del prodotto DOTA-DBCO.

Reagenti utilizzati nella sintesi di DOTA-DBCO				
reagente	MM (g/mol)	massa (mg)	volume (μ l)	eq
DOTA-NH ₂	518.56	50.1	-	1
DBCO-NHS	402.40	32.8	-	0.84
DIPEA	129.24	-	75	4.5

Le analisi ESI-MS e HPLC della soluzione mostrano che la reazione non è quantitativa, con presenza di reagenti non reagiti oltre che di prodotto di reazione. Per purificare la soluzione, abbiamo sfruttato la scarsa solubilità del DBCO in H₂O rispetto al prodotto e al DOTA-NH₂ eseguendo un'estrazione con AcOEt. Abbiamo eseguito un totale di 4 estrazioni separando di volta in volta la fase organica dalla fase acquosa. Infine, abbiamo posto la soluzione acquosa sotto flusso di azoto per eliminare eventuali tracce di acetato di etile. Fase acquosa e organica sono state analizzate con HPLC (Figura C.23, Figura C.24, e Tabella 6.6) e ESI-MS.

ESI-MS fase organica (Figura C.19): 403.15 m/z [DBCO-NHS(H)]⁺, 306.14 m/z [DBCO-OH(H)]⁺ e 320.14 m/z [DBCO-OCH₃(H)]⁺.

ESI-MS fase acquosa (Figura C.20): 519.30 m/z [DOTA-NH₂(H)]⁺, 260.13 m/z [DOTA-NH₂(H₂)]²⁺, 806.36 m/z [DOTA-DBCO(H)]⁺.

Il prodotto finale DOTA-DBCO (contaminato per la presenza di DOTA-NH₂) è stato usato senza ulteriore purificazione.

6. *Protocolli sperimentali*

Tabella 6.6: Sono riassunti in tabella i tempi di ritenzione (in minuti) delle analisi HPLC relative agli step di reazione tra DOTA-NH₂ e DBCO-NHS.

OSu	DOTA-NH₂	Prodotto	DBCO-NHS	DBCO-OCH₃	DBCO-OH
Miscela in MeOH dopo 5 gg di reazione					
2.26	2.76	14.21	15.73	17.82	19.64
Acetato di etile					
-	-	-	15.81	17.87	19.67
H ₂ O					
-	2.79	14.34	-	-	-

6.5 Complessazione del DOTA-DBCO con Gd^{3+}

Abbiamo messo in un pallone 16 ml di H_2O contenenti la miscela non meglio purificata di DOTA-DBCO e DOTA- NH_2 . Tale miscela deriva dalla reazione tra DBCO-NHS e DOTA- NH_2 . Non siamo a conoscenza delle concentrazioni delle specie in soluzione, ma tutte le moli di DOTA- NH_2 (96.6 μ moli) aggiunte come reagente nella reazione precedente sono presenti in questa miscela come reagente non reagito o come prodotto DOTA-DBCO. Alla luce di questa osservazione, per complessare la miscela serviranno almeno 96.6 μ moli di Gd^{3+} . Abbiamo quindi aggiunto ai 16 ml di soluzione 287.8 mg di $GdCl_3 \cdot 6H_2O$ (MM 371.70 $g\text{mol}^{-1}$, 774.3 μ moli, ≈ 8 eq). Il pallone è stato posto in agitazione magnetica e, dopo 3 giorni di reazione, si forma in soluzione una sospensione rosa. Il pH è leggermente acido (4-5 con cartina tornasole). Sono stati prelevati 50 μ l di questa soluzione per eseguire la titolazione complessometrica. Abbiamo quindi aggiunto NaOH fino a neutralizzare la soluzione. Con l'aggiunta di base si deposita sul fondo un precipitato rosa chiaro. Il solido è stato filtrato e posto in essiccatore ad asciugare ottenendo 15.3 mg di prodotto.

Tabella 6.7: Reagenti utilizzati nella complessazione di DOTA-DBCO.

Reagenti utilizzati nella complessazione di DOTA-DBCO con $GdCl_3$				
reagente	MM (g/mol)	massa (mg)	μ mol	eq
DOTA- NH_2	518.56	-	96.6	1
DOTA-DBCO	805.36	-	-	-
$GdCl_3 \cdot 6H_2O$	371.70	287.8	774.3	8

Sono stati caratterizzati con l'analisi MALDI-TOF sia il solido precipitato che la soluzione acquosa.

MALDI-TOF in negativo del precipitato: 959.21 m/z [DOTA(Gd)-DBCO] $^-$.

MALDI-TOF in negativo della soluzione: 672.43 m/z [DOTA(Gd)- NH_2] $^-$.

La soluzione di reazione è stata analizzata anche con una retrotitolazione complessometrica. Per l'analisi abbiamo prelevato 50 μ l di soluzione prima dell'aggiunta di NaOH e aggiunto 3 ml di H_2O bidistillata con una punta di spatola di Xylenol Orange. La soluzione è stata titolata con aggiunte sequenziali di EDTA 10.01 mM. Dopo ogni aggiunta è stato registrato lo spettro UV-Vis. Dal punto di fine titolazione, calcolato a 209 μ l di EDTA, abbiamo trovato una percentuale di complessamento di DOTA-DBCO e DOTA- NH_2 pari al 98.6 %.

6.6 Attacco del complesso di Gd^{3+} al polimero tramite cicloaddizione di Huisgen

Per testare la reazione di *click chemistry* abbiamo fatto reagire 0.8 mg di **6c** ($0.34 \mu\text{mol}$, 1 eq) e 1.1 mg di DBCO-NHS ($2.73 \mu\text{mol}$, 8 eq) in 2 ml di MeOH. In questo solvente l'estere attivo DBCO-NHS si trasforma nel corrispondente estere metilico DBCO-OCH₃, ma questo è ininfluenza per la reazione che vogliamo seguire. La reazione è stata lasciata in agitazione magnetica per un giorno. Questa soluzione è stata analizzata con MALDI-TOF.

MALDI-TOF (Figura C.34): calcolata $6\text{c}-(\text{DBCO-OCH}_3)_3$ 3297.38 m/z. Trovata 3298.44 m/z $[\text{M(H)}]^+$

Non sono presenti nello spettro prodotti di condensazione parziale o **6c** non reagito (2340.8 Da).

Per la reazione di *click chemistry* tra [DOTA(Gd)-DBCO]Na e il polimero **7c** (Figura 4.19) non è stato possibile riprodurre la prova effettuata in MeOH a causa dell'insolubilità del complesso. Abbiamo quindi messo in un pallone 340 μl di HCl 29.0 mM, 9.66 ml di H₂O (pH = 3), 4.2 mg di polimero **7c** (MM \approx 4340 Da, $0.97 \mu\text{mol}$, 1 eq) e 7.4 mg di [DOTA(Gd)-DBCO]Na (MM = 959.58 Da, $7.71 \mu\text{mol}$, 8 eq). Abbiamo lasciato mescolare scaldando a T = 30-35 °C per favorire la solubilità del complesso. Dopo 24 h di agitazione la soluzione presenta ancora del solido sul fondo, ma in quantità sensibilmente inferiore. Abbiamo quindi fermato l'agitazione ed eseguito dei passaggi di centrifuga grazie ai quali sono stati separati il solido non reagito e la soluzione (surnatante). Il precipitato è stato analizzato con MALDI-TOF e corrisponde al reagente.

Tabella 6.8: Reagenti utilizzati per la reazione di *click chemistry* tra il polimero **7c** e il complesso DOTA(Gd)-DBCO.

Reagenti usati per la <i>click chemistry</i> tra 7c e DOTA(Gd)-DBCO.				
reagente	MM (g/mol)	massa (mg)	(μmol)	eq
Polimero 7c	4340	4.2	0.97	1
DOTA(Gd)-DBCO	958.58	7.4	7.71	8

MALDI-TOF in negativo precipitato: 959.32 m/z [DOTA(Gd)-DBCO]⁻.

La soluzione separata dal solido è stata centrifugata su *Eppendorf* con membrana ad esclusione dimensionale, con un *cut-off* di 2000 Da per 2 volte (Figura 6.6). Dopo la

6. Protocolli sperimentali

purificazione sono stati ottenuti 1.3 mg di prodotto che è stato analizzato con MALDI-TOF in positivo e in negativo. Purtroppo in entrambe le condizioni gli spettri non hanno mostrato né presenza del reagente **7c** né del prodotto.

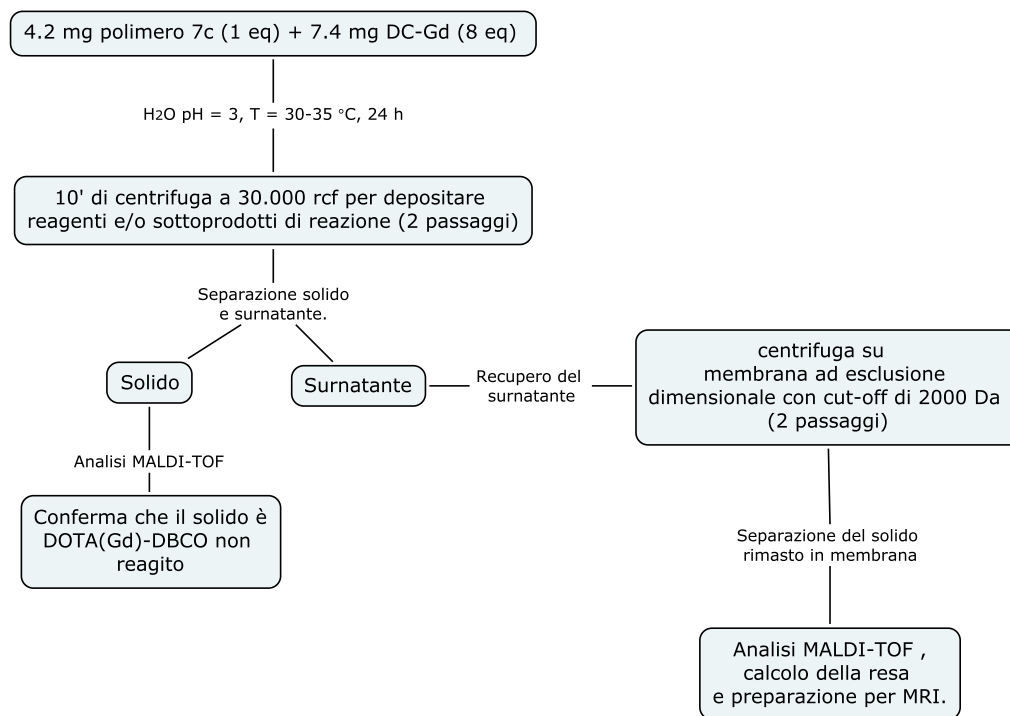


Figura 6.6: Passaggi di purificazione del prodotto di reazione tra DOTA(Gd)-DBCO e polimero **7c**.

6.6.1 Prova di funzionalizzazione del polimero **7c** con DOTA-DBCO

Abbiamo testato un'altra via di reazione facendo reagire il polimero **7c** con DOTA-DBCO non complessato. Abbiamo aggiunto 5.2 mg di polimero **7c** (1.20 μmol , 1eq) a 2 ml di soluzione acquosa contenenti 7.34 μmol di DOTA-DBCO (6.1eq). Dopo un giorno abbiamo fermato la reazione e caratterizzato la soluzione con ESI-MS.

ESI-MS (Figura C.35): 519.27 m/z [DOTA-NH₂(H)]⁺, 260.15 m/z [DOTA-NH₂(H₂)]²⁺, una distribuzione di massa centrata a 720 Da [7c-DOTA-DBCO(H_n)]ⁿ⁺.

6.7 Analisi MRI del sistema SuperDOTA

L'analisi MRI è stata effettuata su una soluzione acquosa 112.5 μM in SuperDOTA (MM ≈ 7220 Da, 1.3 mg in 1.6 ml di H_2O). I tempi di rilassamento sono stati misurati su questa soluzione e su le rispettive diluizioni 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16. Come riferimento sono stati misurati i tempi di rilassamento di una soluzione di GdCl_3 500 μM e le sue rispettive diluizioni 1:2, 1:10, 1:20 e 1:50. I risultati dell'analisi sono riportati in Tabella 6.9.

Tabella 6.9: Valori $1/T_1$ e r_1 della soluzione di SuperDOTA 112.5 μM e di una soluzione di GdCl_3 utilizzata come riferimento.

	SuperDOTA			GdCl_3		
	C (μM)	$1/T_1$ (s^{-1})	r_1 ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	C (μM)	$1/T_1$ (s^{-1})	r_1 ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Diluizione 1	112.5	2.60		500	8.20	
Diluizione 2	56.3	1.58		250	4.52	
Diluizione 3	28.1	0.99	19.5	50	1.29	16.8
Diluizione 4	14.1	0.72		25	0.76	
Diluizione 5	7.0	0.54		10	0.56	

6.8 Analisi MRI del sistema AuNPs-SuperDOTA

Abbiamo mescolato 800 μl di superDOTA 112.5 μM , 1 ml di AuNPs 13.2 nM e lasciato agitare per 2h. Dopodiché, abbiamo centrifugato la soluzione per 10' a 15.000 rcf, tolto il surnatante e ripreso le AuNPs precipitate in 800 μl di H_2O (Figura 6.7).

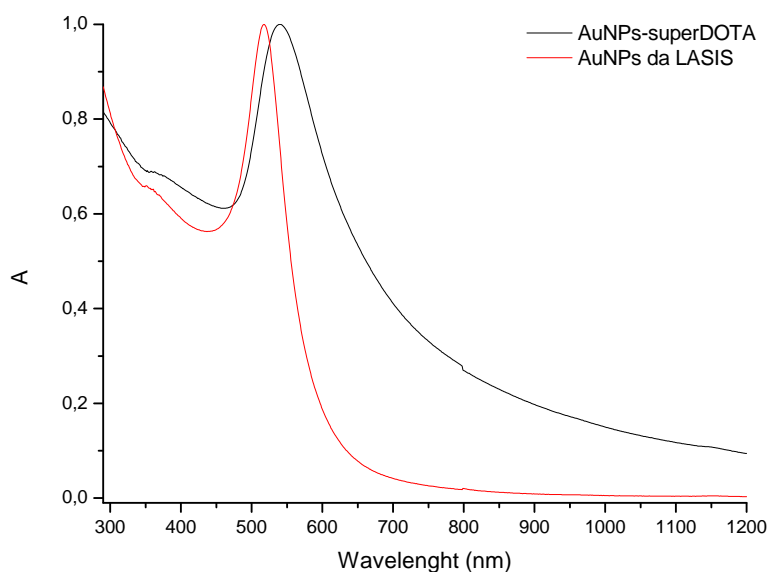


Figura 6.7: Spettri UV-Vis di AuNPs sintetizzate tramite LASIS e del sistema AuNPs-superDOTA dopo centrifuga e ripreso in H_2O . Gli spettri sono stati normalizzati per evidenziare le differenze.

Paragonando lo spettro UV-Vis del surnatante tolto dopo la centrifuga e lo spettro UV-Vis della soluzione di superDOTA 112.5 μM (Figura 6.8) abbiamo calcolato una percentuale di funzionalizzazione sulle AuNPs del 63 %, che corrisponde ad una concentrazione di superDOTA in soluzione pari a 70.9 μM . La soluzione di AuNPs-superDOTA è stata analizzata con MRI senza tuttavia mostrare segnale.

6. *Protocolli sperimentali*

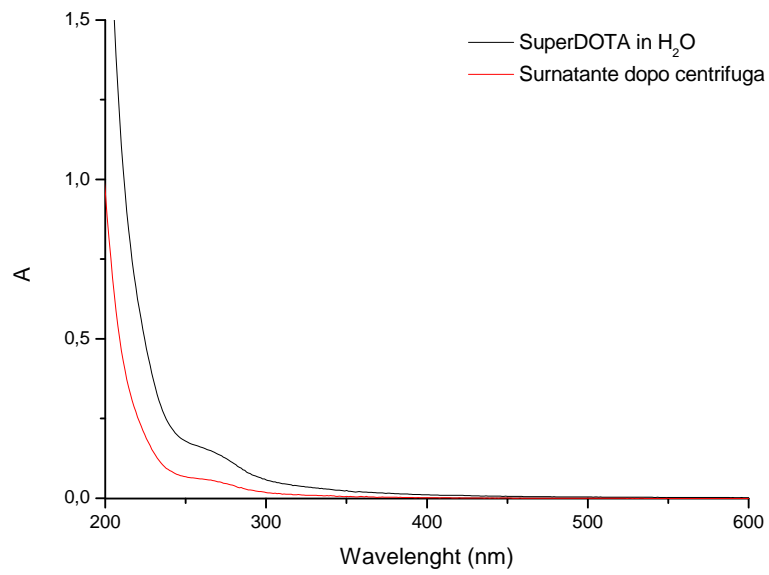


Figura 6.8: Sovrapposizione degli spettri UV-Vis di superDOTA 112.5 μM in H_2O e del surnatante ottenuto dopo la centrifuga della soluzione di AuNPs e superDOTA. Paragonando le diverse intensità degli spettri è stata calcolata una percentuale di funzionalizzazione pari al 63 %.

Appendice A. Principali tecniche di imaging

Radiografia convenzionale e Tomografia computerizzata

La radiografia convenzionale sfrutta la differente capacità di penetrazione dei raggi X attraverso le diverse parti del corpo umano. La visibilità delle strutture sane rispetto a quelle malate dipende dalla loro differente capacità di assorbire i raggi. Con la radiografia convenzionale, ci sono quattro livelli base di densità: gas, grassi, tutti gli altri tessuti molli e le strutture calcificate. I raggi che passano attraverso l'aria sono poco attenuati e causano l'oscuramento della radiografia, mentre le ossa, formate principalmente da composti del calcio, assorbono bene i raggi, e quindi appaiono bianche. I tessuti molli come muscoli, viscere, sangue, fluidi in generale, intestino etc, hanno una capacità di assorbimento simile, e appaiono con la stessa tonalità di grigio. I grassi assorbono in misura leggermente minore, e appaiono un po' più scuri rispetto agli altri tessuti molli. Le immagini, sono registrate in forma digitale, e visualizzate direttamente al computer. L'immagine con i raggi-X è bidimensionale ed è perciò necessario registrare da due punti per avere informazioni circa la terza dimensione. Questa tecnica, oltre ad utilizzare radiazione ionizzante presenta bassa risoluzione e sensibilità, limitandone di le applicazioni. La tomografia computerizzata (CT) sfrutta la trasmissione dei raggi-X come nella radiografia convenzionale, ma la sorgente di raggi-X e il detector ruotano attorno al paziente. Con questa tecnica, il range di densità registrate è amplificato di circa 10 volte rispetto alla radiografia convenzionale. Con la CT è possibile distinguere non solo i grassi dagli altri tessuto molli, ma si distinguono differenze di densità anche tra i diversi tessuti molli, e questo consente di distinguere i tumori dai tessuti sani circostanti. Il valore di attenuazione è espresso su scala arbitraria (Figura A.1). Il range ed i livelli di densità che possono essere selezionati consentono di percepire differenze molto informative (Figura A.2). In radiografia e in CT possono essere utilizzati degli agenti di contrasto, come il bario per il tratto gastrointestinale o lo iodio utilizzato per amplificare le differenze in urografia e angiografia.^[9] Nonostante la CT abbia una risoluzione molto più elevata rispetto alla radiografia classica, la bassa sensibilità e l'utilizzo di radiazioni ionizzanti, ne limitano in parte l'applicabilità.

Ultrasuoni

La tecnica ad ultrasuoni utilizza onde sonore ad elevata frequenza, in genere nel range dei 2-10 MHz. Le onde sono dirette attraverso il corpo da un trasduttore a contatto con la pelle, il quale registra l'eco in uscita che viene poi elettronicamente amplificato. Nei tessuti molli, la velocità di propagazione è ≈ 1540 m/s, abbastanza indipendente dalla sua frequenza. Il tempo impiegato dall'eco per tornare al trasduttore è proporzionale alla distanza percorsa nel mezzo.^[9] Risulta particolarmente utile nello studio di tessuti molli troppo simili per dare un adeguato contrasto con l'analisi radiologica. La tecnica è ampiamente utilizzata per *imaging* ginecologico, ostetrico, cardiaco, vascolare e addominale. Poiché anche i fluidi conducono bene gli ultrasuoni, la tecnica è applicabile per la diagnosi di cisti e strutture contenenti liquidi come la vescica, il sistema biliare e il feto nel sacco amniotico. L'*imaging* con ultrasuoni soffre tuttavia molti svantaggi come una bassa sensibilità, risoluzione e profondità.

Immagini con radionuclidi

Tre componenti sono necessarie per un'analisi in medicina nucleare: (i) un agente che si accumuli principalmente su determinati organi o componenti biologiche di interesse; (ii) un radionuclide che possa essere legato a questo agente per produrre fotoni con energia sufficiente per uscire dal corpo; (iii) un mezzo per rivelare i fotoni ad elevata energia.^[1]

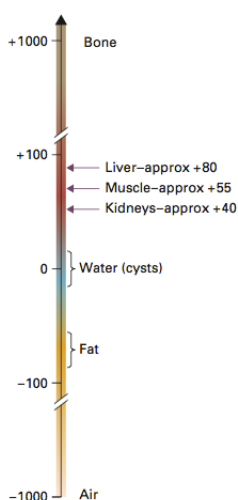


Figura A.1: Scala rappresentante le densità, in unità Hounsfield, di varie strutture del corpo umano nella CT.^[9]

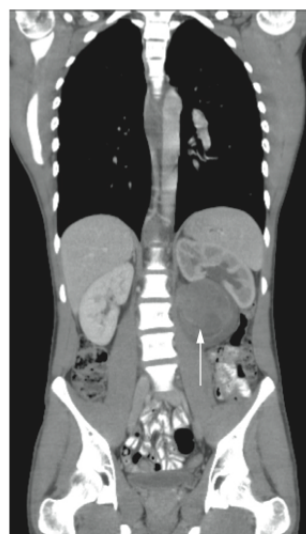


Figura A.2: CT del torace, addome e bacino. È presente una massa retroperitoneale (freccia) sovrapposta al rene sinistro che causa idronefrosi.^[9]

Appendice A. *Principali tecniche di imaging*

Gli isotopi radioattivi utilizzati in questo ambito emettono raggi γ prodotti dal decadimento radioattivo dei nuclei. Esistono molti isotopi radioattivi naturali, come il potassio-40 e l'uranio-235, tuttavia il loro tempo di decadimento è troppo elevato (emivita di centinaia di anni) per applicazioni mediche. Per questo motivo sono stati ottenuti degli isotopi artificiali con tempi di dimezzamento di alcune ore o, al più, giorni come il tecnezio-99m, l'indio-111, il gallio-67, lo iodio-123 e il tallio-201.^[9] La risoluzione spaziale di questa tecnica è abbastanza bassa, tuttavia, se una parte del tessuto manca o è sovrapposta a del tessuto anormale, se ne hanno delle chiare indicazioni nell'immagine risultante (Figura A.3). In alcuni casi è possibile utilizzare la *Tomografia ad Emissione*, in cui la camera gamma si muove attorno al paziente, registrando immagini a sezioni, analogamente

a quanto avviene nella tomografia computerizzata. In questo modo, sono rilevabili lesioni non visibili con la tecnica standard. Un'altra tecnica di diagnosi correlata è la *Tomografia ad emissione di positroni* (PET) che utilizza isotopi emettitori, prodotti da un ciclotrone immediatamente prima dell'uso. Grazie al ciclotrone, ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O e ^{18}F possono essere prodotti direttamente in loco. Usando isotopi di elementi importanti biologicamente, come quelli citati, la PET può essere utilizzata per lo studio di processi fisiologici come l'irroramento di sangue nei tessuti, la metabolizzazione di sostanze come il glucosio o l'immagazzinamento di neurotrasmettitori. L'agente più utilizzato è il ^{18}F -fluorodeossiglucosio (FDG).^[9] Questo è un analogo del glucosio, e viene assorbito dalle cellule nel normale metabolismo. Poiché le cellule tumorali mostrano un maggiore metabolismo, esse assorbiranno una quantità maggiore di agente, e saranno visibili al PET. Gli svantaggi delle tecniche di *imaging* con radionuclidi sono però molte, a partire dalla bassa risoluzione spaziale, ma certamente anche per l'utilizzo di radionuclidi.

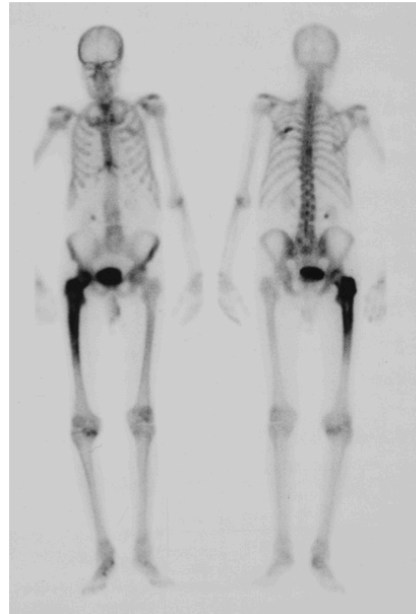


Figura A.3: Scansione con radionuclidi dello scheletro, utilizzando un agente a base di ^{99m}Tc . Il maggior assorbimento di agente nel femore del paziente è dovuto alla malattia di Paget.^[9]

Appendice B. Teoria dell'MRI

Principi della risonanza magnetica^[65]

La spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) si basa sulla interazione tra una radiazione elettromagnetica nel campo delle radiofrequenze (1-1000 MHz) e un campione di nuclei atomici che possiedono momento di spin (I), inseriti all'interno di un campo magnetico uniforme. Una particella carica dotata di momento di spin I possiede anche un momento magnetico μ . I due vettori sono paralleli tra di loro e, nel caso del protone, diretti nello stesso verso. La costante di proporzionalità tra I e μ è detta rapporto giromagnetico nucleare (γ_N), ed è una costante caratteristica di ogni nucleo (Equazione B.1). Nel Sistema Internazionale il campo magnetico è misurato in Tesla, e per l'atomo di idrogeno γ_N vale $2.675 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} \text{ T}^{-1}$. Il numero quantico di spin nucleare I per il protone (^1H) vale $1/2$. Il vettore momento di spin possiede un modulo il cui quadrato è definito dall'operatore I^2 (Equazione B.2) con σ che è la funzione di spin. Il momento di spin può avere $2I+1$ orientazioni rispetto ad una direzione di riferimento (asse z in genere). Queste orientazioni sono gli autovalori dell'operatore di proiezione secondo l'asse di riferimento, I_z , definite dal numero quantico m_I , che può assumere i valori da $-I$ a $+I$ con intervalli unitari (Equazione B.3). Nel caso del protone ($I = 1/2$) le proiezioni del momento angolare di spin sono $+1/2$ e $-1/2$, e le corrispondenti autofunzioni vengono indicate con α e β (Equazione B.4).

$$\vec{\mu} = \gamma_N \cdot \vec{I} \quad (\text{B.1})$$

$$I^2 \sigma = I \cdot (I + 1) \hbar^2 \sigma \quad (\text{B.2})$$

$$I_z \sigma = m_I \hbar \sigma \quad m_I = -I, -I + 1, \dots, +I \quad (\text{B.3})$$

$$\begin{aligned} I_z \alpha &= +\frac{1}{2} \hbar \alpha & \mu_z \alpha &= +\frac{1}{2} \gamma_N \hbar \alpha \\ I_z \beta &= -\frac{1}{2} \hbar \beta & \mu_z \beta &= -\frac{1}{2} \gamma_N \hbar \beta \end{aligned} \quad (\text{B.4})$$

Queste informazioni si possono sintetizzare con una rappresentazione vettoriale del momento angolare di spin nucleare, come mostrato in Figura B.1. Il prodotto $\gamma_N \hbar$ può

Appendice B. Teoria dell'MRI

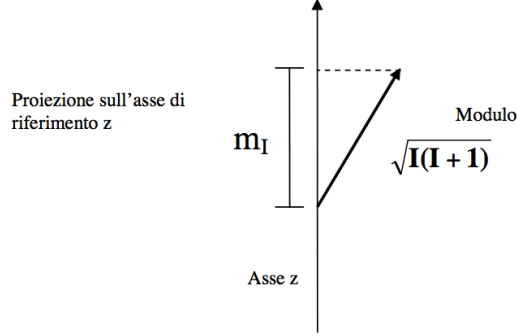


Figura B.1: Rappresentazione vettoriale del momento angolare di spin nucleare.

essere espresso in termini di fattore g nucleare (g_N) e del magnetone nucleare β_N , per i quali vale la relazione:

$$\gamma_N \hbar = g_N \beta_N \quad \beta_N = \frac{e\hbar}{2m_p c} \quad (\text{B.5})$$

I due autostati α e β sono degeneri in assenza di un campo magnetico esterno, ed avranno uguali popolazioni. In presenza di un campo magnetico statico la degenerazione viene rimossa, i due livelli si separano in energia ed avranno popolazioni diverse. L'energia di interazione di un momento magnetico con un campo magnetico B_0 diretto lungo una direzione che possiamo assumere essere l'asse z è:

$$E = -\vec{\mu} \vec{B} = -\mu_z B_0 \quad (\text{B.6})$$

per cui l'energia dei due livelli diventa:

$$E_\alpha = -\frac{1}{2} g_N \beta_N B_0 = -\frac{1}{2} \gamma \hbar B_0 \quad (\text{B.7})$$

$$E_\beta = +\frac{1}{2} g_N \beta_N B_0 = +\frac{1}{2} \gamma \hbar B_0 \quad (\text{B.8})$$

$$\Delta E = E_\beta - E_\alpha = g_N \beta_N B_0 = \gamma \hbar B_0 \quad (\text{B.9})$$

dove gli spin α (paralleli a B_0) hanno un'energia inferiore agli spin β (antiparalleli a B_0). La differenza di energia ΔE dipende dal valore del campo magnetico. All'equilibrio termico le popolazioni dei due livelli (N_α e N_β) sono regolate dalla legge di Boltzmann:

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{\frac{g_N \beta_N B_0}{k_B T}} \cong 1 + \frac{g_N \beta_N B_0}{k_B T} \quad (\text{B.10})$$

dove k_B è la costante di Boltzmann e T è la temperatura assoluta. Nelle condizioni sperimentali normalmente utilizzate negli spettrometri NMR, il campo magnetico è di alcuni Tesla e risulta $g_N \beta_N B_0 \ll k_B T$, quindi il rapporto N_α/N_β è di poco superiore ad 1. Si ha cioè un piccolo eccesso di spin nello stato a minore energia (stato α). Questa

piccola differenza di popolazione genera un momento magnetico netto (magnetizzazione) in un insieme di spin nucleari immersi in un campo magnetico. La magnetizzazione, rappresentata da un vettore M diretto lungo la direzione z , è proporzionale alla differenza di popolazione ΔN tra i livelli α e β , e quindi al valore del campo magnetico B_0 . Le componenti dei momenti magnetici secondo le direzioni x e y sono presenti con uguale probabilità in tutte le direzioni, dunque le magnetizzazioni M_x e M_y sono nulle. Per indurre transizioni tra i due livelli di spin nucleare si deve applicare al sistema un campo elettromagnetico oscillante ad una frequenza che soddisfi la condizione di risonanza. Lo scambio di energia, avviene tra il campo magnetico B_1 oscillante della radiazione elettromagnetica ed il momento magnetico nucleare, e la probabilità di transizione è diversa da zero solo se la direzione del campo magnetico B_1 è perpendicolare al campo magnetico statico B_0 . Questa regola deriva dalla definizione di probabilità di transizione, che dipende dal quadrato del modulo del momento di transizione μ tra due stati a e b (stato iniziale e stato finale), definito come:

$$\mu = \int \Psi_b^* \hat{\mu} \Psi_a d\tau \quad (\text{B.11})$$

Dove μ indica l'operatore momento di dipolo, che nel caso della risonanza magnetica è il momento di dipolo magnetico descritto dall'operatore $\hat{\mu} = \gamma_N \hat{I}$. In generale, perché possa esserci un assorbimento di radiazione occorre che il momento di dipolo di transizione sia diverso da zero. Se si considera uno spin con $I = 1/2$, le due funzioni a e b corrispondono ad α e β . Il momento di transizione è diverso da zero solo se la radiazione ha una componente ortogonale a Z (ad esempio è una radiazione polarizzata planarmente, con la componente magnetica oscillante lungo X). Inoltre, risulta che le transizioni indotte dalla radiazione possono far avvenire transizioni solo tra stati che differiscono nel loro numero quantico m_I (proiezione lungo l'asse di quantizzazione) di una unità, cioè $\Delta m_I = \pm 1$, che rappresenta la regola di selezione per le transizioni di spin.

Descrizione di un esperimento ad impulsi

Nelle spettroscopie di assorbimento quali UV-VIS il campione in esame viene attraversato da un raggio di radiazione monocromatica e viene misurato l'assorbimento della radiazione ad ogni lunghezza d'onda. Nel caso di una spettroscopia ad impulsi quale l'NMR invece si invia sul campione un breve, intenso impulso di radiazione e si misura la variazione di magnetizzazione del campione. Il breve impulso in realtà equivale ad una eccitazione a larga banda, contenente cioè un gran numero di lunghezze d'onda intorno al valore nominale di frequenza della radiazione. L'impulso eccita o viene assorbito da molte transizioni NMR, ed il sistema, terminato il breve impulso, rilassa verso lo stato iniziale. In questo modo si ha il vantaggio di non dover fare una lenta scansione delle

lunghezze d'onda, come nell'UV-VIS, ottenendo lo stesso effetto con un solo impulso. Per la descrizione dei processi che avvengono nell'esperimento NMR ad impulsi si può ricorrere ad una descrizione vettoriale dell'insieme degli spin, esaminando il moto del vettore magnetizzazione risultante dalla somma vettoriale di tutti i momenti magnetici degli spin presenti nel sistema. Consideriamo un insieme di spin nucleari $I = 1/2$, ed il vettore della magnetizzazione totale, che indicheremo con M , dato dalla somma vettoriale di tutti i momenti magnetici associati a ciascuno spin. Come detto precedentemente, in assenza di campo magnetico esterno tutte le componenti di M sono nulle. Se l'insieme di spin (il campione) viene immerso in un campo magnetico B_0 diretto lungo l'asse Z , si genera una magnetizzazione netta solo nella direzione Z . Il moto di un sistema dotato di momento magnetico e di momento angolare all'interno di un campo magnetico uniforme è simile a quello di una trottola con l'asse di rotazione inclinato rispetto alla perpendicolare. Per la trottola, si ha una precessione dell'asse di rotazione attorno alla verticale, indotto dalla forza gravitazionale che fa variare la direzione del momento angolare, cioè dell'asse di rotazione. In modo simile, se la magnetizzazione ha componenti M_x ed M_y non nulle, inizia un moto di precessione attorno alla direzione del campo magnetico, come descritto in Figura B.2. La frequenza del moto di precessione attorno all'asse Z , che

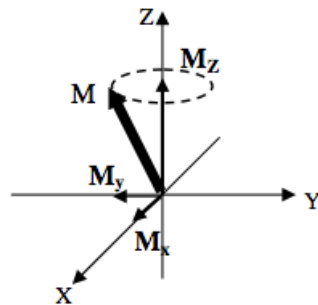


Figura B.2: Rappresentazione vettoriale della magnetizzazione M di un sistema posto all'interno di un campo magnetico uniforme diretto lungo l'asse z .

viene sempre considerato parallelo al campo magnetico statico esterno, si può calcolare risolvendo le equazioni del moto del vettore magnetizzazione. Si ottiene:

$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad (\text{B.12})$$

Durante l'impulso di radiazione la magnetizzazione si sposta sul piano XY . Quando la componente lungo Z diventa nulla si parla di un impulso $\pi/2$. Dopo un tale impulso il vettore M inizia un moto di precessione attorno a Z a cui si associa una progressiva scomparsa della magnetizzazione XY e ricomparsa della magnetizzazione Z , secondo i tempi caratteristici T_2 e T_1 . La misurazione della componente M_y fornisce il segnale detto FID (*Free Induction Decay*), cioè un segnale di evoluzione della magnetizzazione

non soggetto a radiofrequenze, che decade verso lo stato di equilibrio $M_y = 0$ (Figura B.3). La componente M_y e quindi il FID, hanno un'intensità che tende a zero con costante di tempo T_2 . In presenza di più nuclei con diversa frequenza di risonanza, si può descrivere la magnetizzazione come somma di magnetizzazioni derivanti dai diversi insiemi di nuclei uguali. La M_y di ciascun insieme procede con diversa frequenza e il FID appare come una somma di oscillazioni smorzate.

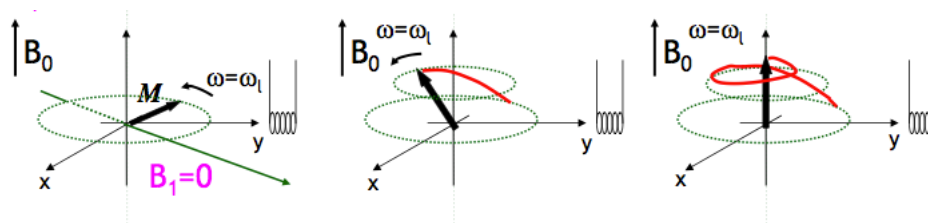


Figura B.3: Rappresentazione del moto di precessione della magnetizzazione in seguito ad un impulso $\pi/2$ di radiazione con componente B_1 parallela ad X.

Misura dei tempi di rilassamento T_1 e T_2

Dopo che un sistema di spin è stato eccitato da un impulso, va incontro ad una serie di processi di rilassamento che prendono il nome di *rilassamento longitudinale* e *rilassamento trasversale*. I tempi con cui questi due rilassamenti avvengono (rispettivamente T_1 e T_2) e la densità di spin protonica sono i principali fattori di contrasto tra i vari tessuti e organi del corpo umano. Per l'MRI in ambiente biomedico, il primo è il *rilassamento longitudinale* dei protoni, che avviene con il rilassamento del segnale $M_z(t)$ verso il valore iniziale M_0 . La funzione che descrive questo processo ha un andamento esponenziale (Equazione B.13). Dopo l'impulso di eccitazione, T_1 è il tempo in cui la magnetizzazione lungo z (M_z) ha un valore di $0.63 M_0$, quindi più T_1 è piccolo, e più la magnetizzazione torna velocemente all'equilibrio termico.

$$M_z(t)/M_0 = 1 - e^{-t/T_1} \quad (\text{B.13})$$

Il rilassamento viene fortemente influenzato dall'interazione degli spin eccitati con l'intorno e quindi nel caso dell'MRI di sistemi biologici dall'interazione, in particolare delle molecole di acqua, con biomolecole e/o membrane cellulari. In Figura B.4 sono riportati i valori di T_1 per i principali tessuti e organi. Processi fisiologici normali e anormali, lo stato di salute di un tessuto e molti altri fattori influenzano le quantità di acqua che risiede entro e tra i tessuti, influenzando quindi il valore T_1 . Questo è il motivo per cui variazioni spaziali nel valore di T_1 sono interessanti. Il secondo processo di rilassamento è chiamato *rilassamento trasversale*. In questo caso la magnetizzazione diminuisce,

Appendice B. Teoria dell'MRI

sopo il termine dell'impulso, sul piano XY. Anche questo processo, come nel caso del rilassamento longitudinale, ha un andamento esponenziale (Equazione B.14). Il parametro T_2 può essere espresso dalla somma di due contributi distinti: uno è lo stesso parametro T_1 già visto, mentre l'altro è un distinto fenomeno di rilassamento chiamato *componente secolare* e descritto da T_2^* (Equazione B.15). Questo rilassamento quindi accelera il decadimento di $M_{xy}(t)$ nel tempo.

$$M_{xy}(t)/M_{xy}(0) = e^{-t/T_2} \quad (\text{B.14})$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{2T_1} + \frac{1}{T_2^*} \quad (\text{B.15})$$

Il contributo secolare coinvolge lente e casuali variazioni del campo magnetico locale, derivanti da lenti movimenti delle molecole circostanti.

Tissue	PD ρ^+ / mm^3 , rel.	T_1 , 1 T (ms)	T_1 , 1.5 T (ms)	T_1 , 3 T (ms)	T_2 (ms)
Pure H ₂ O	1	4000		4000	4000
Brain					
CSF	0.95	2500	2500	2500	200
White matter	0.6	700	800	850	90
Gray matter	0.7	800	900	1300	100
Edema			1100		110
Glioma		930	1000		110
Liver			500		40
Hepatoma			1100		85
Muscle	0.9	700	900	1800	45
Adipose	0.95	240	260		60

Figura B.4: Tipici valori di densità protonica, di T_1 (a 1 T, 1.5 T e 3 T) e di T_2 . T_1 è dipendente dal campo esterno ed aumenta con l'aumentare di B_0 . T_2 al contrario è per lo più indipendente dal campo esterno.^[1]

Il movimento molecolare risulta quindi molto importante per questo processo. In un solido, il movimento nucleare è molto ridotto, e i lenti cambiamenti del campo locale determinano un T_2 che sarà più breve di T_1 . Nel caso opposto, in liquidi non viscosi come l'acqua (Figura B.4), il movimento molecolare e le risultanti fluttuazioni nei campi locali sono troppo rapide per causare defasamento. In questo caso particolare avremo $T_2 \approx T_1$. I tessuti molli hanno un comportamento intermedio tra questi due casi limite, con T_2 che sarà più breve di T_1 di un fattore 3-10 volte.^[1]

Strumentazione per MRI

Un moderno sistema per MRI consiste di 3 principali componenti collegate ad un computer (Figura B.5):

Appendice B. Teoria dell'MRI

- Un campo magnetico uniforme (generato da un magnete superconduttore o da un elettromagnete) in cui il paziente viene immerso;
- Tre bobine su cui viene indotta una corrente oscillante per produrre gradienti di campo elettromagnetico;
- Dei controlli elettronici che generano tramite le bobine impulsi di energia elettromagnetica. Le stesse bobine in genere, raccolgono il debole segnale.

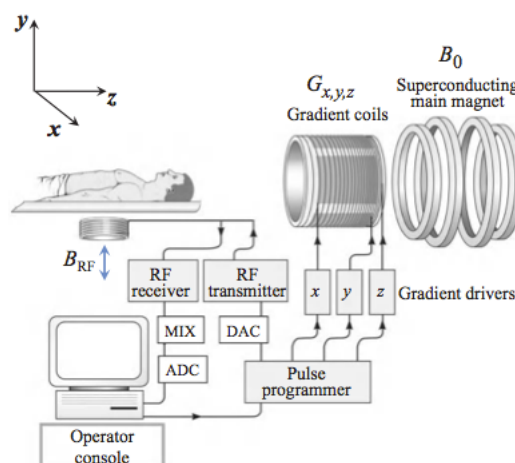


Figura B.5: Strumentazione di base per l'analisi MRI.

La durata dell'impulso a radiofrequenza e il gradiente dei campi sono determinati da un sistema computerizzato. Il magnete principale produce un campo magnetico B_0 compreso tra 0.3 e 3.0 T. Il campo deve inoltre essere costante nel tempo, e altamente uniforme su un volume abbastanza grande per accomodare buona parte del corpo del paziente. Il magnete utilizzato può essere superconduttore oppure un semplice elettromagnete. Magneti superconduttori a base di leghe Niobio-Tallio possono condurre la corrente senza nessuna resistenza, ma richiedono un raffreddamento del sistema alla temperatura dell'elio liquido. I gradienti di campo in x, y e z sono prodotti da tre bobine indipendenti, che sono attivate ad intermittenza dai sistemi di controllo.^[1]

Appendice C. Spettri e cromatogrammi

1. Sono riportate di seguito le analisi NMR effettuate sul polimero 7c.

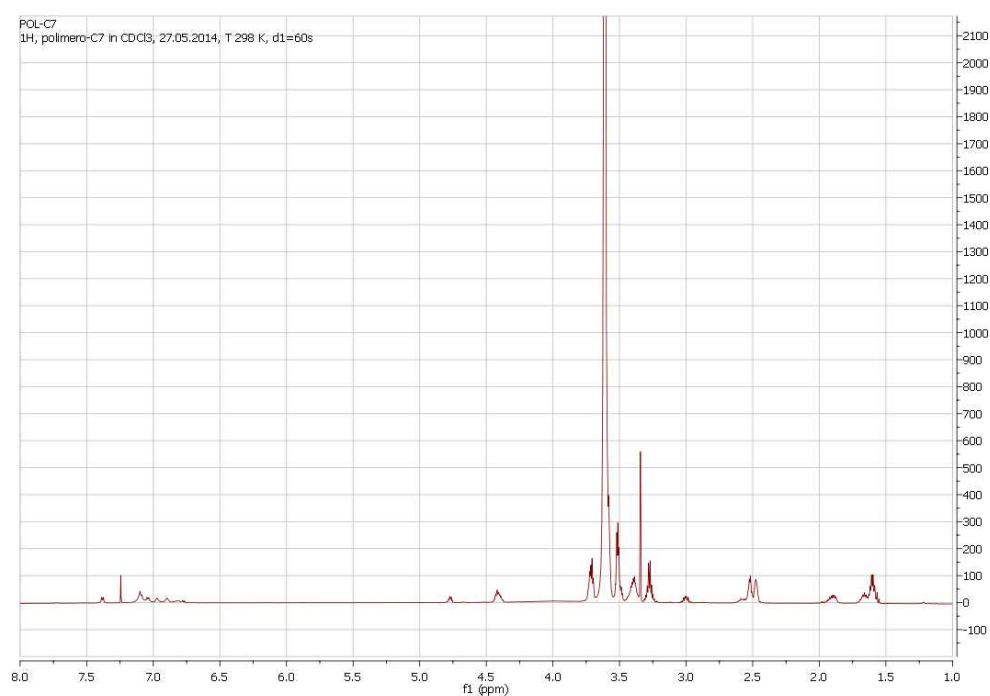


Figura C.1: Spettro ^1H -NMR del polimero (7c).

Appendice C. Spettri e cromatogrammi

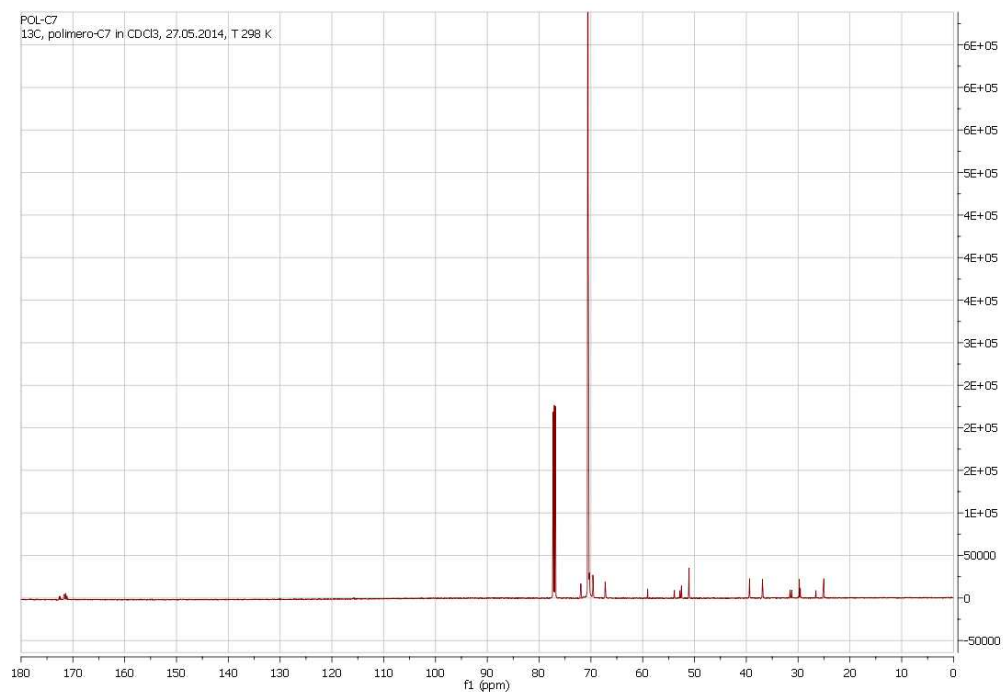


Figura C.2: Spettro ^{13}C -NMR del polimero (7c).

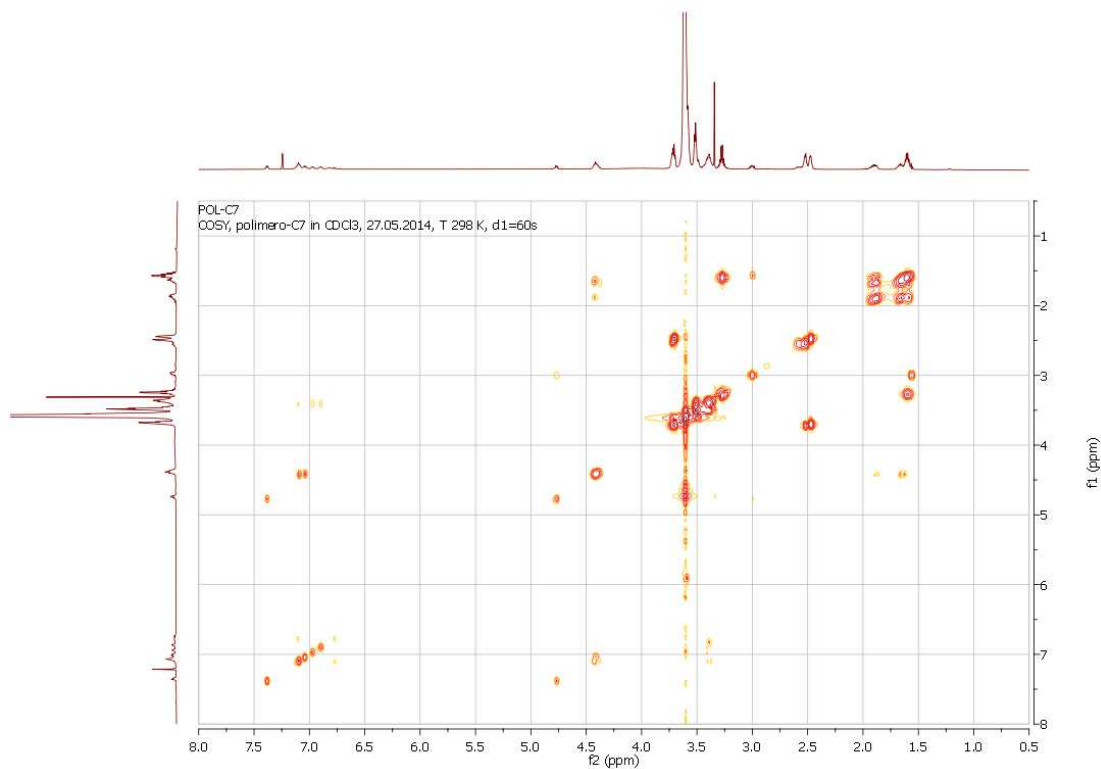


Figura C.3: Spettro ^1H - ^1H -COSY del polimero (7c).

Appendice C. Spettri e cromatogrammi

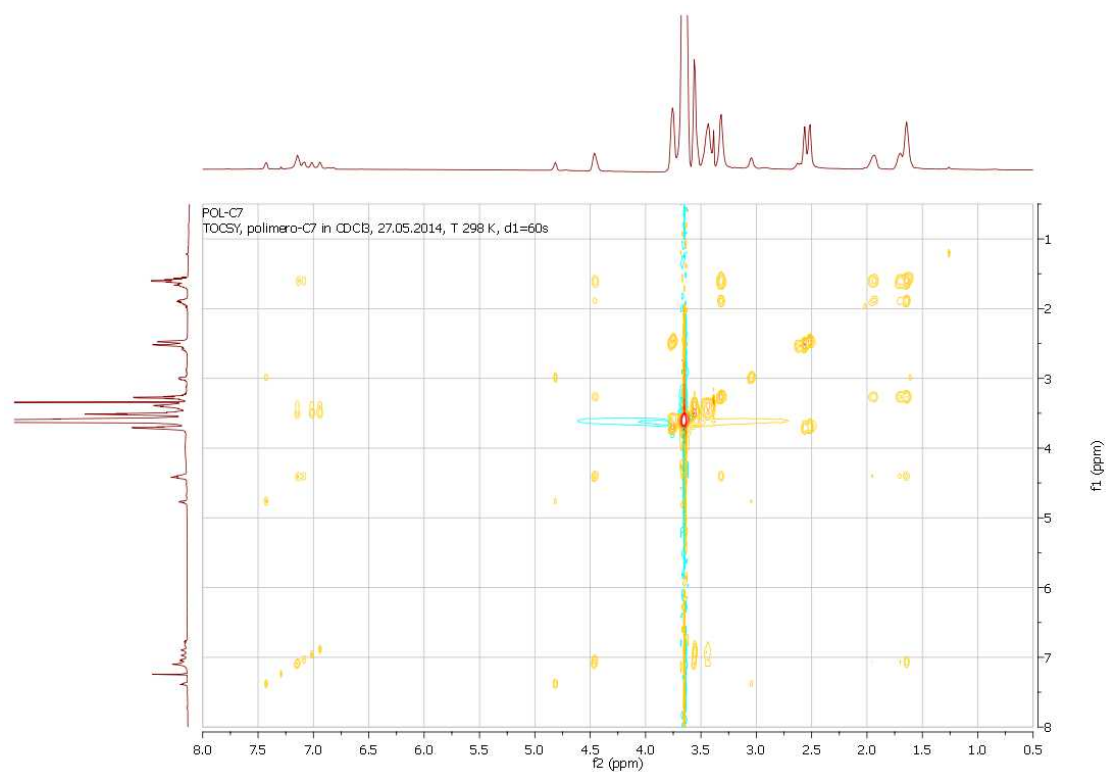


Figura C.4: Spettro $^1\text{H}^1\text{H}$ -TOCSY del polimero (7c).

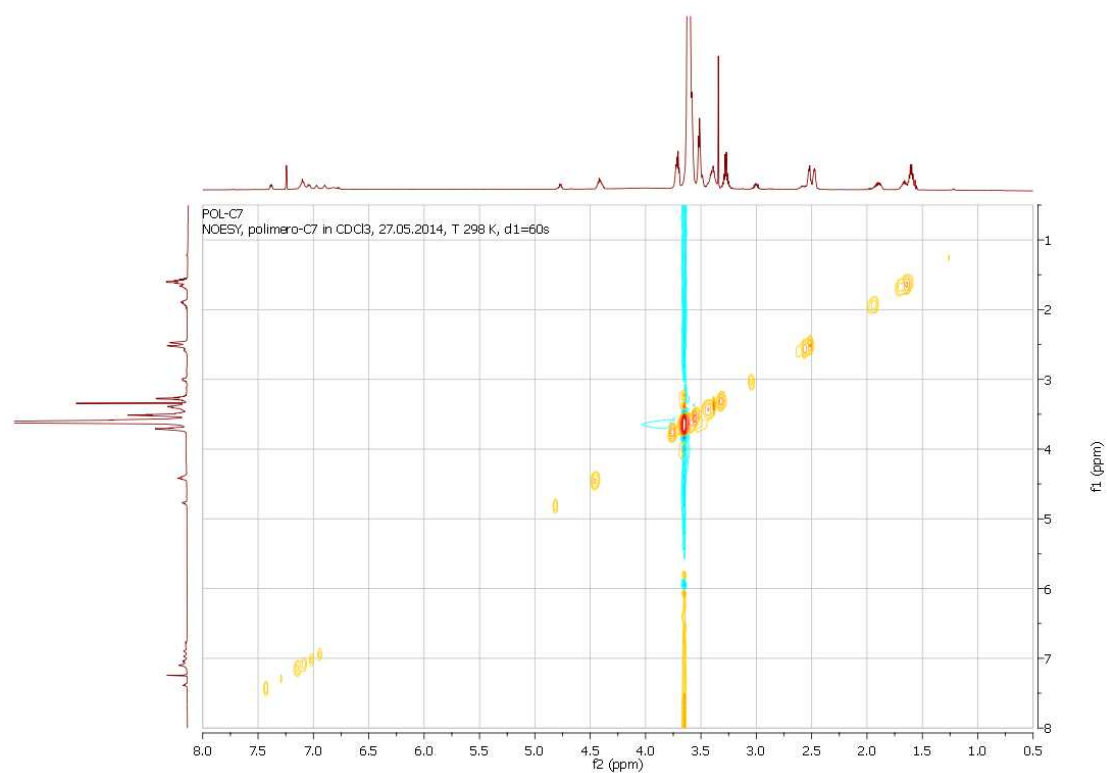


Figura C.5: Spettro $^1\text{H}^1\text{H}$ -NOESY del polimero (7c).

Appendice C. Spettri e cromatogrammi

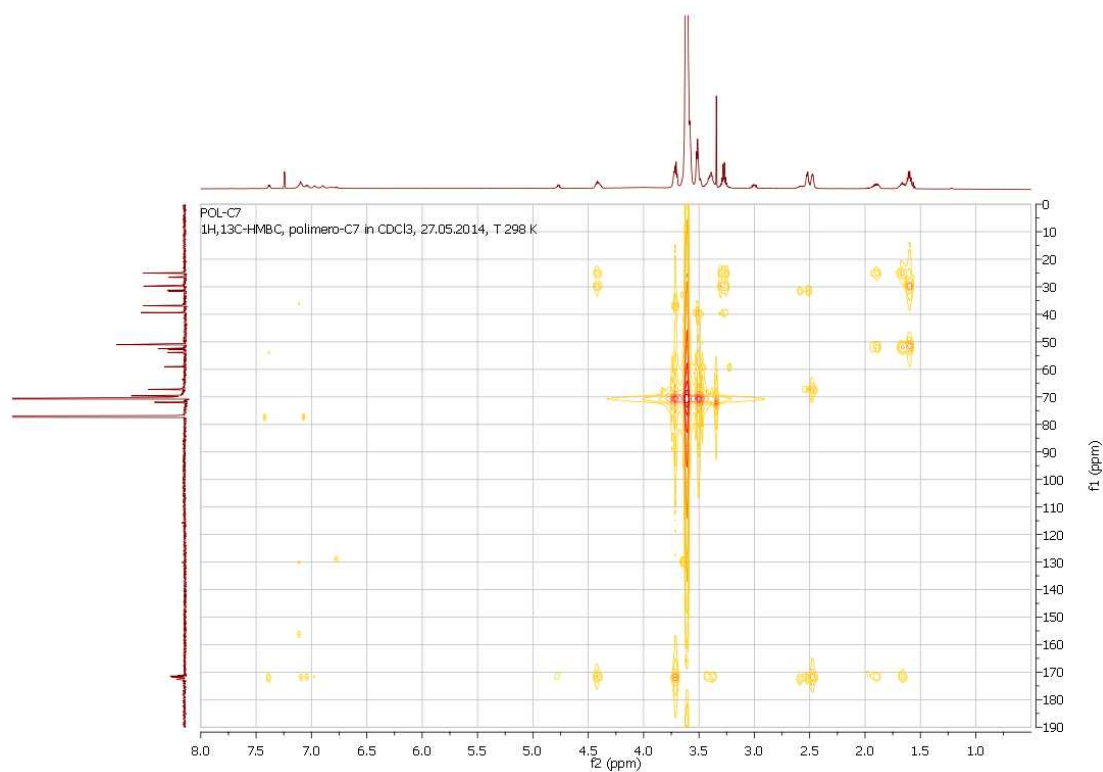


Figura C.6: Spettro $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMBC del polimero (7c).

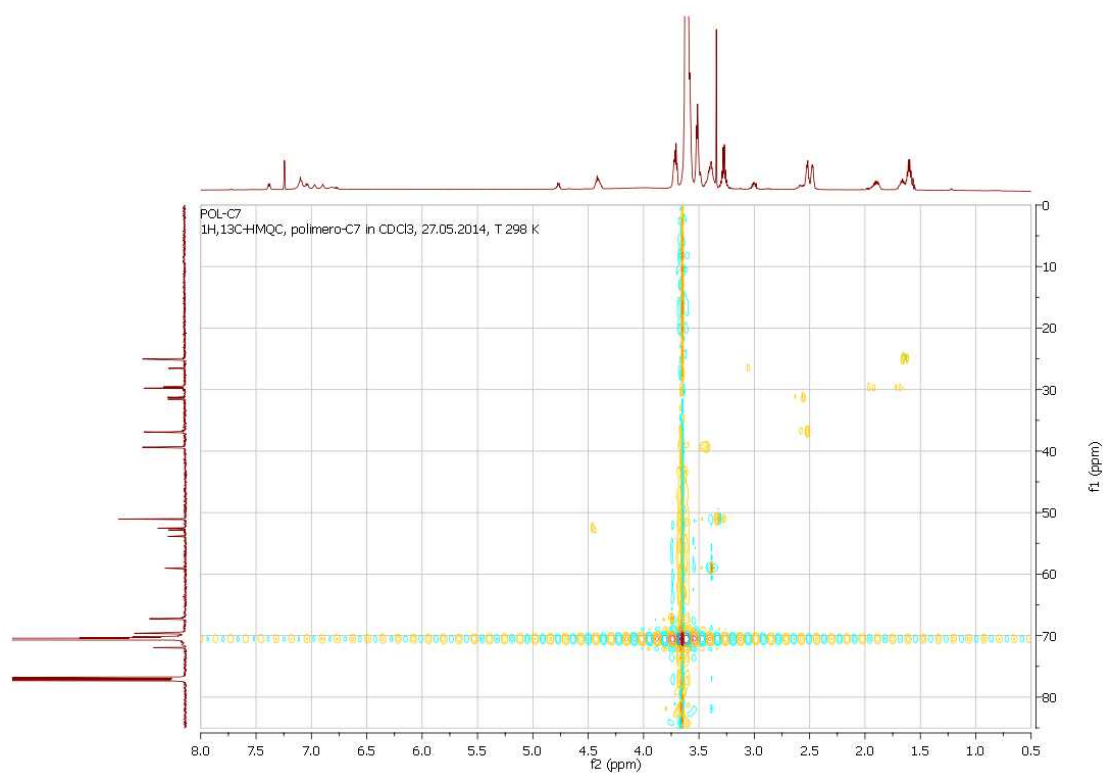


Figura C.7: Spettro $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMQC del polimero (7c).

2. Sono riportate di seguito le analisi HPLC, MALDI-TOF e ESI-MS dei prodotti 4c, 6c, 6c-Fmoc e 7c.

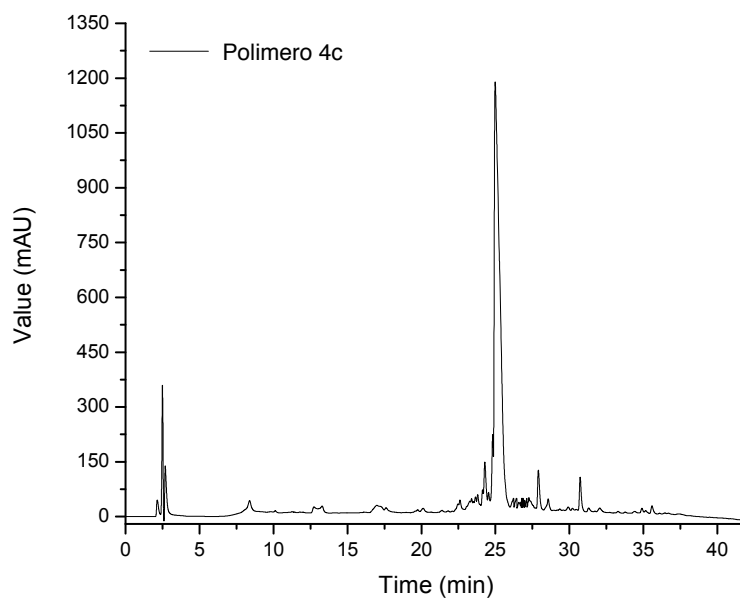


Figura C.8: Cromatogramma del polimero dopo 4 coupling (4c).

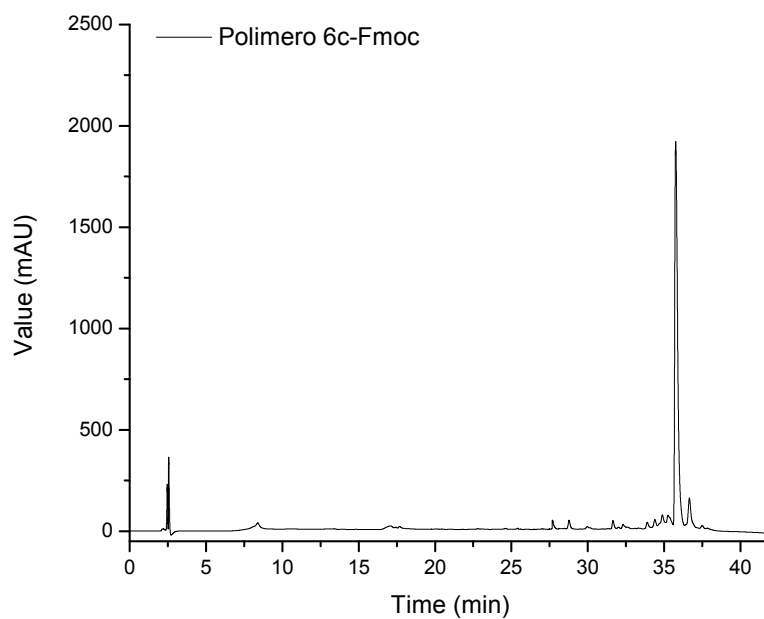


Figura C.9: Cromatogramma del polimero dopo 6 coupling con il gruppo Fmoc attaccato alla funzione amminica (6c-Fmoc).

Appendice C. Spettri e cromatogrammi

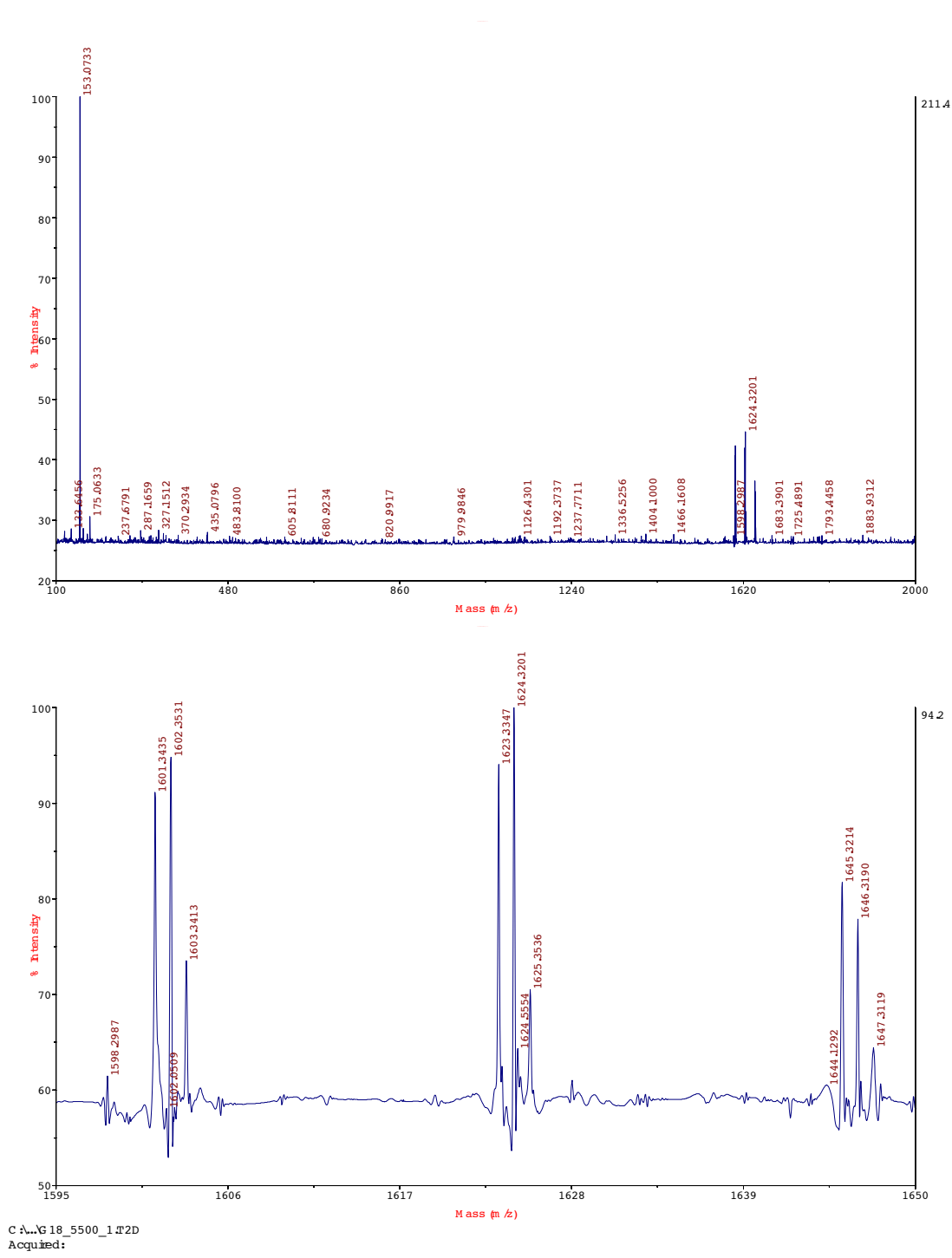


Figura C.10: Spettro MALDI-TOF del polimero dopo 4 coupling (4c) .

Appendice C. Spettri e cromatogrammi

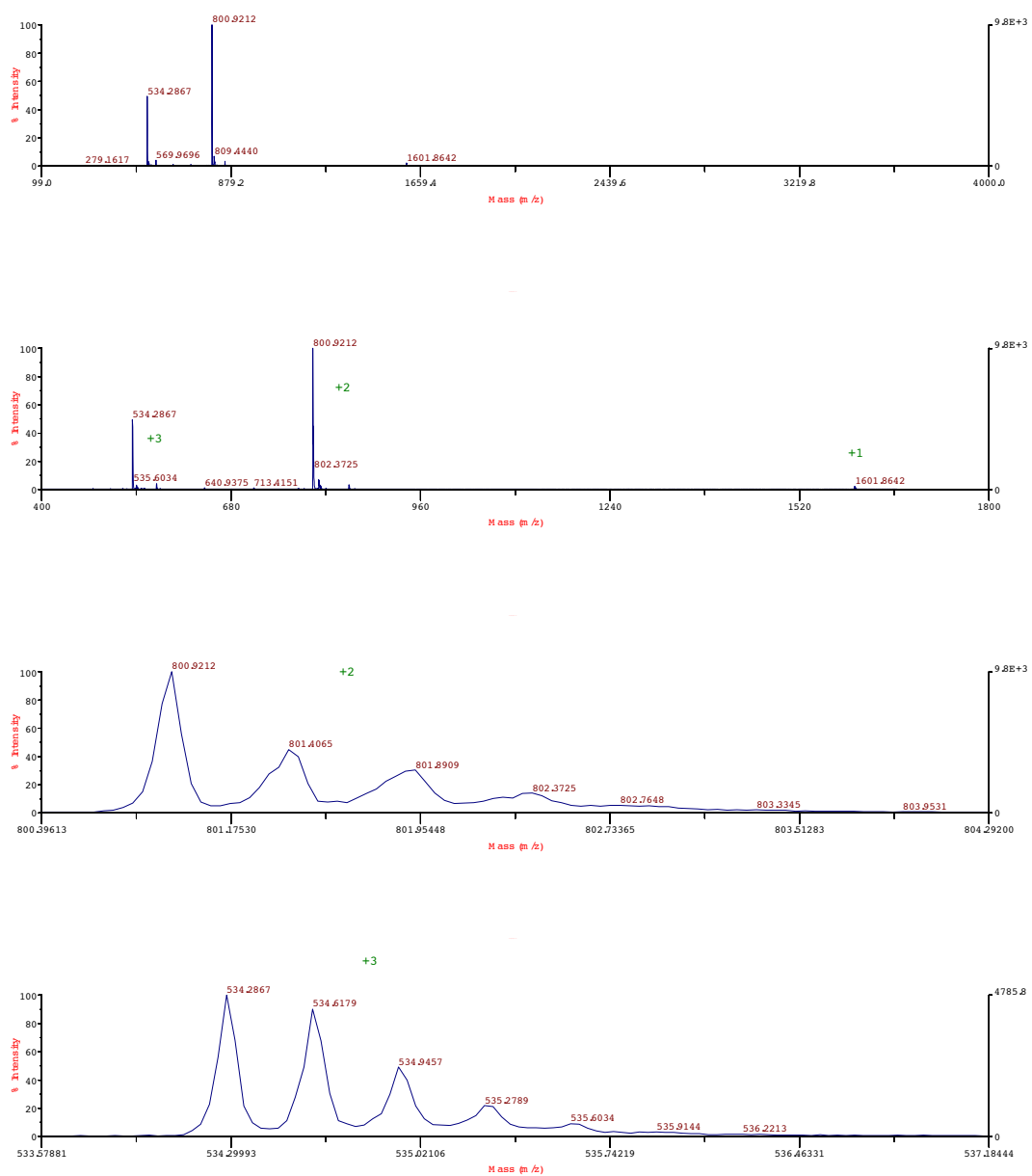


Figura C.11: Spettro ESI-MS del polimero dopo 4 coupling (4c).

Appendice C. Spettri e cromatogrammi

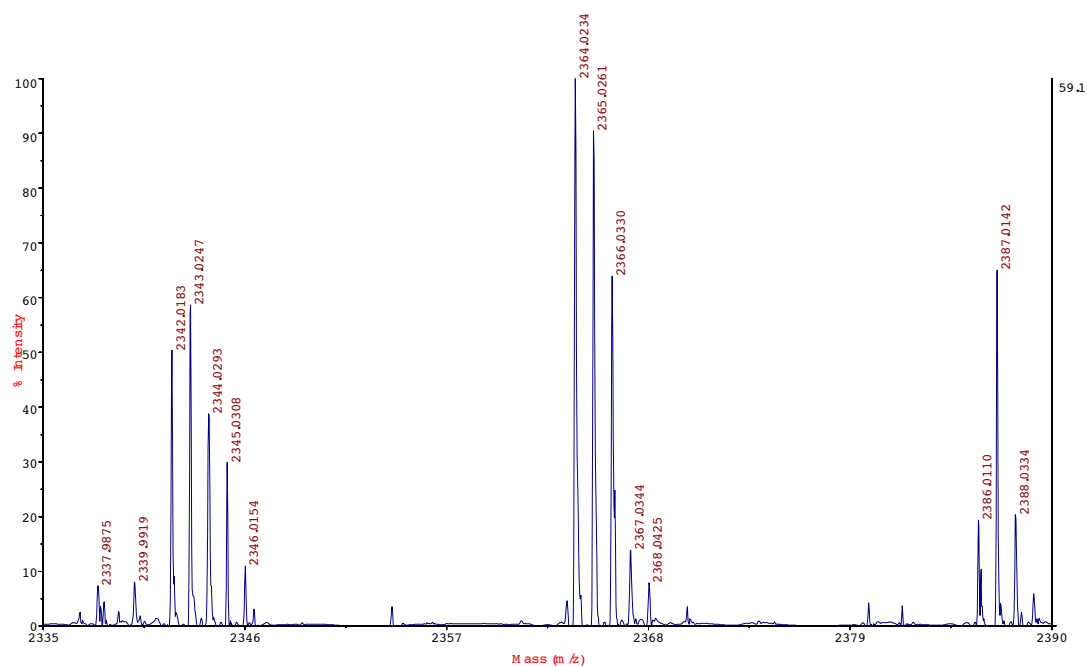
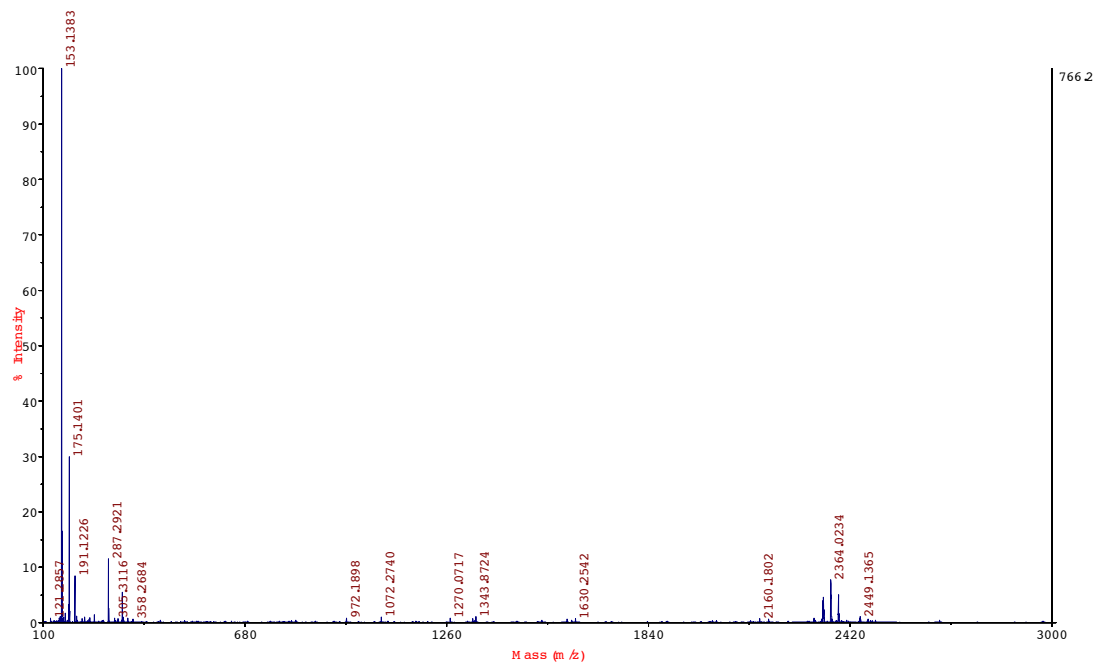
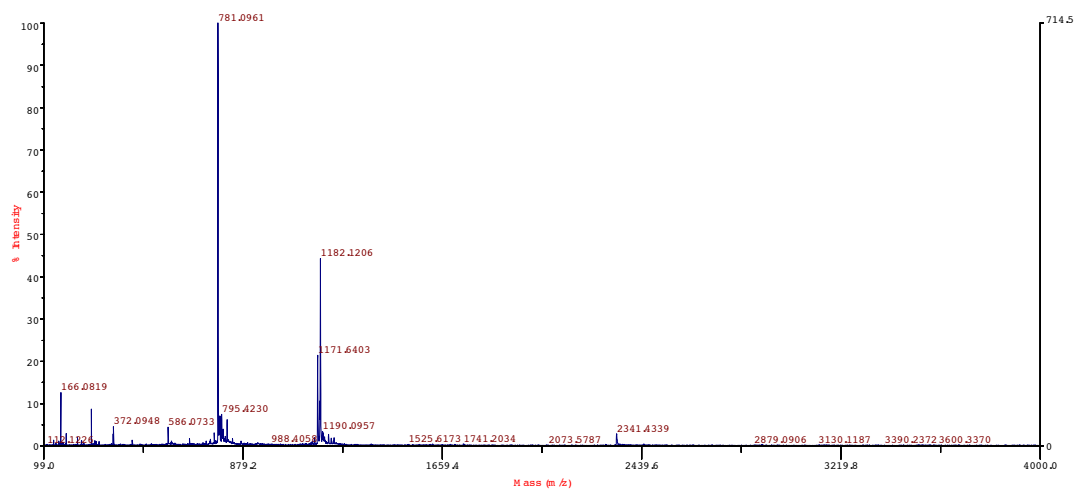


Figura C.12: Spettro MALDI-TOF del polimero dopo 6 coupling (6c).

Appendice C. Spettri e cromatogrammi



MarkerSpec /6:7 (T -0.44±0.53)-4:5 (T -0.44±0.53) ASC [BP = 781.1, 714]

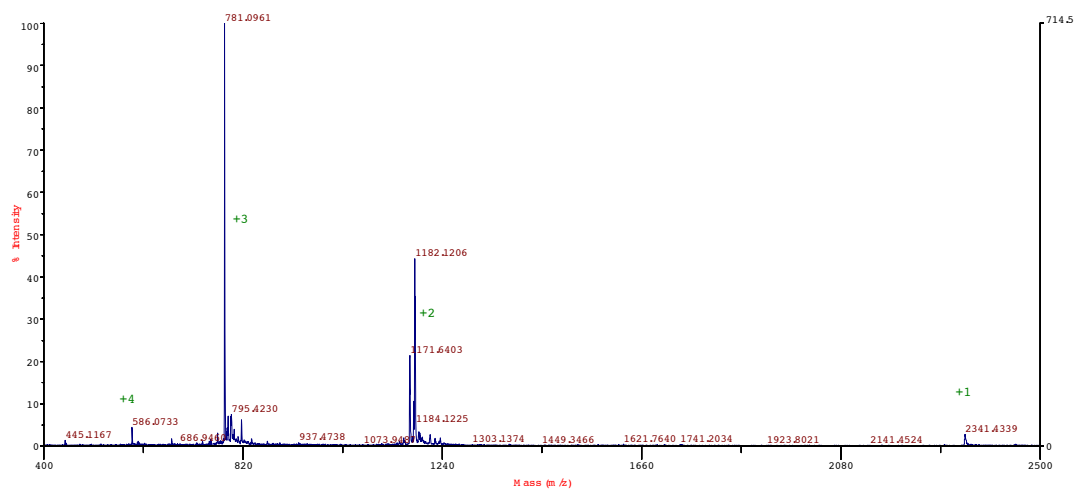
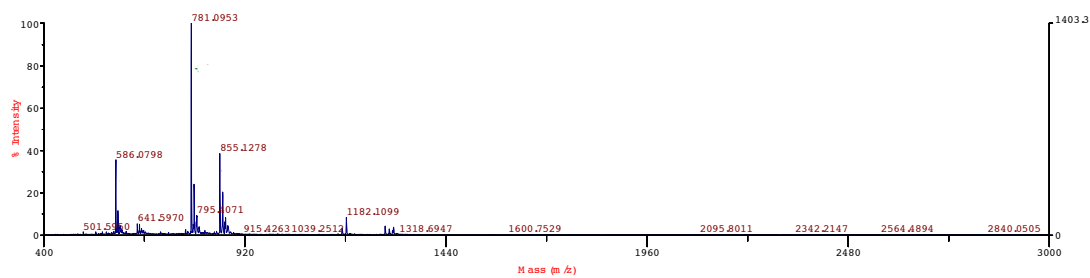
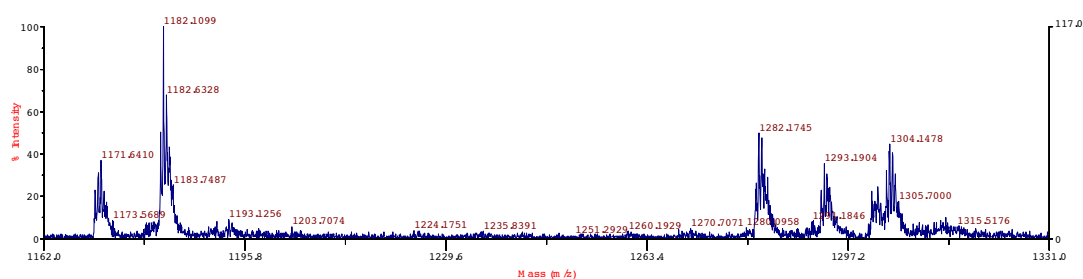


Figura C.13: Spettro ESI-MS del polimero dopo 6 coupling (6c).

Appendice C. Spettri e cromatogrammi



MarinerSpec 5:6 (T:0.35:0.44)-3:4 (T:0.35:0.44) ASC [BP = 781.1, 1403]



MarinerSpec 5:6 (T:0.35:0.44)-3:4 (T:0.35:0.44) ASC [BP = 781.1, 1403]

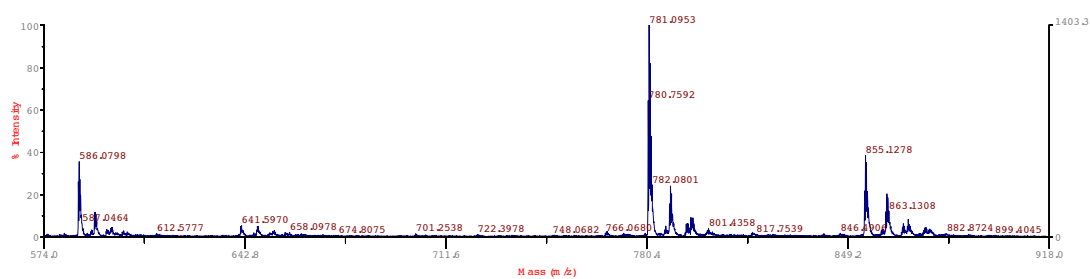


Figura C.14: Spettro ESI-MS del polimero dopo 6 coupling con il gruppo Fmoc attaccato alla funzione amminica (6c-Fmoc).

Appendice C. Spettri e cromatogrammi

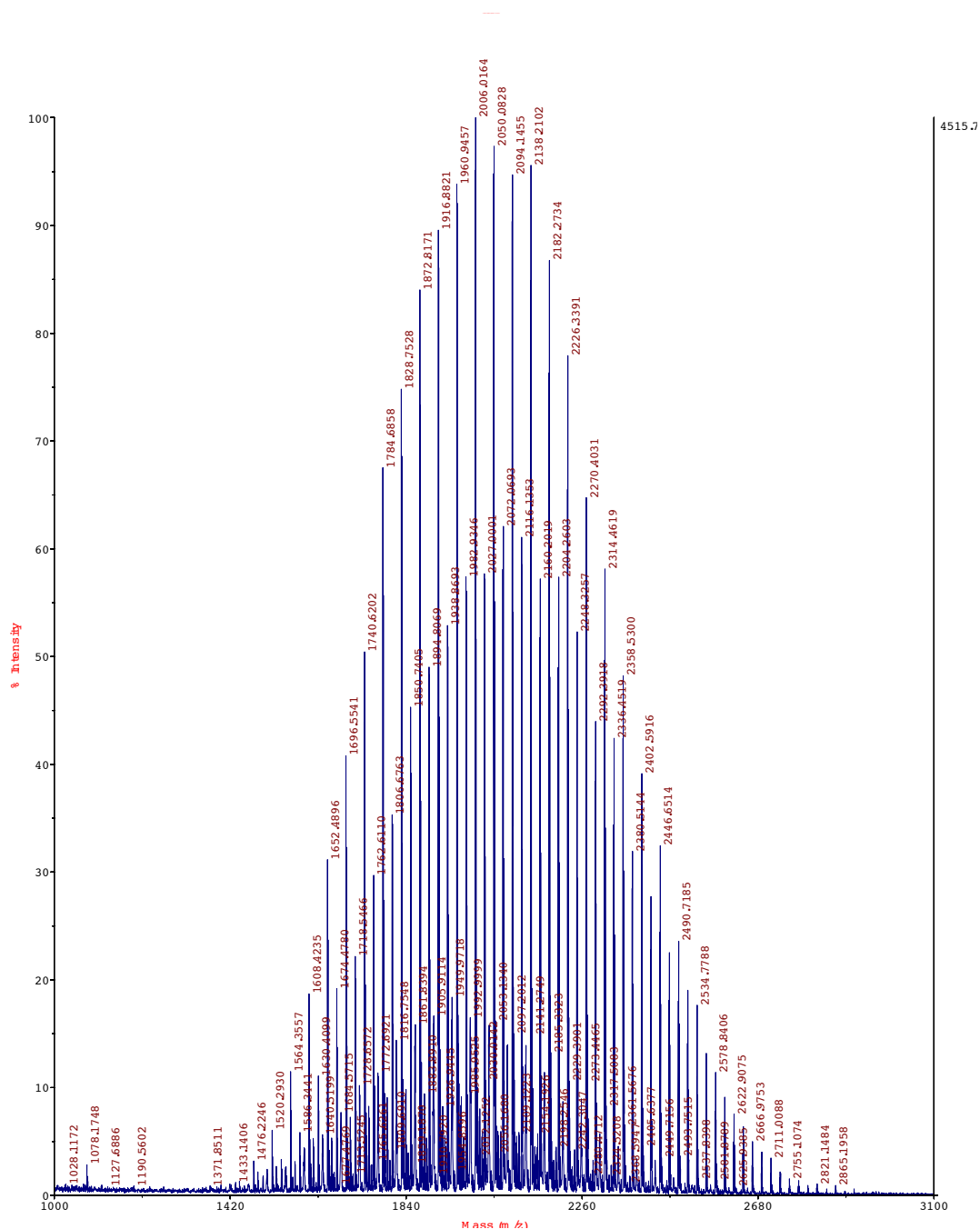


Figura C.15: Spettro MALDI-TOF del building block PEG_{2kDa}.

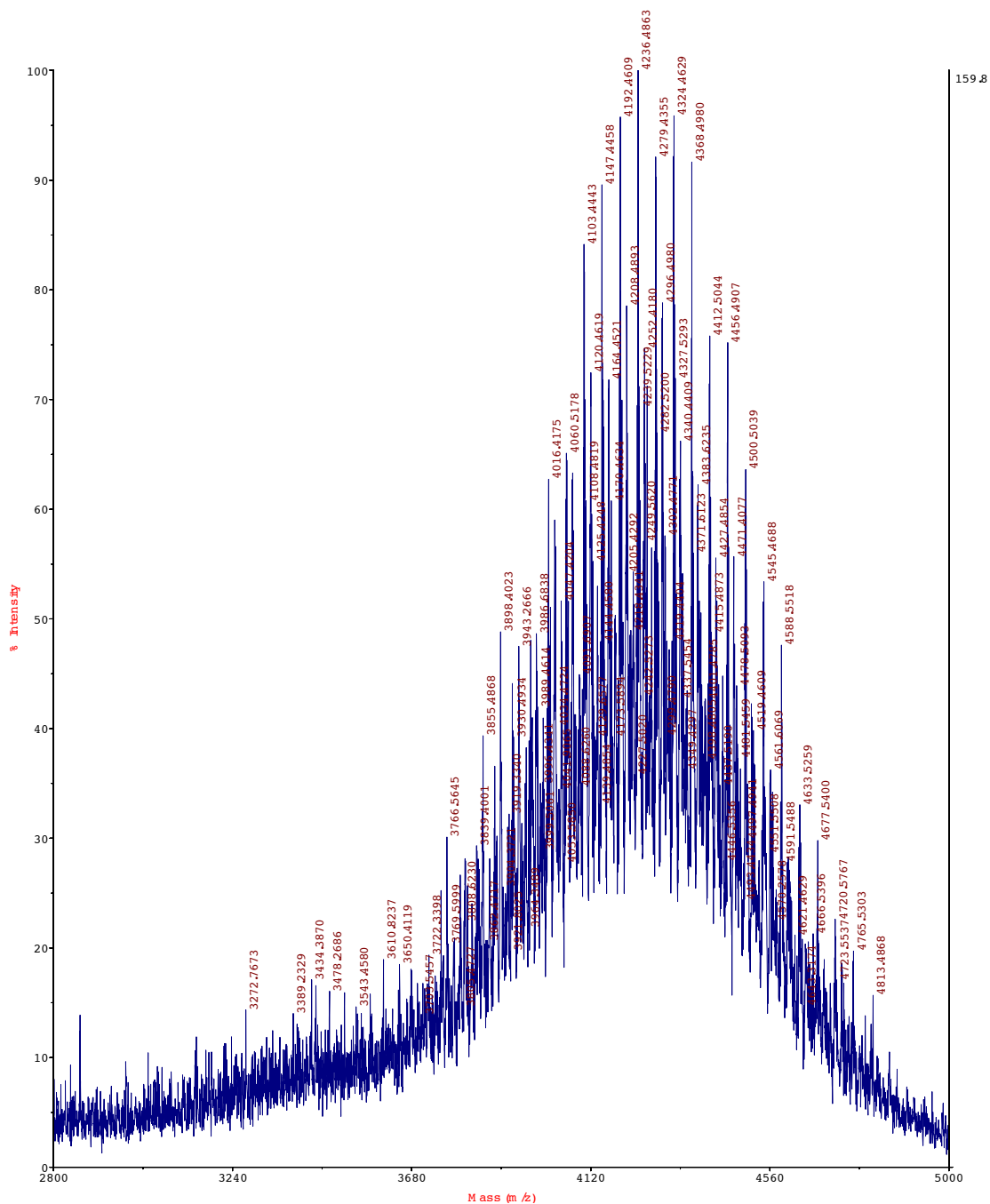


Figura C.16: Spettro MALDI-TOF del polimero dopo 7 coupling (7c).

Appendice C. Spettri e cromatogrammi

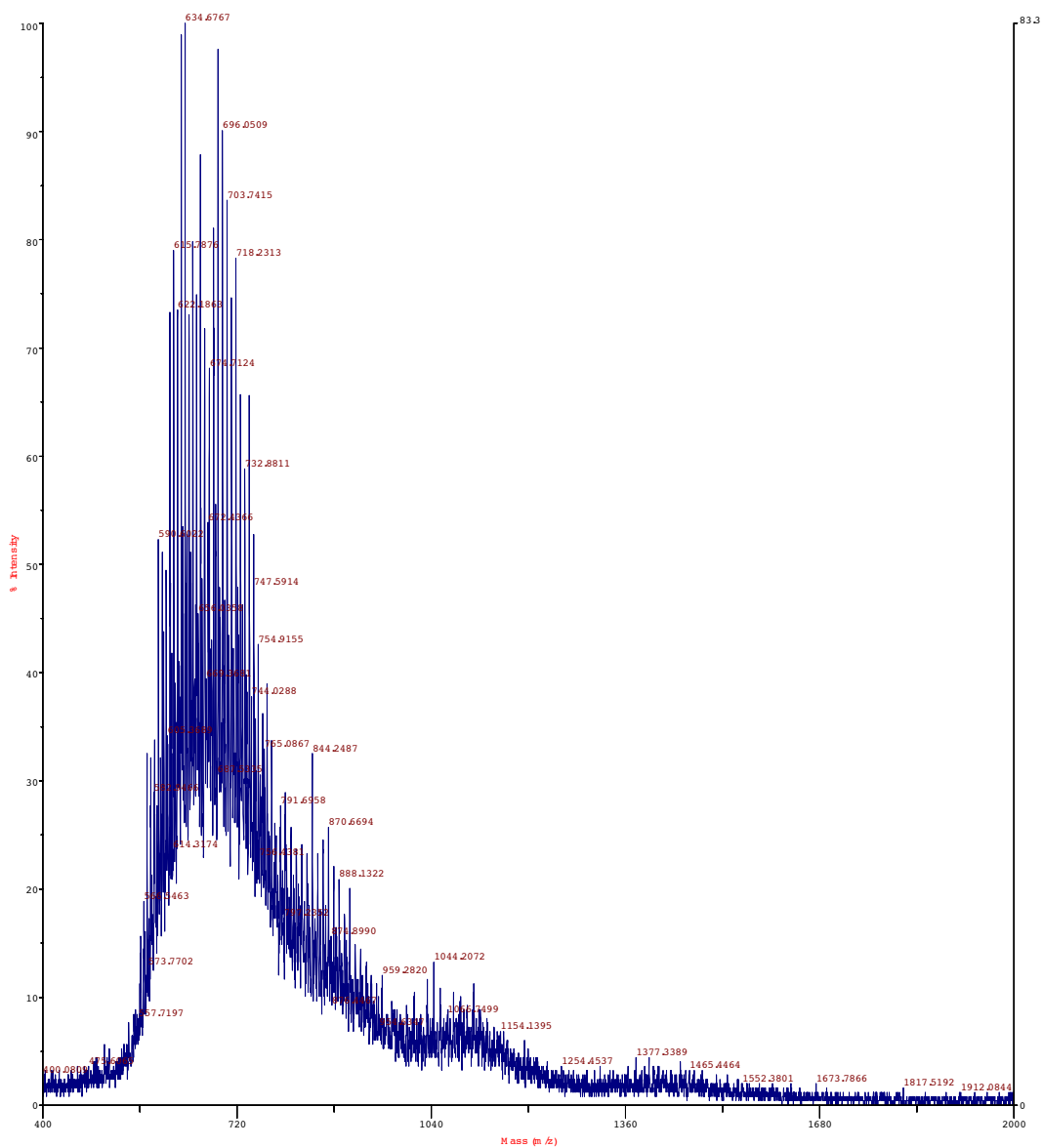


Figura C.17: Spettro ESI-MS del polimero dopo 7 coupling (7c).

Appendice C. Spettri e cromatogrammi

3. Sono riportate di seguito le analisi HPLC e ESI-MS della reazione tra DOTA-NH₂ e DBCO.

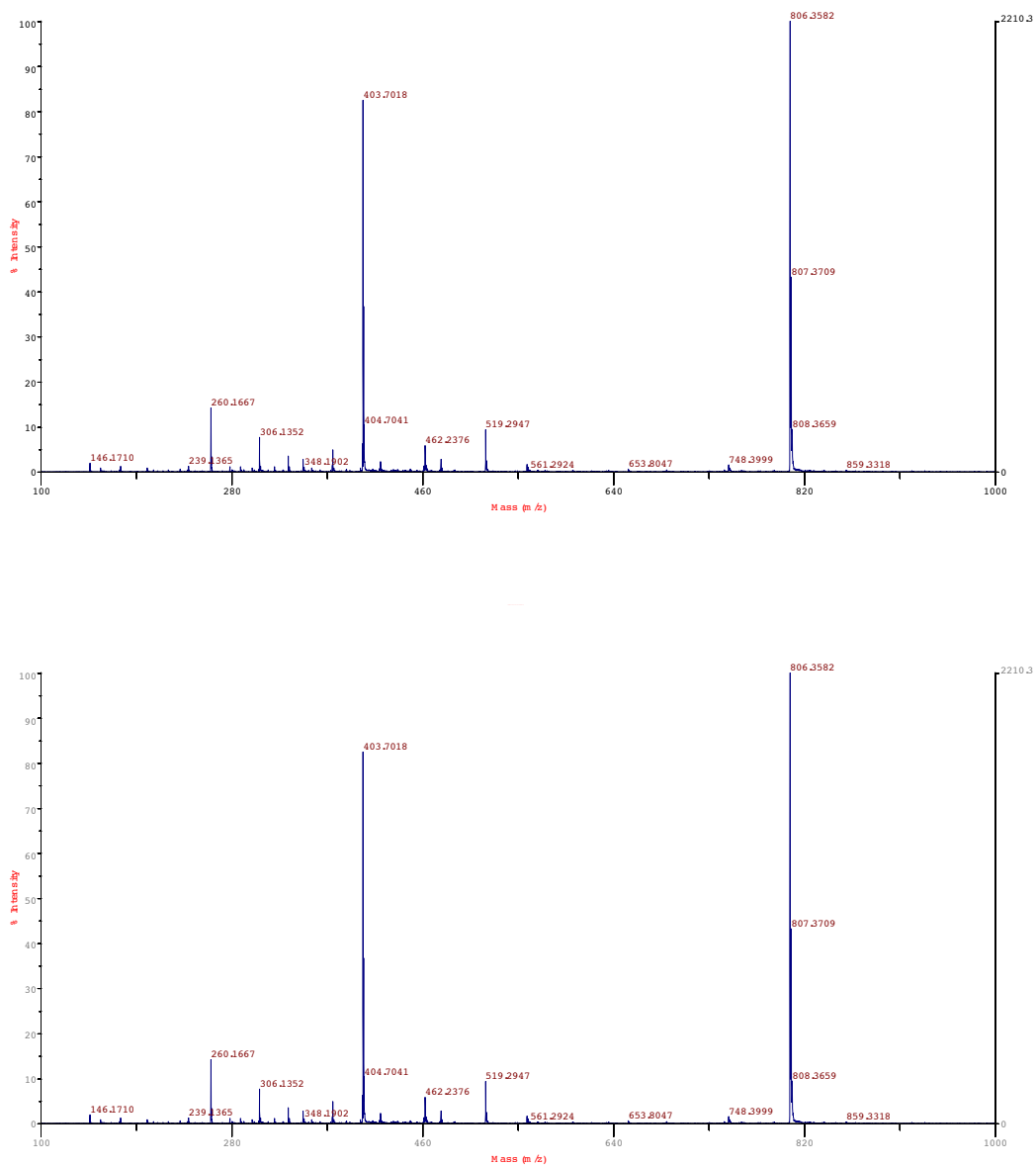
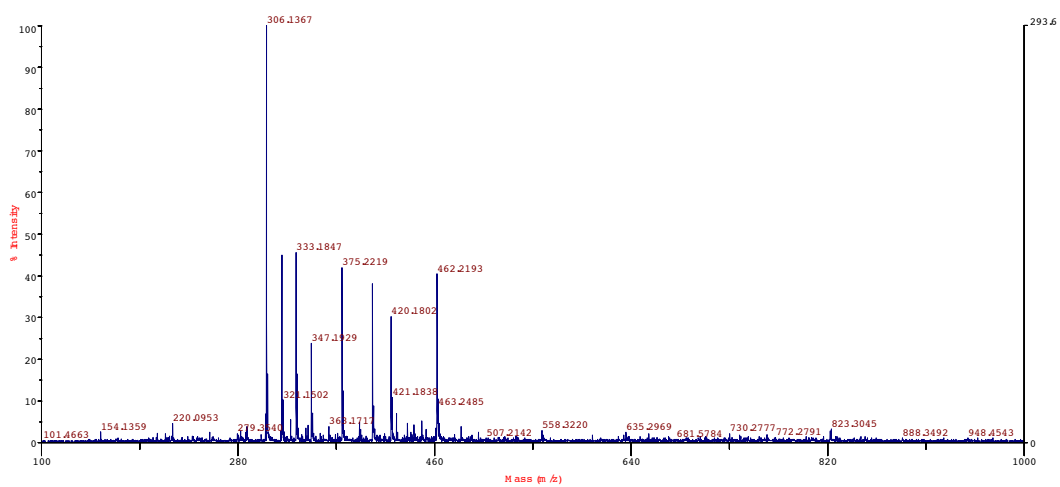


Figura C.18: ESI-MS della miscela di reazione tra DOTA-NH₂ e DBCO dopo 5 giorni di reazione.

Appendice C. Spettri e cromatogrammi



MarinerSpec /6/6 (T:0.44±0.44)-3/4 (T:-0.44±0.44) ASC [BP = 306.1,294]

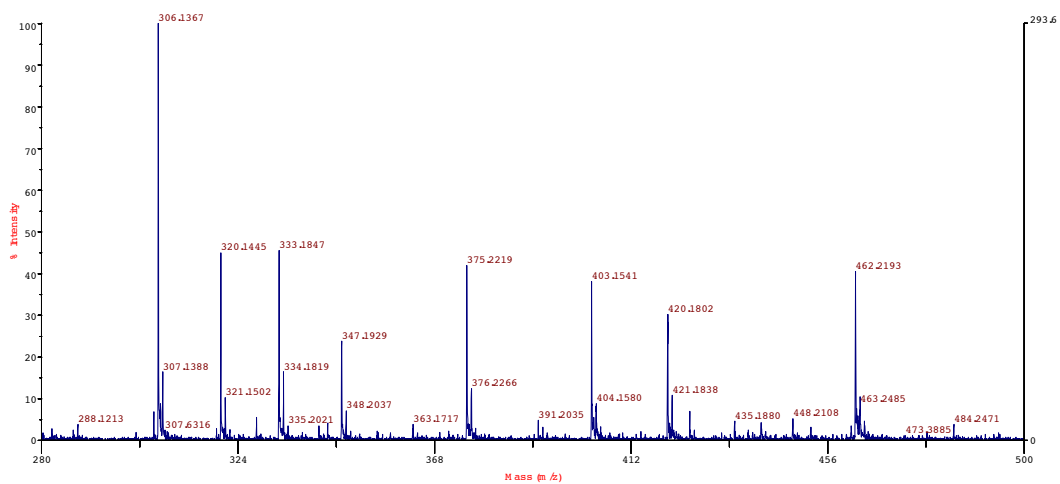
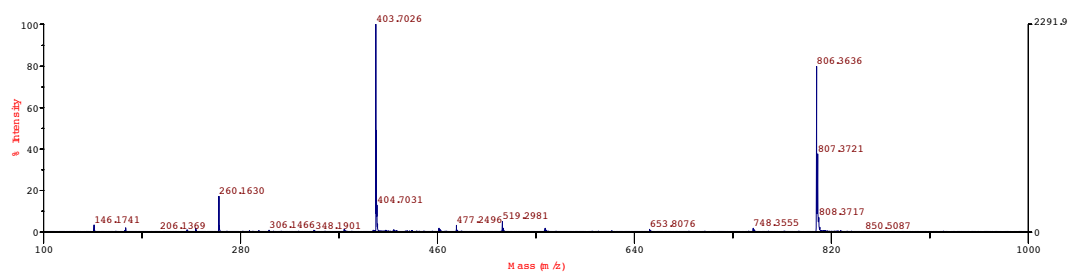
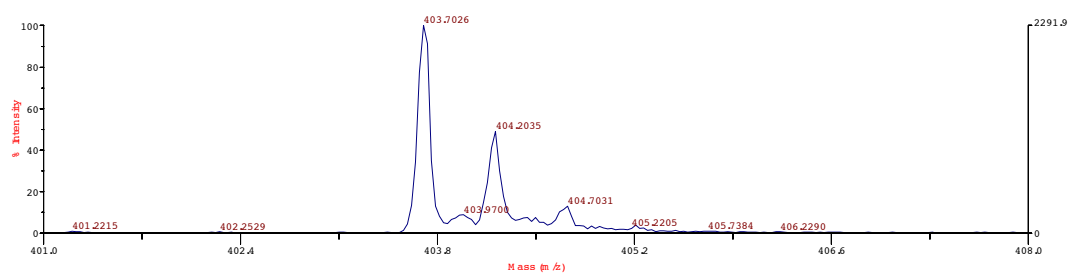


Figura C.19: ESI-MS dell'estrazione con acetato di etile della miscela di reazione tra DOTA-NH₂ e DBCO dopo 5 giorni di reazione.

Appendice C. Spettri e cromatogrammi



MarkerSpec /6:6 (T /0.44:0.44) -3:4 (T -0.44:0.44) ASC [BP = 403.7, 2292]



MarkerSpec /6:6 (T /0.44:0.44) -3:4 (T -0.44:0.44) ASC [BP = 403.7, 2292]

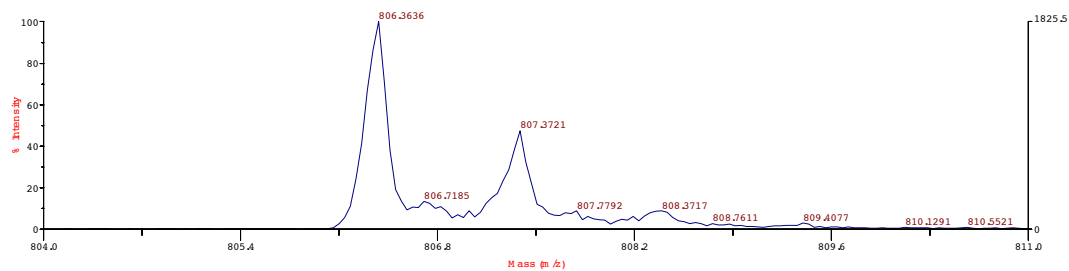


Figura C.20: ESI-MS dell'estrazione con acqua della miscela di reazione tra DOTA-NH₂ e DBCO dopo 5 giorni di reazione.

Appendice C. Spettri e cromatogrammi

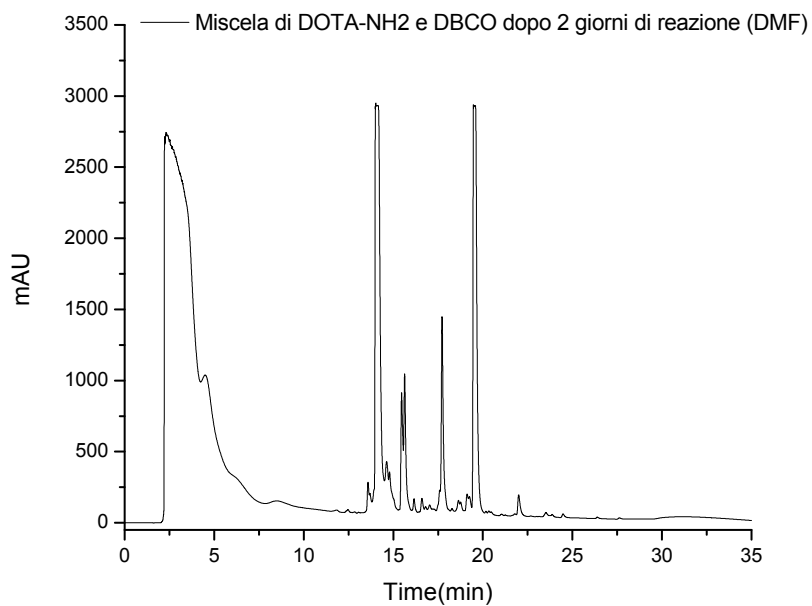


Figura C.21: HPLC della miscela di reazione tra DOTA-NH₂ e DBCO dopo 2 giorni di reazione (solvente dell'analisi DMF).

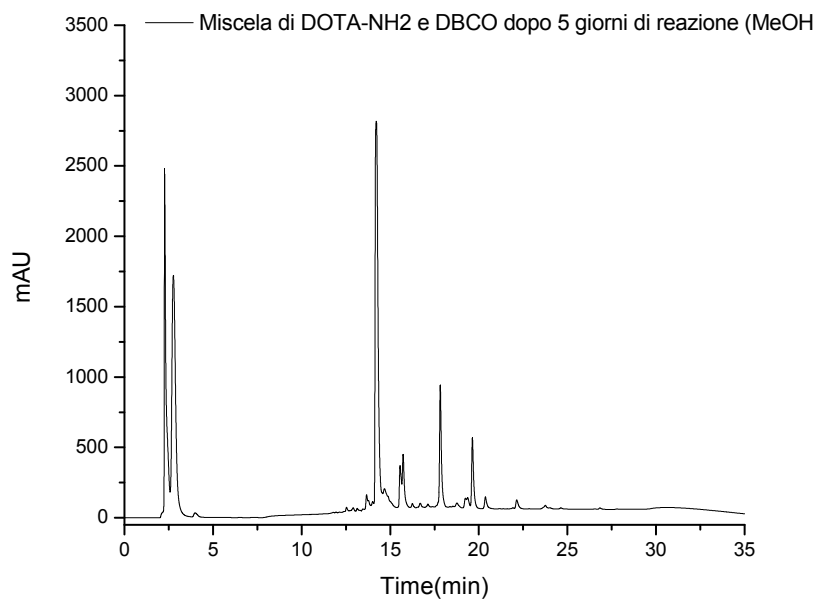


Figura C.22: HPLC della miscela di reazione tra DOTA-NH₂ e DBCO dopo 5 giorni di reazione (solvente dell'analisi MeOH).

Appendice C. Spettri e cromatogrammi

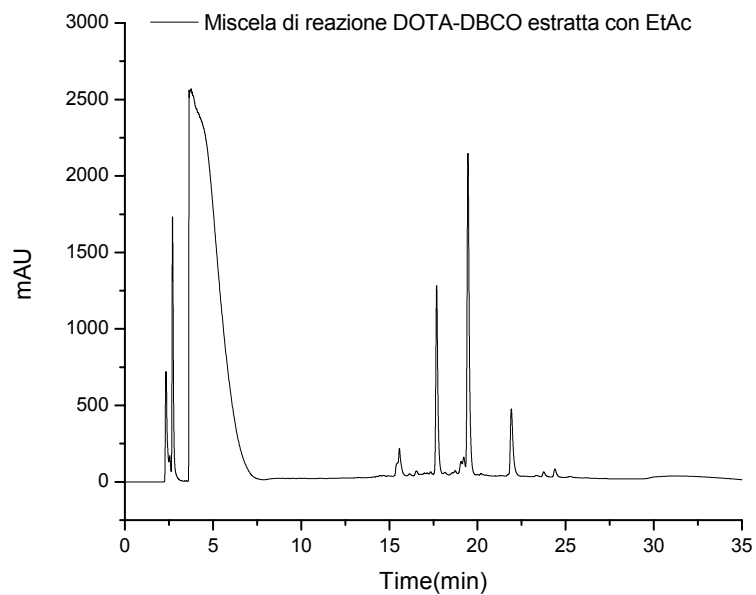


Figura C.23: HPLC della miscela di reazione tra DOTA-NH₂ e DBCO dopo 5 giorni di reazione estratta con acetato di etile (solvente dell'analisi EtAc).

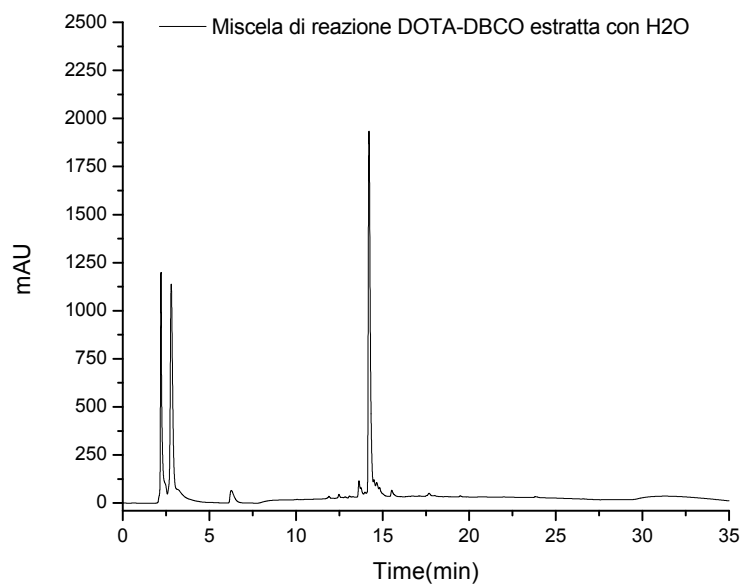


Figura C.24: HPLC della miscela di reazione tra DOTA-NH₂ e DBCO dopo 5 giorni di reazione estratta con H₂O (solvente dell'analisi H₂O).

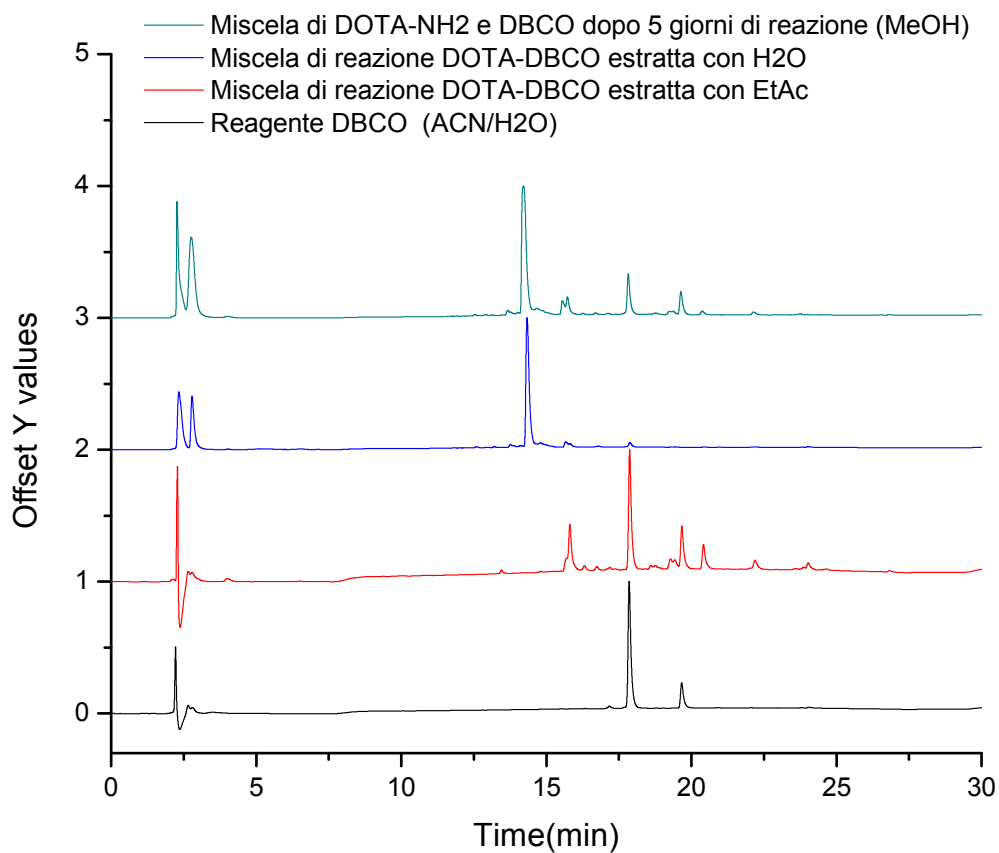


Figura C.25: Sovrapposizione delle analisi HPLC della miscela di reazione tra DOTA-NH₂ e DBCO dopo 5 giorni di reazione (solvente dell'analisi MeOH, cromatogramma verde), delle estrazioni con H₂O (solvente dell'analisi H₂O, cromatogramma blu) e EtAc (solvente dell'analisi EtAc, cromatogramma rosso) e del reagente DBCO (solvente dell'analisi ACN/H₂O 1:1, cromatogramma nero).

4. Sono riportati di seguito gli spettri UV-Vis inerenti alle retrotitolazioni complessometriche.

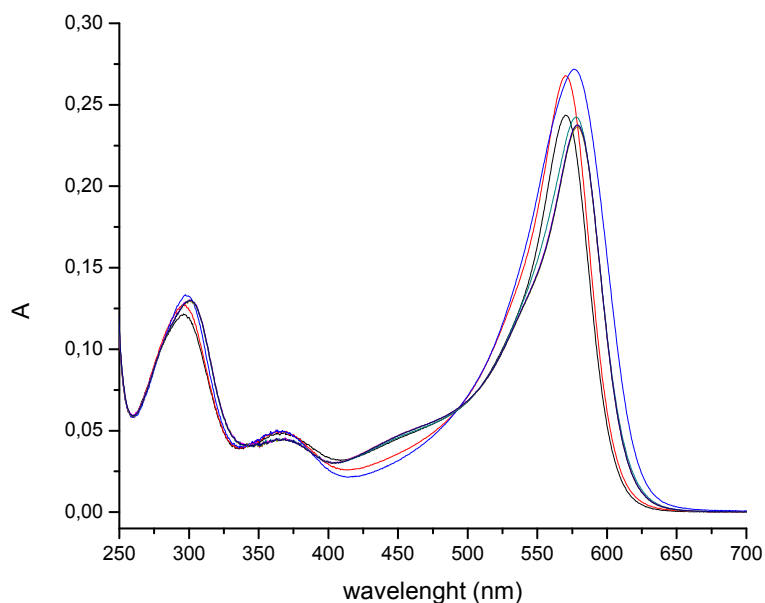


Figura C.26: Sovrapposizione degli spettri UV-Vis inerenti alla titolazione della soluzione 1 ($0.5 \mu\text{mol}$ di Gd^{3+}) con EDTA 30.04 mM in presenza dell'indicatore XO. L'assorbanza é stata corretta per tenere conto delle diluizioni.

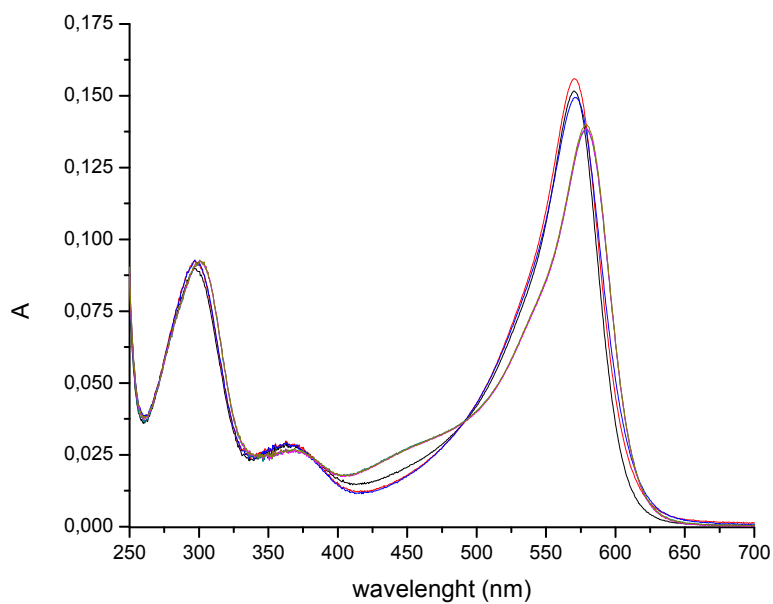


Figura C.27: Sovrapposizione degli spettri UV-Vis inerenti alla titolazione della soluzione 2 ($1.0 \mu\text{mol}$ di Gd^{3+}) con EDTA 30.04 mM in presenza dell'indicatore XO. L'assorbanza é stata corretta per tenere conto delle diluizioni.

Appendice C. *Spettri e cromatogrammi*

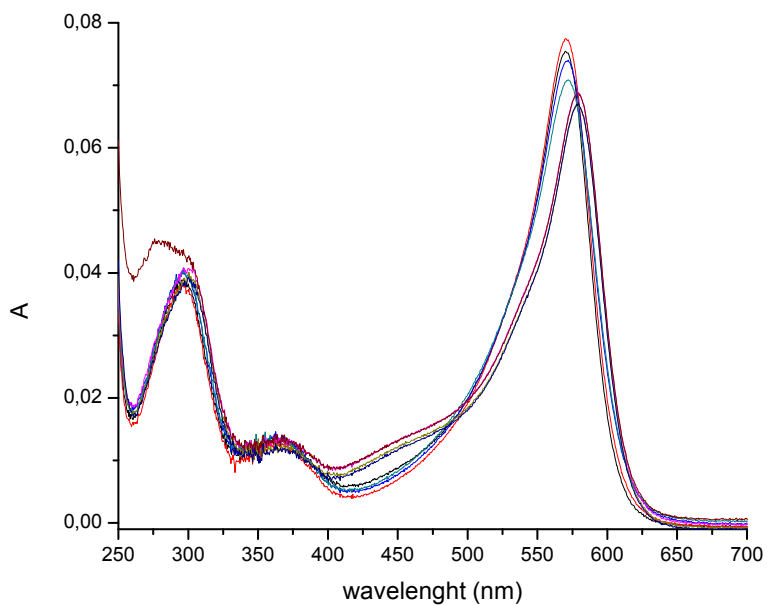


Figura C.28: Sovrapposizione degli spettri UV-Vis inerenti alla titolazione della soluzione 3 ($2.0 \mu\text{mol}$ di Gd^{3+}) con EDTA 30.04 mM in presenza dell'indicatore XO. L'assorbanza é stata corretta per tenere conto delle diluizioni.

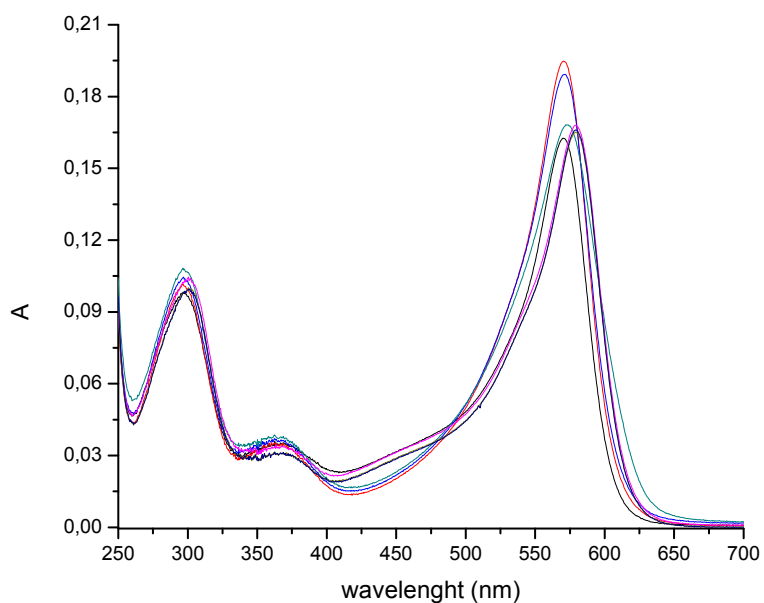


Figura C.29: Sovrapposizione degli spettri UV-Vis inerenti alla titolazione della soluzione 4 ($3.0 \mu\text{mol}$ di Gd^{3+}) con EDTA 30.04 mM in presenza dell'indicatore XO. L'assorbanza é stata corretta per tenere conto delle diluizioni.

Appendice C. Spettri e cromatogrammi

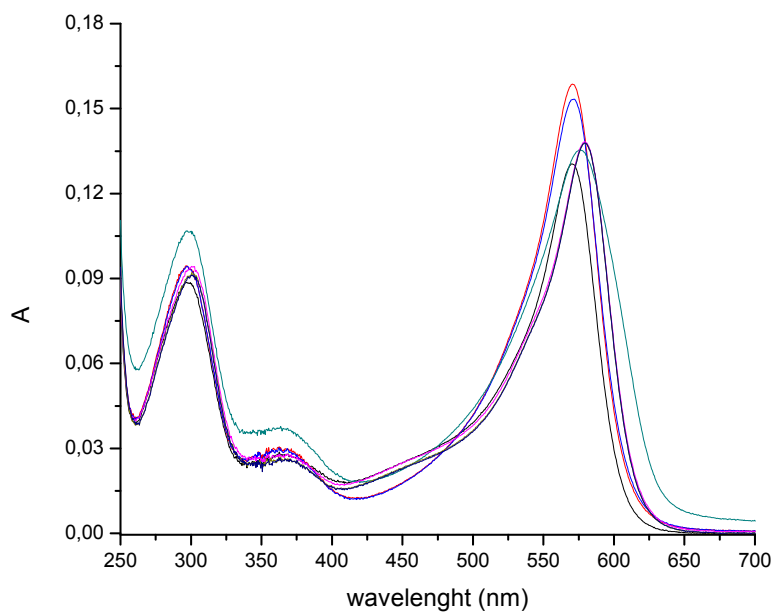


Figura C.30: Sovrapposizione degli spettri UV-Vis inerenti alla titolazione della soluzione 5 ($4.0 \mu\text{mol}$ di Gd^{3+}) con EDTA 30.04 mM in presenza dell'indicatore XO. L'assorbanza é stata corretta per tenere conto delle diluizioni.

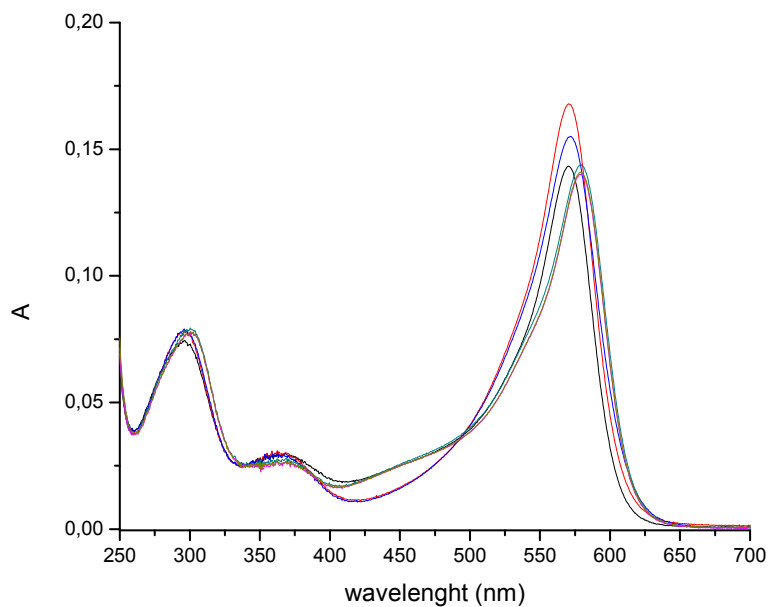


Figura C.31: Sovrapposizione degli spettri UV-Vis inerenti alla titolazione della soluzione 6 ($5.0 \mu\text{mol}$ di Gd^{3+}) con EDTA 30.04 mM in presenza dell'indicatore XO. L'assorbanza é stata corretta per tenere conto delle diluizioni.

Appendice C. *Spettri e cromatogrammi*

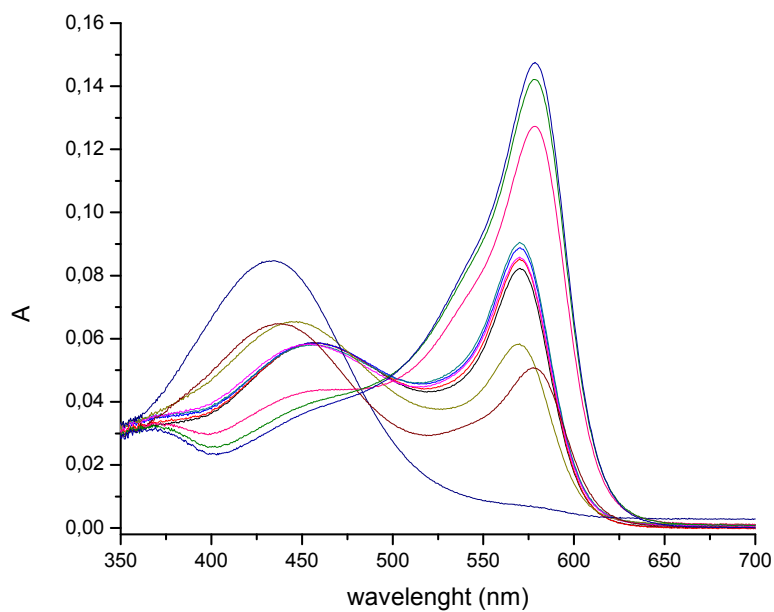


Figura C.32: Sovrapposizione degli spettri UV-Vis inerenti alla titolazione della soluzione A con EDTA 30.04 mM in presenza dell'indicatore XO. L'assorbanza é stata corretta per tenere conto delle diluizioni.

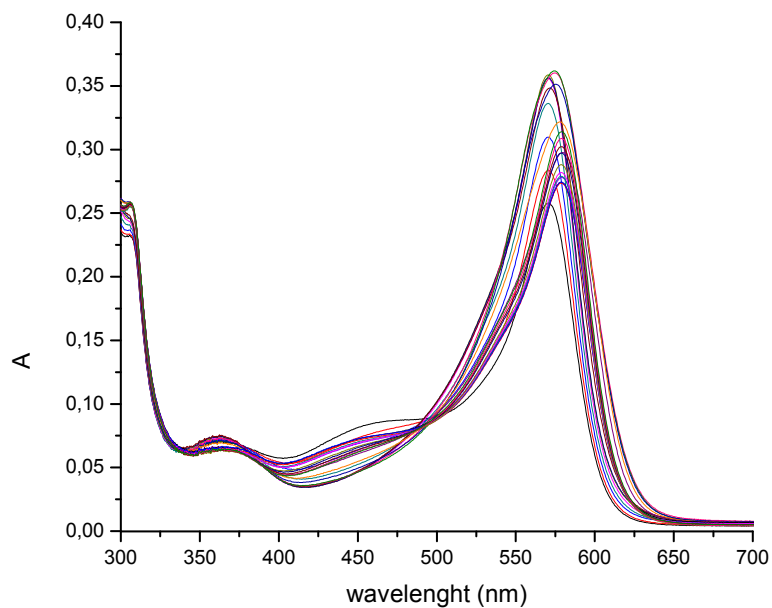


Figura C.33: La soluzione della reazione di complessazione del DOTA-DBCO con Gd^{3+} é stata titolata con EDTA 10.01 mM in presenza dell'indicatore XO. Sono qui riportati gli spettri UV-Vis sovrapposti. L'assorbanza é stata corretta per tenere conto delle diluizioni.

Appendice C. Spettri e cromatogrammi

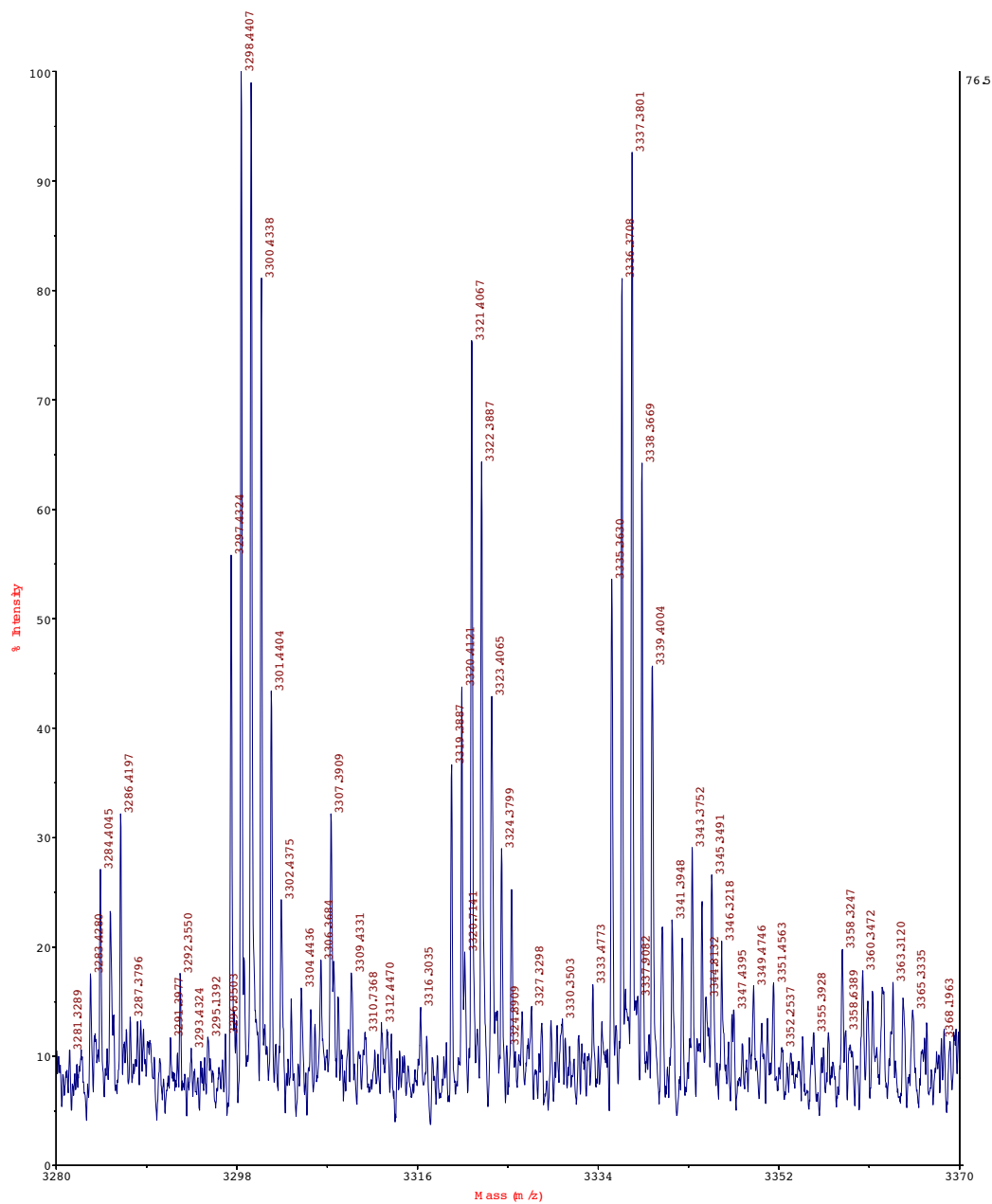


Figura C.34: Spettro MALDI-TOF del prodotto della reazione di click chemistry tra polimero 6c e DBCO-OCH₃. La massa calcolata e verificata con l'analisi MALDI-TOF è di 3298.1 Da. Sono qui mostrati i picchi molecolari 3298.44 m/z [M(H)]⁺, 3321.40 m/z [M(Na)]⁺ e 3337.38 m/z [M(K)]⁺.

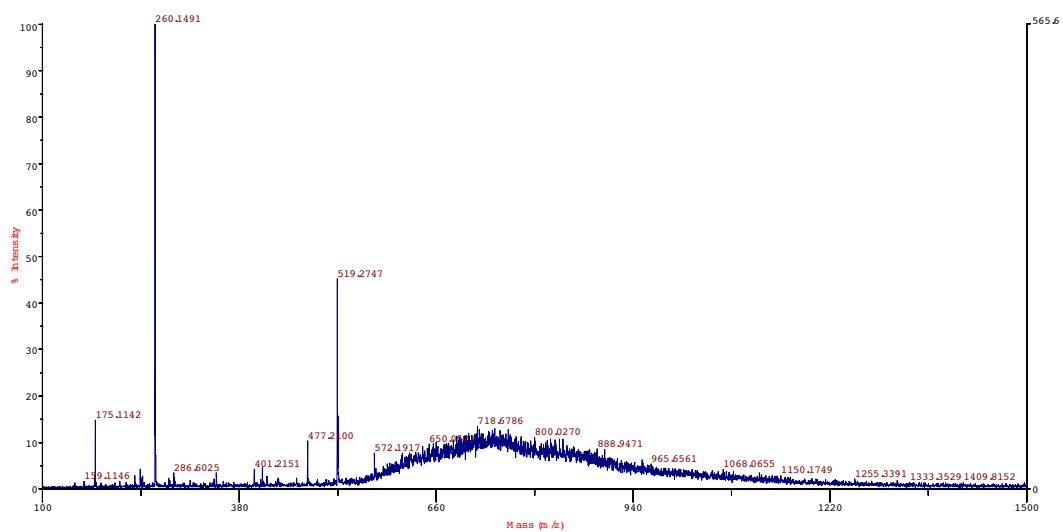
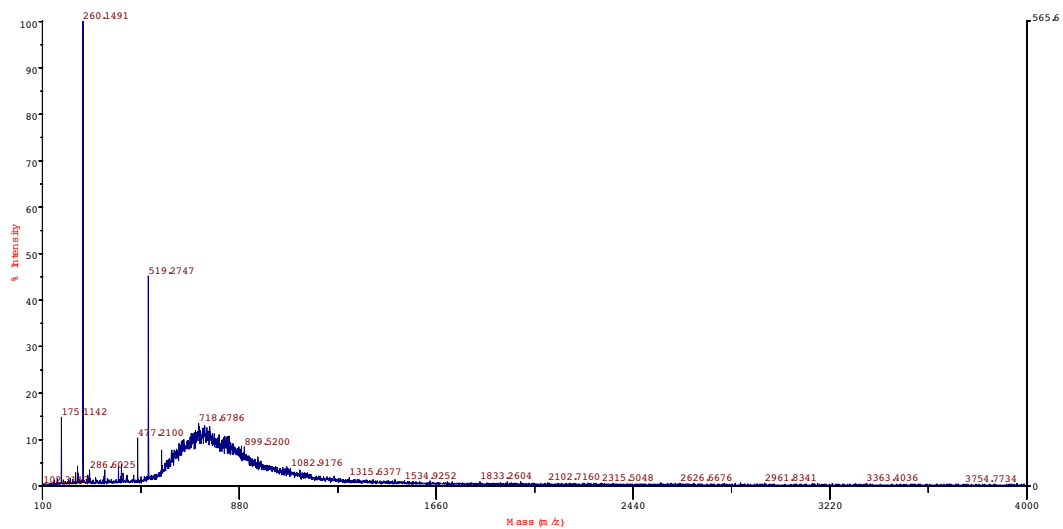


Figura C.35: Spettro ESI-MS della reazione di click chemistry tra la miscela DOTA-DBCO e DOTA-NH₂ e il polimero 7c. Sono assegnati i picchi 519.27 m/z [DOTA-NH₂(H)]⁺ e 260.15 m/z [DOTA-NH₂(H₂)²⁺]. La distribuzione di massa centrata a 718.68 m/z è assegnata al prodotto 7c-DOTA-DBCO.

Bibliografia

- [1] Anthony B. Wolbarst and Andrew R. Wyant Patrizio Capasso. *Medical Imaging, Essential for Physicians*, Wiley-Blackwell (2013).
- [2] Leonard Fass. *Imaging and cancer: A review*. *Molecular Oncology*, 2(2):115–152, (2008).
- [3] Angela Byrne and Helen Nadel. *Wholebody low dose 18F-FDG PET/CT in pediatric oncology*. *Journal of Nuclear Medicine*, 48(12):1920 – 1922, (2007).
- [4] Muhammad Farooq Warsi and Victor Chechik. *Strategies for increasing relaxivity of gold nanoparticle based MRI contrast agents*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13(20):9812–9817, (2011).
- [5] Megan A. Hahn, Amit K. Singh, Parvesh Sharma, Scott C. Brown, and Brij M. Moudgil. *Nanoparticles as contrast agents for in-vivo bioimaging: current status and future perspectives*. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 399(1):3–27, (2011).
- [6] Armen R Kherlopian, Ting Song, Qi Duan, Mathew A Neimark, Ming J Po, John K Gohagan, and Andrew F Laine. *A review of imaging techniques for systems biology*. *BMC Systems Biology*, 2(1):201–210, (2008).
- [7] Amelie M. Lutz, C. Seemayer, C. Corot Renate, E. Gay, and K. Goepfert. *Detection of Synovial Macrophages in an Experimental Rabbit Model of Antigen-induced Arthritis: Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide enhanced MR Imaging*. *Radiology*, 233(1):149–157, (2004).
- [8] Anwar R. Padhani. *Dynamic contrast-enhanced MRI in clinical oncology: Current status and future directions*. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 16(4):407–422, (2002).
- [9] Andrea Rockall, Andrew Hatrick, Peter Armstrong, and Martin Wastie. *Diagnostic Imaging*, Wiley-Blackwell (2013).

Bibliography

- [10] Kannie Wai-Yan Chan and Wing-Tak Wong. *Small molecular gadolinium(III) complexes as MRI contrast agents for diagnostic imaging*. Coordination Chemistry Reviews, 251(17-20):2428–2451, (2007).
- [11] Peter Caravan, Jeffrey J. Ellison, Thomas J. McMurry, and Randall B. Lauffer. *Gadolinium (III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics and Applications*. Chemical Review, 99(9):2293–2352, (1999).
- [12] Karen C. Briley-Saebo, Simonetta Geninatti, David P. Cormode, Alessandra Barazza, Willem J. M. Mulder, Wei Chen, Giovanni B. Giovenzana, Edward A. Fisher, Silvio Aime, , and Zahi A. Fayad1. *High relaxivity gadolinium modified high density lipoproteins as MRI contrast agents*. Journal of Physical Chemistry B, 113(18):6283–6289, (2009).
- [13] Scoot D Swanson, Anil K Patri, Chunyan Chen, Song Ge, Zhengyi Cao, and Alina Kotlyar. *Targeted gadolinium-loaded dendrimer nanoparticles for tumor-specific magnetic resonance contrast enhancement*. International Journal of Nanomedicine, 3(2):201–210, (2008).
- [14] Jongdoo Lim, Baris Turkbey, Marcelino Bernardo, L. Henry Bryant, Giovanni M. Pavan, Takahito Nakajima, Peter L. Choyke, Eric E. Simanek, and Hisataka Kobayashi. *Gadolinium MRI Contrast Agents Based on Triazine Dendrimers: Relaxivity and In Vivo Pharmacokinetics*. Bioconjugate Chemistry, 23(11):2291–2299, (2012).
- [15] Shunyi Li, Jie Jiang, Jin Zou, Jingjuan Qiao, Shenghui Xue, Lixia Wei, Robert Long, Liya Wang, Adriana Castiblanco, Natalie White, Jen Ngo, Hui Mao, Zhi-Ren Liu, and Jenny J. Yang. *PEGylation of protein-based MRI contrast agents improves relaxivities and biocompatibilities*. Journal of Inorganic Biochemistry, 107(1):111–118, (2012).
- [16] Zhuxian Zhou, Xueming Wu, Adam Kresak, Mark Griswold, and Zheng-Rong Lu. *Peptide targeted tripod macrocyclic Gd(III) chelates for cancer molecular MRI*. Biomaterials, 34(31):7683–7693, (2013).
- [17] Zhuxian Zhou and Zheng-Rong Lu. *Gadolinium-Based Contrast Agents for MR Cancer Imaging*. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 5(1):1–18, (2013).
- [18] Ralph Weissleder, Alexei Bogdanov, Edward A. Neuweltb, and Mikhail Papisov. *Long-circulating iron oxide for MR imaging*. Advanced Drug Delivery Review, 16(2):321–334, (1995).

Bibliography

- [19] Yi-Xiang and J. Wang. *Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application*. Quantitative Imaging in Medicine and Surgery, 1(1):35–40, (2011).
- [20] Erik M. Shapiro, Stanko Skrtic, and Alan P. Koretsky. *Sizing it up: Cellular MRI using micron-sized iron oxide particles*. Magnetic Resonance in Medicine, 53(2-3):329–338, (2005).
- [21] Atle BjAzrnerud and Lars Johansson. *The utility of superparamagnetic contrast agents in MRI: theoretical consideration and applications in the cardiovascular system*. NMR in Biomedicine, 17(7):465–477, (2004).
- [22] Simone Be Nazeth, Juris Purans, Marie Cecile Chalbot, Kim Nguyenvan Duong, Louisette Nicolas, Francoise Keller, and Alain Gaudemer. *Temperature and pH Dependence XAFS Study of Gd(DOTA)⁻ and Gd(DTPA)²⁻ Complexes: Solid State and Solution Structures*. Inorganic Chemistry, 37(15):3667–3674, (1998).
- [23] Xiangyun Wang, Tianzhu Jin, Vinciane Comblin, Antonio Lopez-Mut, Emile Merciny, and Jean F. Desreux. *A kinetic investigation of the lanthanide DOTA chelates. Stability and rates of formation and of dissociation of a macrocyclic gadolinium(III) polyaza polycarboxylic MRI contrast agent*. Inorganic Chemistry, 31(6):1095–1099, (1992).
- [24] Michael Brinkley. *A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens and crosslinking reagents*. Bioconjugate Chem., 3(1):2–13, (1992).
- [25] Paul F. Sieving, Alan D. Watson, and Scott M. Rocklage. *Preparation and characterization of paramagnetic polychelates and their protein conjugates*. Bioconjugate Chemistry, 1(1):65–71, (1990).
- [26] M Spanoghe, D Lanens, R Dommissie, A Vanderlinden, and F Alderweireldt. *Proton relaxation enhancement by means of serum-albumin and poly-L-lysine labeled with DTPA-Gd³⁺-relaxivities as a function of molecular-weight and conjugation efficiency*. Magnetic Resonance Imaging, 10(6):913–917, (1992).
- [27] Limin Cao, Binbin Li, Peiwei Yi, Hailu Zhang, Jianwu Dai, Bo Tan, and Zongwu Deng. *The interplay of T1- and T2-relaxation on T1-weighted MRI of hMSCs induced by Gd-DOTA-peptides*. Biomaterials, 35(13):4168–4174, (2014).
- [28] U Schmiedl, M Ogan, H PaaJanen, M Marotti, LE Crooks, AC Brito, and RC Brasch. *Albumin labeled with Gd-DTPA as an intravascular, blood pool enhancing agent for MR imaging-biodistribution and imaging studies*. Radiology, 162(1):205–210, (1987).

Bibliography

- [29] Zhijin Chen, Dexin Yu, Chunxi Liu, Xiaoyan Yang, Na Zhang, Chunhong Ma, Jibin Song, and Zaijun Lu. *Gadolinium-conjugated PLA-PEG nanoparticles as liver targeted molecular MRI contrast agent*. *Journal of Drug Targeting*, 19(8):657–665, (2011).
- [30] H Kobayashi and M W Brechbiel. *Nano-sized MRI contrast agents with dendrimer cores*. *Advanced Drug Delivery Review*, 57(15):2271–2286, (2005).
- [31] Chie Kojima, Baris Turkbey, Mikako Ogawa, Marcelino Bernardoc, Celeste A.S. Regino, L. Henry Bryant, Peter L. Choyke, Kenji Kono, and Hisataka Kobayashi. *Dendrimer-based MRI contrast agents: the effects of PEGylation on relaxivity and pharmacokinetics*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 7(6):1001–1008, (2011).
- [32] D Christopher Hein, Xin-Ming Liu, and Dong Wang. *Click Chemistry, A powerful tool for pharmaceutical sciences*. *Pharmaceutical Research*, 25(10):2216–2230, (2008).
- [33] Enrique Lallana, Ana Sousa-Herves, Francisco Fernandez-Trillo, Ricardo Riguera, and Eduardo Fernandez-Megia. *Click Chemistry for drug delivery nanosystems*. *Pharmaceutical Research*, 29(1):1–34, (2012).
- [34] Duane E. Prasuhn, Robert M. Yeh, Andre Obenaus, Marianne Manchester, and M.G. Finn. *Viral MRI contrast agents: coordination of Gd by native virions and attachment of Gd complexes by azide-alkyne cycloaddition*. *Chemical Communications*, (12):1269–1271, (2007).
- [35] Thomas L. Mindt, Cristina Muller, Florian Strucker, Jean-Frederic Salazar, Alexander Hohn, Thomas Mueggler, Markus Rudin, and Roger Schibli. *A Click Chemistry approach to the efficient synthesis of multiple imaging probes derived from a single precursor*. *Bioconjugate Chemistry*, 20(10):1940–1949, (2009).
- [36] N J Agard, J A Prescher, and C R Bertozzi. *A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems*. *Journal of the American Chemical Society*, 126(46):15046–15047, (2004).
- [37] Carmen Wangler, Martin Schafer, Ralf Schirmmacher, Peter Bartenstein, and Bjorn Wangler. *DOTA derivatives for site-specific biomolecule-modification via click chemistry: Synthesis and comparison of reaction characteristics*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 19(12):3864–3874, (2011).
- [38] Christian Vanasschen, Nouri Bouslimani, David Thinon, and Jean F. Desreux. *Gadolinium DOTA chelates featuring alkyne groups directly grafted on the tetraaza*

Bibliography

- macrocyclic ring: synthesis, relaxation properties, Click reaction, and relaxivity micelles*. Inorganic Chemistry, 50(18):8946–8958, (2011).
- [39] Michael K. Schultz, Sharavathi G. Parameswarappa, and F. Christopher Pigge. *Synthesis of a DOTA-Biotin Conjugate for Radionuclide chelation via Cu-free click chemistry*. Organic Letters, 12(10):2398–2401, (2010).
- [40] Molly E. Martin, Sharavathi G. Parameswarappa, F. Christopher Pigge, Michael K. Schultz, and M. Sue O’Dorisio. *A DOTA-peptide conjugate by copper free click chemistry*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 20(16):4805–4807, (2010).
- [41] Lalit N. Goswami, Lixin Ma, Peter J. Kueffer, Satish S. Jalisatgi, and M. Frederick Hawthorne. *Synthesis and relaxivity studies of a DOTA-based nanomolecular chelator assembly supported by an icosahedral closo-B12 core for MRI: A click chemistry approach*. Molecules, 18(8):9034–9048, (2013).
- [42] JA Park, JJ Lee, JC Jung, DY Yu, TJ Kim, and YM Chang. *Gd-DOTA conjugate of RGD as a potential tumor-targeting MRI contrast agent*. ChemBioChem, 9(17):2811–2813, (2008).
- [43] D Artemov, N Mori, R Ravi, and ZM Bhujwalla. *Magnetic resonance molecular imaging of the HER-2/neu receptor*. Cancer Research, 63(11):2723–2727, (2003).
- [44] MQ Tan, XM Wu, EK Jeong, QJ Chen, and ZR Lu. *Peptide-targeted nanoglobular Gd-DOTA monoamide conjugates for magnetic resonance cancer molecular imaging*. Biomacromolecules, 11(3):754–761, (2010).
- [45] SD Swanson, JF Kukowska-Latallo, AK Patri, CY Chen, S Ge, ZY Cao, and A Kotlyar. *Targeted gadolinium-loaded dendrimer nanoparticles for tumor-specific magnetic resonance contrast enhancement*. International Journal of Nanomedicine, 3(2):201–210, (2008).
- [46] Jeff W.M. Bulte and Michel M.J. Modo. *Nanoparticles in Biomedical Imaging: Emerging Technologies and Applications*, Springer (2008).
- [47] Jesse V Jokerst, Tatsiana Lobovkina, Richard N Zare, and Sanjiv S Gambhir. *Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy*. Nanomedicine, 6(4):715–728, (2011).
- [48] K Knop, R Hoogenboom, D Fischer, and US Schubert. *Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives*. Angewandte Chemie International Edition, 49(36):6288–6308, (2006).
- [49] Hyon Bin Na, In Chan Song, and Taeghwan Hyeon. *Inorganic Nanoparticles for MRI Contrast Agents*. Advanced Materials, 21(21):2133–2148, (2009).

Bibliography

- [50] M.C.Daniel and D.Astruc Gold. *Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology*. Chemical Reviews, 104(1):293–346, (2004).
- [51] Vincenzo Amendola and Moreno Meneghetti. *Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles*. Physiscal Chemistry Chemical Physics, 11(20):3805–3821, (2009).
- [52] Vincenzo Amendola and Moreno Meneghetti. *Controlled size manipulation of free gold nanoparticles by laser irradiation and their facile bioconjugation*. Journal of Materials Chemistry, 17(44):4705–4710, (2007).
- [53] John R. Ferraro, Kazuo Nakamoto, and Chris W. Brown. *Introductory Raman Spectroscopy 2nd Edition*, Elsevier (2003).
- [54] J. Kim, J.E. Lee, S.H. Lee, J.H. Yu, J.H. Lee, T.G. Park, and T. Hyeon. *Designed Fabrication of a Multifunctional Polymer Nanomedical Platform for Simultaneous Cancer- Targeted Imaging and Magnetically Guided Drug Delivery*. Advanced Materials, 20(3):478–483, (2008).
- [55] Santosh Aryala, Jaehong Keya, Cinzia Stiglianoa, Jeyarama S. Anantaa, Meng Zhongaa, and Paolo Decuzzi. *Engineered magnetic hybrid nanoparticles with enhanced relaxivity for tumor imaging*. Biomaterials, 34(31):7725–7732, (2013).
- [56] Kim E. Sapsford, W. Russ Algar, Lorenzo Berti, Kelly Boeneman Gemmill, Brendan J. Casey, Michael H. Stewart, and Igor L. Medintz. *Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries that Facilitate Nanotechnology*. Chemical Reviews, 20(113):1904–2074, (2013).
- [57] Pierre Jean Debouttiere, Stephane Roux, Francis Vocanson, Claire Billotey, Olivier Beuf, Alain Favre Reguillon, Yi Lin, Stephane Pellet Rostaing, Roger Lamartine, Pascal Perriat, and Olivier Tillement. *Design of Gold Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging*. Advanced Functional Materials, 16(18):2330–2339, (2006).
- [58] Ying Song, Xiaoyang Xu, Keith W. MacRenaris, Xue-Qing Zhang, Chad A. Mirkin, and Thomas J. Meade. *Multimodal Gadolinium-Enriched DNA Gold Nanoparticle Conjugates for Cellular Imaging*. Angewandte Chemie International Edition, 48(48):9143–9147, (2009).
- [59] Xiaojun Ji, Ruping Shao, Andrew M. Elliott, R. Jason Stafford, Emilio Esparza-Coss, James A. Bankson, Gan Liang, Zhi-Ping Luo, Keeseong Park, John T. Markert, , and Chun Li. *Bifunctional Gold Nanoshells with a Superparamagnetic Iron Oxide-Silica Core Suitable for Both MR Imaging and Photothermal Therapy*. Advanced Functional Materials, 111(17):6245–6251, (2007).

Bibliography

- [60] Moritz F Kircher, Adam de la Zerda, Jesse V Jokerst, Cristina L Zavaleta, Paul J Kempen, Erik Mittra, Ken Pitter, Ruimin Huang, Carl Campos, Frezghi Habte, Robert Sinclair, Cameron W Brennan, Ingo K Mellinghoff, Eric C Holland, and Sanjiv S Gambhir. *A brain tumor molecular imaging strategy using a new triple-modality MRI-photoacoustic-Raman nanoparticle*. *Nature Medicine*, 18(5):829–834, (2012).
- [61] Peter Verwilt, Svetlana V. Eliseeva, Sophie Carron, Luce Vander Elst, Carmen Burtea, Geert Dehaen, Sophie Laurent, Koen Binnemans, Robert N. Muller, Tatjana N. Parac-Vogt, , and Wim M. De Borggraeve. *A Modular Approach towards the Synthesis of Target-Specific MRI Contrast Agents*. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2011(24):3577–3585, (2011).
- [62] Daniel J. Mastarone, Victoria S. R. Harrison, Amanda L. Eckermann, Giacomo Parigi, Claudio Luchinat, and Thomas J. Meade. *A Modular System for the Synthesis of Multiplexed Magnetic Resonance Probes*. *Journal of the American Chemical Society*, 133(14):5329–5337, (2011).
- [63] A Barge, G Cravotto, E Gianolio, and F Fedeli. *How to determine free Gd and free ligand in solution of Gd chelates. A technical note*. *Contrast Media Molecular Imaging*, 1(5):184–188, (2006).
- [64] Olga Solovey-Vandersteen, Teodoziya Vrublevska, and Heinrich Lang. *UV-Visible and IR spectroscopic studies of ruthenium(II)-Xylenol Orange complex*. *Acta Chimica Slovenica*, (51):95–106, (2004).
- [65] Julio Atkins and Peter De Paula. *Physical Chemistry*, Oxford University Press (2006).